

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

AVALIAÇÃO POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DA ULTRAESTRUTURA DENTINÁRIA APÓS DESMINERALIZAÇÃO SUPERFICIAL

Morgane Marion Kuntze



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ODONTOLOGIA**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

Morgane Marion Kuntze

**AVALIAÇÃO POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE
VARREDURA DA ULTRAESTRUTURA DENTINÁRIA APÓS
DESMINERALIZAÇÃO SUPERFICIAL**

Dissertação submetida ao programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para obtenção do título de Mestre em Odontologia. Área de concentração: Endodontia.

Orientador: Prof. Dr. Wilson Tadeu Felipe.

Florianópolis
2016

Morgane Marion Kuntze

**AVALIAÇÃO POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE
VARREDURA DA ULTRAESTRUTURA DENTINÁRIA APÓS
DESMINERALIZAÇÃO SUPERFICIAL**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do
Título de “Mestre” e aprovada em sua forma final pelo
Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Florianópolis, 19 de fevereiro de 2016.

Profa. Dra. Izabel Cristina Santos Almeida

Banca examinadora:

Prof. Dr. Wilson Tadeu Felipe

Orientador

Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Dra. Beatriz Dulcinéia Mendes de Souza

Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Dra. Cleonice da Silveira Teixeira

Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Eduardo Antunes Bortoluzzi

Universidade Federal de Santa Catarina

Com carinho, dedico este trabalho aos meus pais, meu irmão e ao meu noivo, que são os alicerces da minha vida e os responsáveis por tornarem este sonho realidade.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço a DEUS pelo dom da vida que me concedeu, por sempre me guiar e iluminar o meu caminho, por ter me dado saúde e força para superar as dificuldades e por permitir que eu faça parte da família mais amorosa, acolhedora e companheira que existe. Obrigada DEUS!

Aos meus pais e ao meu irmão por serem a minha família. Mãe e pai, agradeço pelo amor, pela dedicação, pelo incentivo, por me ensinarem a ser uma pessoa honesta, com caráter e humilde. Obrigada por sacrificarem seus sonhos pelos meus. Júnior, agradeço por você ser meu irmão, por estar sempre ao meu lado e por me ajudar em qualquer momento. A minha admiração e amor por vocês é imensurável.

Ao Vitor, meu grande amor, pela parceria, pelo companheirismo, ensinamentos, conselhos, por estar sempre ao meu lado me incentivando e apoiando. Agradeço por suportar meus defeitos, tolerar meus humores e, principalmente, por me entender. Agradeço pela sua dedicação ao nosso amor. A minha admiração e amor por você também é imensurável.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao PPGO pela oportunidade que tive de conquistar o título de Mestre em Endodontia.

Ao meu orientador Prof. Dr. Wilson Tadeu Felipe pela oportunidade, pelos ensinamentos, pelo exemplo de disciplina e organização e pela ajuda no aperfeiçoamento dos meus conhecimentos. Obrigada pela sua disponibilidade e experiência.

A Profa. Dra. Gabriela Santos Felipe pela parceria na execução dos procedimentos laboratoriais da pesquisa, pela orientação, pelos seus ensinamentos, pela paciência, pela disponibilidade. Não tenho dúvidas que você é uma pessoa iluminada por Deus.

A Profa. Dra. Mara Cristina Santos Felipe pela disponibilidade a qualquer momento, dedicação, pelos seus ensinamentos e pelo exemplo de professora que és.

Ao doutorando Tamer Schimidt pela disponibilidade em operar o MEV várias vezes. Sua ajuda foi de extrema importância para a realização deste trabalho. Obrigada pela parceria.

A Profa. Dra. Cleonice Silveira Teixeira pela boa convivência, pelos seus conhecimentos repassados, pelas sugestões e por aceitar fazer parte da minha banca.

Ao Prof. Dr. Eduardo Antunes Bortoluzzi pela disponibilidade e por aceitar fazer parte da minha banca, ajudando a deixar este trabalho mais rico com a sua experiência.

A Profa. Dra. Beatriz Dulcinéia Mendes de Souza pela disponibilidade e por aceitar fazer parte da minha banca. És uma pessoa muito querida e um grande exemplo de professora para mim.

A minha melhor parceira de pesquisa, a “baianinha” Iane Nery Silva. Obrigada pela companhia, parceria, pelos conselhos, pelo carinho, pelos risos, pelas festas, pelos sushis. Muito obrigada por sua amizade e pelo divertido convívio nesses dois anos, com certeza você fará muitaaaa falta no meu dia a dia.

As amigas Débora Amgarten Ribeiro e Renata Vasconcelos, pela agradável convivência nesses dois anos. Obrigada pela companhia, pelas festas, pelas risadas. Vocês fizeram toda a diferença.

A minha grande amiga Maynara Schlickmann de Freitas, minha eterna dupla, pelas conversas nos corredores do CCS e por espalhar o seu bom humor e a sua alegria por onde passas. És uma pessoa muito especial.

A colega Caroline Taguchi pela convivência nesses dois anos, apesar de ter sido pouca, porém muito boa. Foi muito bom tê-la conhecido. És um exemplo de inteligência e simpatia.

Agradeço as minhas amigas por sempre estarem ao meu lado, pelas risadas, discussões e por todos os momentos divertidos que passamos juntas.

Agradeço a todos que de alguma forma participaram e torceram por essa minha conquista!

“Os que se encantam com a prática sem a ciência são como os timoneiros que entram no navio sem timão nem bússola, nunca tendo certeza do seu destino”.

Leonardo da Vinci

Morgane Marion Kuntze

**AVALIAÇÃO POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE
VARREDURA DA ULTRAESTRUTURA DENTINÁRIA APÓS
DESMINERALIZAÇÃO SUPERFICIAL**

O presente trabalho de dissertação será apresentado na forma de artigo científico, com introdução estendida, conforme estabelecido no detalhamento do artigo 51, item 03, PPGO, 2012.

Florianópolis, 19 de fevereiro de 2016.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar, por meio de microscopia eletrônica de varredura, a ultraestrutura da dentina após a desmineralização com soluções de ácido clorídrico 6 M e 12 M. Vinte discos de dentina, com aproximadamente 2 mm de espessura, foram confeccionados a partir da porção radicular de dentes bovinos. Os discos foram seccionados no sentido vestibulo-lingual originando segmentos de dentina (n = 40), dos quais 20 foram mergulhados em solução fixadora, lavados em solução tampão e desidratados em álcool etílico. Depois de 24 horas em estufa a 37°C, os segmentos foram divididos aleatoriamente em 2 grupos experimentais (n = 10) e preparados para análise em MEV utilizando ácido clorídrico 6M (G6M) e 12M (G12M) para a desmineralização. A análise das amostras do G6M revelou uma descalcificação superficial que expôs a dentina peritubular e evidenciou a presença de rachaduras ao longo do seu comprimento. Houve pequena ampliação da abertura dos túbulos dentinários. A dentina intertubular foi parcialmente desmineralizada. A desmineralização das amostras do G12M foi mais agressiva e em diferentes profundidades, provocando áreas de erosão e o “descolamento” de camadas de dentina. Partes de dentina peritubular foram observadas sobre a superfície dentinária. Houve grande ampliação da abertura dos túbulos dentinários, conectando-as quando estavam muito próximas. A análise em EDX mostrou que as estruturas tubulares observadas nos dois grupos apresentaram composição química semelhante à dentina intertubular. Não foi possível verificar a presença da *lamina limitans*. Foi concluído que o padrão de desmineralização da

dentina é dependente da molaridade do ácido clorídrico e promove a exposição de dentina peritubular.

Palavras-chave: Ultraestrutura dentinária; desmineralização; *lamina limitans*; microscopia eletrônica de varredura (MEV).

ABSTRACT

The purpose of this study was to evaluate by scanning electron microscopy the ultrastructure of dentin after demineralization with hydrochloric acid solution 6 M and 12 M. Twenty dentin discs, with 2 mm thick, were made from the portion root of bovine teeth. The discs were sectioned transversely to obtain dentin segments. Twenty segments were dipped in fixative solution, washed in buffer solution and dehydrated in ethanol. After 24 hours at 37°C, the segments were randomly divided into 2 experimental groups (n = 10) and demineralized with 6M hydrochloric acid (G6M) and 12M (G12M), and prepared for SEM analysis. The analysis of the samples from G6M revealed desmineralized surface, exposed peritubular dentin and showed the presence of fissure along its length. There was a small magnification of the dentinal tubules opening. The intertubular dentin was partially demineralized. The demineralization of the samples from G12M was more aggressive and at different depths, causing areas of erosion and "detachment" of dentin layers. Peritubular dentin were observed on the dentin surface. There was a large magnification of dentinal tubules opening, connecting the tubules when they were very nearby. The EDX analysis showed the tubular structures observed in the two groups had similar chemical composition of the intertubular dentine. It was not possible to verify the presence of *lamina limitans*. It was concluded that dentin demineralization is dependent on the molarity of the hydrochloric acid and promote exposure of peritubular dentin.

Keywords: Ultrastructure of dentin; desmineralized; *lamina limitans*; scanning electron microscopy (SEM).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Porcentagem em mols de átomos do G6M.

Tabela 2 – Porcentagem em mols de átomos do G12M.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-acético

HCl – Ácido clorídrico

M – Concentração Molar ou Molaridade

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	25
2. OBJETIVOS	29
2.1 Objetivo Geral	29
2.2 Objetivos Específicos	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1 Seleção e preparo das amostras	30
3.2 Preparo para análise em MEV	31
4. RESULTADOS	32
4.1 Dentina desmineralizada com HCl 6M	32
4.2 Dentina desmineralizada com HCl 12M	35
5. DISCUSSÃO	38
6. CONCLUSÕES	41
REFERÊNCIAS	42

1 INTRODUÇÃO

O conhecimento sobre a microestrutura da dentina e suas propriedades é essencial para diversos procedimentos na odontologia. A dentina humana é composta por 70% de matéria inorgânica (principalmente cristais de hidroxiapatita), 18% de matéria orgânica (sendo a maior parte de fibras colágenas) e 12% de água (FERRARIS; MUÑOS, 2006).

Vários componentes constituem a matriz orgânica, dos quais se destaca o colágeno tipo I, responsável por 90% da sua composição. Outros tipos de colágeno (III, IV, V e VI) também são encontrados nessa matriz, mas em proporções menores e em outras circunstâncias. O colágeno tipo III ocasionalmente está presente na dentina peritubular, o tipo IV pode ser observado no período inicial da odontogênese e, os tipos V e VI nas regiões de pré-dentina (FERRARIS; MUÑOS, 2006). Proteoglicanos e proteínas também estão presentes na matriz orgânica. Dentre as proteínas podemos destacar as exclusivas de dentina, tais como a fosfosforina dentinária (DPP), a proteína da matriz dentinária I (DPM1) e a sialoproteína dentinária (BEDRAM-RUSSO et al., 2004).

A matriz inorgânica é composta, na sua maior parte, por cristais de hidroxiapatita, orientados paralelamente às fibras de colágeno da matriz dentinária. Quimicamente são semelhantes aos cristais presentes no esmalte, osso e cimento. Diferenciam-se dos cristais do esmalte em relação ao tamanho, pois os cristais de hidroxiapatita da dentina são considerados pequenos e delgados. Ainda é possível encontrar nessa porção mineral elementos como fosfatos, carbonatos, sulfatos, flúor, ferro, magnésio, zinco, cálcio, entre outros (BEDRAM-RUSSO et al., 2004).

A matriz dentinária tem uma morfologia peculiar. É composta por unidades estruturais básicas, os túbulos dentinários, que são envoltos por uma camada hipermineralizada conhecida como dentina peritubular e uma matriz intertubular na qual se concentra a maior parte da matéria orgânica, na forma de fibras colágenas e proteínas não colagenosas, tais como proteoglicanos, glicosaminoglicanos e proteínas fosforiladas (GOTLIV et al., 2006; GOTLIV; VEIS, 2007; 2009; BERTASSONI et al., 2012).

Complementam a composição da dentina unidades estruturais secundárias constituídas por linhas incrementais ou de crescimento, dentina interglobular ou espaços de Czermack, camada granulosa de Tomes, linhas ou bandas dentinárias de Schreger, junções amelodentinária ou cementodentinária (FERRARIS; MUÑOS, 2006).

Os túbulos dentinários são estruturas cilíndricas que medem de 1 a 2 µm de diâmetro (BERTASSONI et al., 2012) e se estendem perpendicularmente à superfície dental, desde o limite com a polpa até o limite com o esmalte na coroa e com o cemento na região da raiz. A densidade e o diâmetro dos túbulos dentinários são maiores nas regiões próximas à polpa e menores na região periférica (FERRARIS; MUÑOS, 2006). Essas características histológicas influenciam na permeabilidade dentinária, que, portanto, é maior nas proximidades da polpa (BERTASSONI et al., 2012).

A formação da dentina peritubular ainda não é bem compreendida. Acredita-se que ela se desenvolve a partir da parede interna do túbulo, diminuindo o espaço deste até atingir uma fase de hipermineralização (TAKUMA; EDA, 1966). Outros estudos sugerem que se formam a partir de uma matriz rica em ácido glutâmico (GOTLIV; VEIS, 2007; 2009) ou por deposição contínua do fluido pulpar, resultando na hipermineralização em torno dos túbulos dentinários (DAI et al., 1991). Segundo Ferraris e Muños (2006) a dentina peritubular é formada após a mineralização completa da dentina intertubular. É depositada lenta e gradualmente de forma centrípeta em relação ao túbulo, podendo, com o passar do tempo, obliterá-lo parcial ou totalmente.

Assim como a formação, a composição da dentina peritubular ainda não está bem definida. Sabe-se que o colágeno praticamente não é encontrado, sendo assim o pouco da matéria orgânica observada é constituída por substâncias não-colagenosas como glicosaminoglicanos, proteoglicanos e proteínas fosforiladas (GOTLIV et al., 2006; GOTLIV; VEIS, 2007; 2009; BERTASSONI et al., 2012). Os cristais de hidroxiapatita presentes neste tipo de dentina são ricos em magnésio, carbonato e fosfato de cálcio (FERRARIS; MUÑOS, 2006).

A dentina intertubular está distribuída entre as paredes dos túbulos dentinários e é composta principalmente por fibras colágenas que formam uma complexa rede fibrilar, no qual se depositam cristais de hidroxiapatita (FERRARIS; MUÑOS, 2006).

Além das unidades estruturais que compõem a dentina descritas acima, a literatura tem relatado uma estrutura em formato de “folha” (ISOKAWA et al., 1970; THOMAS e CARELLA, 1984) responsável por revestir a dentina peritubular em todo o comprimento dos túbulos, conhecida como *lamina limitans*.

Os primeiros estudos sobre a *lamina limitans* foram realizados a partir de 1960, os quais descreveram tal estrutura como uma bainha orgânica (TAKUMA, 1960; JOHANSEN e PARKS, 1962; TAKUMA;

EDA, 1966) responsável pelo delineamento interno da dentina peritubular (SHROFF et al., 1954; 1956; TAKUMA, 1960). Essa lâmina é composta principalmente por glicosaminoglicanos (THOMAS; CARELLA, 1984), justificando assim sua permanência após o processo de desmineralização e digestão por colagenases (YAMADA et al., 1983).

Mais recentemente, Bertassoni et al., (2012) confirmaram que além de glicosaminoglicanos e proteínas fosforiladas, a *lamina limitans* é composta na sua maior parte por núcleos de proteínas presentes nos proteoglicanos, ligando-se às paredes laterais dos túbulos por meio de uma rede de fibras colágenas. Assim, acredita-se que a *lamina limitans* seja constituída por proteínas não colagenosas responsáveis por compor a matriz orgânica da dentina peritubular.

Muitas vezes alterações na ultraestrutura dentinária são indicadas para a realização de procedimentos odontológicos e para o estudo da morfologia da dentina.

O sucesso da adesão de materiais restauradores à dentina depende, em alguns casos, da utilização de ácidos que desmineralizam a superfície da dentina e removem a lama dentinária, aumentando sua permeabilidade e alterando composições químicas na sua superfície (PASHLEY, 1992; VAN MEERBEEK et al., 1993; PASHLEY et al., 1993; STANGEL et al., 1994; BRESHI et al., 1999).

A desmineralização da superfície da dentina também está indicada nos tratamentos endodônticos. Durante o preparo mecânico do canal radicular também há formação de uma lama dentinária sobre as paredes de dentina, que obstruem as entradas dos túbulos dentinários. Em virtude disso, recomenda-se a utilização de solução quelante (EDTA 17%) para a remoção desta lama (TEIXEIRA et al., 2005) com o intuito de desobstruir os túbulos e promover uma melhor penetração de medicamentos intracanaís e materiais obturadores.

Em estudos sobre a microestrutura dentinária é necessário dispor de técnicas que permitam observar detalhes da sua morfologia. Dentre elas destaca-se a microscopia eletrônica de varredura (MEV) que permite examinar materiais em aumentos de 300.000x ou mais para a maior parte dos tecidos sólidos (DEDAVID et al., 2007). Mas, para avaliar as propriedades e a ultraestrutura da dentina em MEV é necessário que haja uma leve desmineralização da sua superfície (PERDIGÃO et al., 1999). Para isso, ácidos em concentrações e tempos específicos são aplicados na estrutura dentinária, provocando diferentes efeitos sobre a morfologia dessa estrutura (GARBEROGLIO; BRÄNNSTRÖM, 1976).

Os ácidos mais utilizados são o ácido clorídrico (PERDIGÃO et al., 1999), ácido maleico (CAMPS et al., 1995; BRESHI et al., 2002), ácido nítrico (MARSHALL et al., 1993), ácido fosfórico (CAIADO et al., 2010; BRAJDIC et al., 2008; PERDIGÃO et al., 1996; MARSHALL et al., 1997) e o ácido cítrico (REEDER et al., 1978; BRESHI et al., 2002).

Segundo Pashley et al. (1992) o pH, pKa, peso molecular, molaridade e viscosidade são aspectos importantes no processo de desmineralização. Assim como o tipo de agente ácido (INOKOSHI et al., 1989; 1990; MARSHALL et al., 1993; CAMPS et al., 1995; MARSHALL et al., 1997), o tempo de exposição (MARSHALL et al., 1993) e a concentração dos ácidos (CHIBA et al., 1989; PASHLEY et al., 1992; BRESCHI et al., 2002) são fatores que influenciam o processo (ERICKSON et al., 1991).

Não é possível desmineralizar localmente a superfície com ácido sem provocar uma alteração na morfologia da estrutura dentinária (MARSHALL et al., 1993). Dentre essas alterações é citado o aumento da porosidade superficial (NAKABAYASHI et al., 1982), o aumento do diâmetro e melhor visualização dos túbulos dentinários (VAN MEERBEEK et al., 1992; PASHLEY et al., 1993; SANO et al., 1994), o colapso das fibras colágenas (INOKOSHI et al., 1989; 1990) e modificações ultraestruturais da dentina intertubular e peritubular. Muitos detalhes desse processo são poucos compreendidos e muitas vezes interpretados de maneiras distintas.

Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar, por meio de microscopia eletrônica de varredura, a morfologia da estrutura dentinária após desmineralização superficial com ácido clorídrico em duas concentrações diferentes.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar, por meio de microscopia eletrônica de varredura, a estrutura dentinária após a desmineralização superficial com ácido clorídrico 6 M e 12 M.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar os padrões de desmineralização da dentina;
- Avaliar a abertura dos túbulos dentinários;
- Avaliar a estrutura e composição química da dentina intertubular e peritubular;
- Identificar a presença da *lamina limitans*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 SELEÇÃO E PREPARO DAS AMOSTRAS

Foram utilizados 5 incisivos de bois com aproximadamente 30 meses de idade, provenientes de abatedouros. Os dentes foram lavados em água corrente, raspados com curetas periodontais (Hu-Friedy, Rio de Janeiro, Brasil) e imersos em solução de timol para se manterem conservados até o momento do preparo.

As porções coronárias e apicais dos dentes foram seccionadas com disco diamantado dupla face (KG Sorensen, São Paulo, Brasil) a fim de obter tubos de 8 a 10 mm de comprimento aproximadamente. Pontas diamantadas tronco cônicas 3080, 3081, 3082 ou 4083 (KG Microdont, São Paulo, Brasil) foram utilizadas com o objetivo de padronizar e regularizar os canais radiculares. Em seguida os tubos foram lavados em água destilada e esterilizados em autoclave.

Cortes transversais ao longo eixo do dente foram realizados nos tubos de dentina numa máquina de corte Isomet 1000 (Buehler, Lake forest, IL, USA) com disco diamantado (South Bay Technology, San Clement CA, EUA), sob refrigeração constante, peso de 75 gramas e velocidade de 200 rpm, obtendo-se discos de dentina (n=20) de 2 mm de espessura. Estes foram imersos em solução de EDTA 17% por 3 minutos e hipoclorito de sódio 2% também por 3 minutos com o intuito de remover a lama dentinária formada durante o preparo dos tubos.

Posteriormente, todos os discos foram seccionados no sentido vestibulo-lingual e uma das suas extremidades foi aplainada com disco diamantado dupla face (KG Sorensen, São Paulo, Brasil), obtendo-se segmentos de dentina (n=40).

Vinte desses segmentos foram tratados segundo metodologia empregada por Reyes Carmona et al. (2009). A fixação das amostras foi realizada em glutaraldeído 2,5% tamponado com solução de cacodilato 0,2 M por 12 horas a 4° C, seguida de lavagem em tampão cacodilato 0,2 M durante 1 hora com duas trocas e breve lavagem em água destilada. A desidratação foi feita em concentrações crescentes de álcool etílico 50%, 75%, 90%, 95% e 100% durante 20 minutos em cada solução e 1 hora no álcool absoluto. Os segmentos permaneceram em estufa à 37°C e, após 24 horas foram divididos aleatoriamente em 2 grupos experimentais (n = 10) e desmineralizados pela imersão por 30 segundos em ácido clorídrico 6M (G6M) ou 12M (G12M) para análise em MEV.

Após a desmineralização, os segmentos de dentina foram brevemente lavados em água destilada, imersos em hipoclorito de sódio 2% por 10 minutos e lavados novamente em água destilada pelo mesmo período de tempo.

3.2 PREPARO PARA ANÁLISE EM MEV

Depois de secos em estufa a 37°C por 48 horas os discos foram fixados em “stubs” e recobertos por duas camadas de ouro de aproximadamente 300 Å.

A análise ultraestrutural da dentina foi realizada no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) em microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM-6390 LV) operando em 10 Kv.

Por meio de fotomicrografias, com aumentos variando de 25 a 5.000x, foi realizada a análise descritiva das alterações observadas na superfície dentinária.

A composição química da dentina foi analisada por energia dispersiva de Rx (EDX) a fim de registrar os principais elementos químicos constituintes e possibilitar, quando necessário, a diferenciação das estruturas observadas.

4 RESULTADOS

4.1 DENTINA DESMINERALIZADA COM ÁCIDO CLORÍDRICO 6 MOLAR

Na maioria das amostras foi possível perceber uma descalcificação superficial da dentina (*Fig. 1, A e B*) e prolongamentos de dentina peritubular com rachaduras ao longo do seu comprimento (*Fig. 1, C e D*). Em algumas regiões houve uma pequena ampliação da abertura dos túbulos dentinários (*Fig. 2, A e B*). A dentina intertubular foi parcialmente desmineralizada (*Fig. 2, C e D – seta branca*) e a dentina peritubular exposta (*Fig. 2, E – seta branca*). Em cortes transversais foi constatada a presença de dentina peritubular obstruída projetando-se a partir dos túbulos dentinários (*Fig. 2, F – seta branca*). A *lamina limitans* não pôde ser identificada em nenhuma das amostras avaliadas.

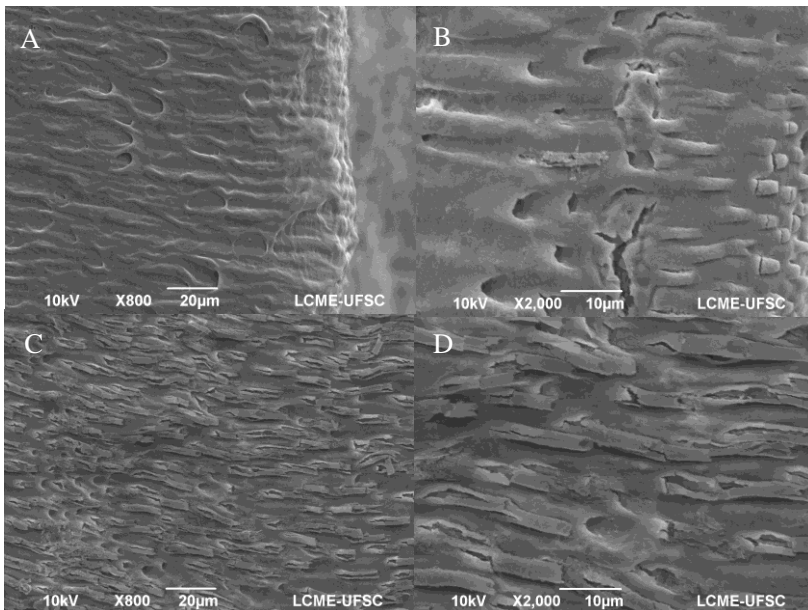


Figura 1. Dentina desmineralizada superficialmente (*A e B*). Prolongamentos de dentina peritubular com rachaduras sobre a superfície dentinária (*C e D*).

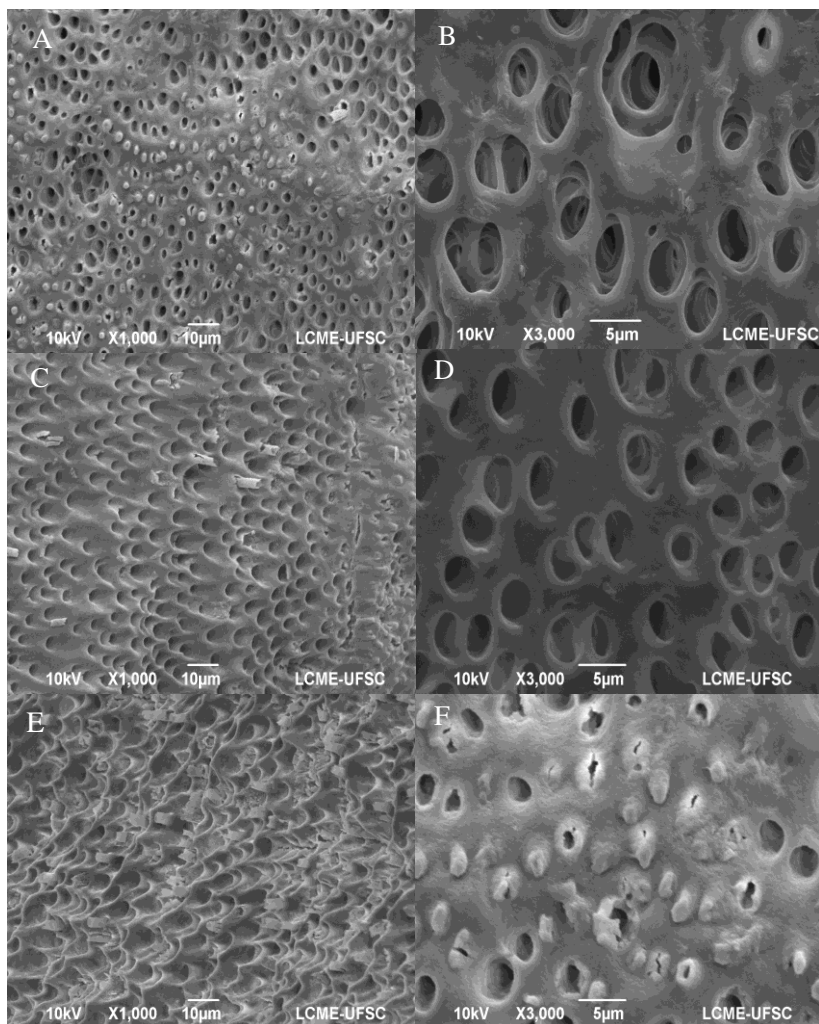


Figura 2. Abertura dos túbulos dentinários com pouca ampliação (A e B). Dentina intertubular parcialmente desmineralizada (C e D – *seta branca*). Dentina peritubular exposta (E – *seta branca*). Dentina peritubular obstruída (F – *seta branca*).

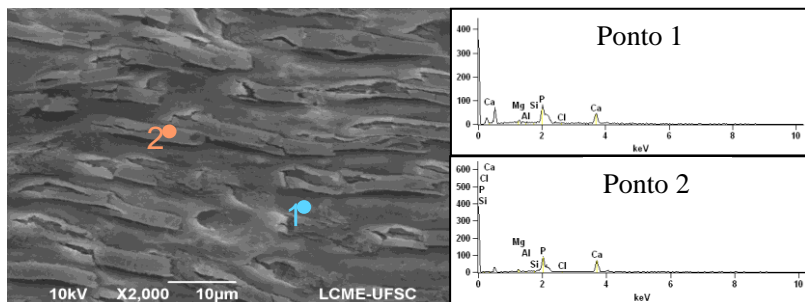


Figura 3. Espectro em EDX da dentina (pontos 1 e 2) de amostras desmineralizadas com HCl 6 M

Tabela 1. Porcentagem em mols de átomos do G6M.

	Mg	Al	Si	P	Cl	Ca
Ponto 1	3,59	0,28	0,38	33,87	1,00	60,88
Ponto 2	3,92	0,00	0,00	26,44	0,00	69,64

4.2 DENTINA DESMINERALIZADA COM ÁCIDO CLORÍDRICO 12 MOLAR

Ao observar o padrão de desmineralização da dentina após imersão em ácido clorídrico 12M foi possível observar uma desmineralização mais agressiva e em diferentes profundidades, provocando áreas de erosão e o “descolamento” de camadas de dentina (*Fig. 4, A e B*). Segmentos de dentina peritubular também foram observadas sobre a dentina em algumas amostras (*Fig. 5, A e B*). Em algumas regiões houve uma grande ampliação da abertura dos túbulos dentinários, promovendo, inclusive, a conexão entre elas quando estavam muito próximas (*Fig. 5, C e D*). A dentina intertubular foi desmineralizada em maior extensão e profundidade (*Fig. 5, E*) e a peritubular parcialmente descalcificada (*Fig. 5, F*). A *lamina limitans* não pôde ser identificada em nenhuma das amostras deste grupo.

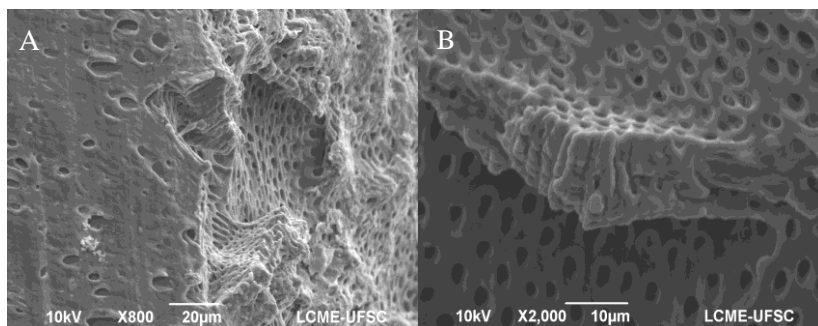


Figura 4. Desmineralização mais agressiva, provocando áreas de erosão (A) e o “descolamento” de camadas de dentina (B).

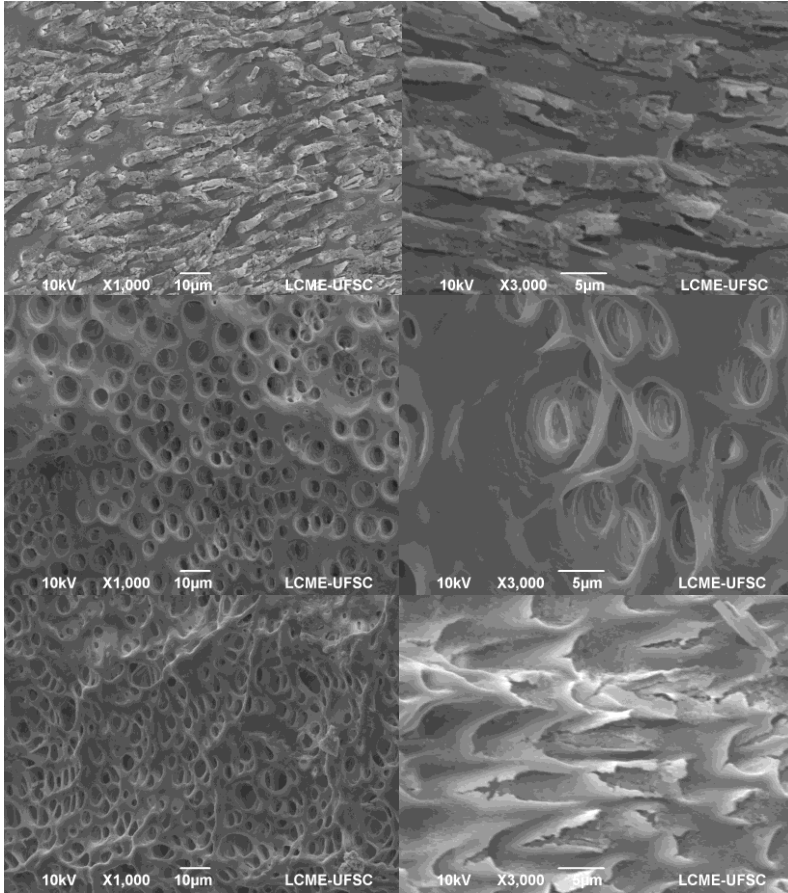


Figura 5. Segmentos de dentina peritubular sobre a superfície dentinária (A e B). Grande ampliação da abertura dos túbulos dentinários, ocorrendo conexão entre elas quando estavam muito próximas (C e D). Dentina intertubular desmineralizada em maior extensão e profundidade (E). Dentina peritubular parcialmente descalcificada (F).

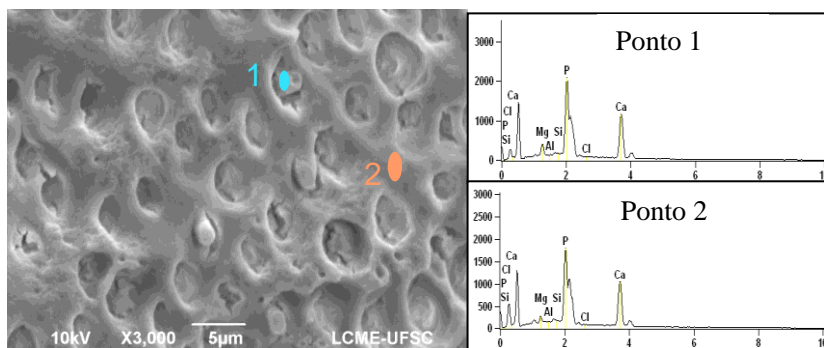


Figura 6.. Espectro em EDX da dentina peritubular (pontos 1 e 2) de amostras desmineralizadas com HCl 12 M.

Tabela 2. Porcentagem em mols de átomos do G12M.

	Mg	Al	Si	P	Cl	Ca
Ponto 1	4,48	0,00	0,74	31,08	0,00	63,70
Ponto 2	3,00	0,00	0,89	27,15	0,00	68,95

5 DISCUSSÃO

Nesta pesquisa foram utilizados discos de dentina bovina uma vez que as pesquisas com dentes humanos têm sido cada vez mais limitadas. A difícil obtenção de uma amostra de qualidade, padronização adequada e as questões éticas discutidas atualmente, têm sugerido a substituição de dentes humanos por dentes bovinos devido às semelhanças morfológicas (SCHILKE et al., 2000; REIS et al., 2004; CAMARGO, et al., 2007; FONSECA et al., 2008; COSTA et al., 2015), mecânicas (HARA et al., 2003; WEGEHAUPT et al., 2008) e bioquímicas (KATO et al., 2011).

O efeito da desmineralização superficial da dentina com diferentes concentrações de ácido clorídrico foi observado por meio de MEV, a qual fornece informações sobre morfologia, características microestruturais e identificação de elementos químicos de uma amostra sólida em alta resolução. Ainda, proporciona imagens tridimensionais resultantes da grande profundidade de campo e permite a análise em pequenas áreas e com grande profundidade de foco dependendo do objetivo do pesquisador (DEDAVID et al., 2007).

A composição química da dentina foi analisada por EDX, o qual fornece informações sobre os principais elementos químicos constituintes da estrutura avaliada.

A análise ultraestrutural da dentina revelou que ambas as concentrações têm a capacidade de desmineralizar dentina, fato já evidenciado por PERDIGÃO et al. (1999), quando do uso do HCl 6 molar.

O poder de desmineralização do ácido clorídrico 6 M foi mais brando quando comparado ao do 12 M. O ácido clorídrico 6 M provocou uma descalcificação superficial da dentina, expondo dentina peritubular com rachaduras ao longo do seu comprimento. Provavelmete, essas rachaduras foram provocadas pelo processo de desidratação em concentrações crescentes de álcool etílico e pela secagem em estufa a 37°C. Em algumas regiões houve uma pequena ampliação da abertura dos túbulos dentinários e a maior parte deles se apresentavam desobstruídos. A dentina intertubular foi parcialmente desmineralizada e a dentina peritubular foi exposta. Tal fato é explicado pela composição dessas estruturas. Na dentina intertubular concentra-se a maior parte de matéria orgânica da dentina na forma de fibras colágenas (BERTASSONI et al., 2012). Já a dentina peritubular é hipermineralizada, sendo composta na sua maior parte por cristais de

hidroxiapatita imersos numa matriz orgânica constituída por glicosaminoglicanos, proteoglicanos e proteínas fosforiladas (GOTLIV et al., 2006; GOTLIV e VEIS, 2007, 2009; BERTASSONI et al., 2012), consequentemente mais resistente à ação do ácido.

Com a análise em EDX foi constatado que as projeções tubulares observadas longitudinalmente sobre a superfície dentinária e projetando-se a partir do interior dos túbulos dentinários no sentido transversal é dentina peritubular. Tal fato é justificado pela porcentagem em mols de átomos de magnésio (GOTLIV e VEIS, 2009), fósforo e cálcio (REYES CARMONA et al., 2009), que, de acordo com a literatura são elementos químicos presentes na composição da dentina peritubular (FERRARIS; MUÑOS, 2006).

Quando observadas no sentido transversal, em algumas amostras, foi constatada a presença de dentina peritubular obstruída. Tal fato pode ser explicado pela provável permanência de lama dentinária nas entradas dos túbulos ou em consequência de algum artefato ocorrido durante o corte da dentina (THOMAS e CARELLA, 1984).

O padrão de desmineralização provocado pela solução de ácido clorídrico 12 M foi mais agressivo e a descalcificação mais profunda, devido a concentração molar ou molaridade dos ácidos utilizados no estudo.

A concentração molar é a quantidade de soluto, em mol, dissolvido em uma determinada quantidade de solvente. Esta unidade elementar pode ser expressa em mols de átomos, moléculas, íons, elétrons, entre outros. A molaridade é a medida de concentração mais utilizada para fornecer dados quantitativos de soluto em uma solução, já que existem outros tipos concentrações de soluções, como a concentração comum e a porcentagem em massa (RUSSELL, 1994).

A molaridade é amplamente utilizada para fornecer indícios da acidez ou basicidade de soluções de determinados ácidos e bases, uma vez que o pH de uma solução está diretamente ligado a concentração molar de íons hidrônio (H_3O^+) provenientes da ionização de ácidos e íons hidroxila (OH^-) provenientes da dissociação das bases. No caso de um ácido, quanto maior for sua concentração molar mais íons H_3O^+ existirão em solução, consequentemente mais forte será este ácido e menor será o pH da solução (SARDELLA, 1995).

Devido a agressividade da solução de ácido clorídrico 12 M, áreas de erosão e o “descolamento” de camadas de dentina forma observadas. A erosão pode ter sido consequência do uso de disco diamantado dupla face, o qual provavelmente provocou defeitos na dentina durante o corte, promovendo o acúmulo de solução ácida em

algumas regiões. Já o “descolamento” de camadas de dentina pode ser explicado com base no processo de formação da dentina, que acontece por sobreposição de camadas e caracterizado pela deposição regular e rítmica de dentina realizada pelos odontoblastos (FERRARIS; MUÑOS, 2006).

Também foram observados prolongamentos de dentina peritubular sobre a superfície dentinária em algumas amostras. Houve uma grande ampliação da abertura dos túbulos dentinários, conectando-as quando estavam mais próximas. Superficialmente, a dentina intertubular foi desmineralizada, corroborando os achados de Marshal et al. (2003). Já a peritubular foi parcialmente descalcificada.

6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, foi possível concluir que:

1. A desmineralização da dentina mostrou-se dependente da molaridade do ácido e promove a exposição de dentina peritubular.

2. No G6M a desmineralização foi superficial deixando a superfície mais lisa. No G12M a desmineralização foi mais intensa e em diferentes profundidades.

3. A ampliação das aberturas dos túbulos dentinários, foi mais significativa no G12M.

4. A dentina intertubular foi parcialmente preservada no G6M e superficialmente desmineralizada no G12M. Já a dentina peritubular foi exposta em ambas e parcialmente descalcificada no G12M. A dentina intertubular e peritubular apresentaram composição química semelhantes. As estruturas tubulares observadas nas amostras dos dois grupos são dentina peritubular.

5. A *lamina limitans* não foi identificada nas amostras avaliadas.

REFERÊNCIAS

- BEDRAM-RUSSO et al. Dentin biomodification: strategies renewable resources and clinical applications. **Dental Materials**, v.30, n.14, p. 62-76, 2004.
- BERTASSONI et al. The dentin organic matrix – limitations of restorative dentistry hidden on the nanometer scale. **Acta Biomaterialia**, v. 8, n. 14, p.2419-2433, 2012.
- BRAJDIC, D et al. Influence of different etching times on dentin surface morphology. **Coll Antropol**, v.3, p.893-900, 2008.
- BRESCHI, L. A field emission in-lens SEM study of enamel and dentin. **Journal Biomedical Materials Research**, v.46, p. 315-323, 1999.
- BRESCHI, L et al. High resolution SEM evaluation of dentin etched with maleic and citric. **Dental Materials**, v. 18, n. 9, p.26-35, 2002.
- CAIADO, A.C.R.L et al. The effect of acid etchant type and dentin location on tubular density and dimension. **Journal of Prosthetic Dentistry**, v.103, p.352-361, 2010.
- CAMARGO, C. H. R.; SIVIERO, M.; CAMARGO, S. E. A.; OLIVEIRA, S. H. G.; CARVALHO, C. A.T.; VALERA, M. C. Topographical, Diametral, and Quantitative Analysis of Dentin Tubules in the Root Canals of Human and Bovine Teeth. **Journal of Endodontics**, v.33, n.4, p.422– 426, 2007.
- CAMPS, J et al. Influence of concentration and application time of maleic acid on dentin permeability. **Dental Materials**, v.111, p. 177-181, 1995.
- COSTA, B. M.; IWAMOTO, A. I.; PUPPIN-RONTANI, R. M.; PASCON, F. M. Comparative Analysis of Root Dentin Morphology and Structure of Human Versus Bovine Primary Teeth. **Microscopy and Microanalyses**, v.21, p.689-694, 2015.
- CHIBA, M.; ITOH, K.; WAKUMOTO, S. Effect of dentin cleansers on the bonding efficacy of dentin adhesive. **Dental Materials**, v. 8, p.76-85, 1989.
- DAI, X.F.; TENCATE, A.R.; LIMEBACK, H. The extent and distribution of intratubular collagen fibrils in human dentin. **Archives Oral Biology**, v.36, p.775–778, 1991.
- DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores [recurso eletrônico] Porto Alegre: EDIPUCRS, 2007.

- ERICKSON, R. L.; GLASSPOOL, E. A.; PASHLEY, D. H. Dentin permeability changes from acidic dentin conditioners. *Journal Dentistry Restorative*, n. 903, 1991.
- FERRARIS, M.E.G.; MUÑOS, A.C. Histologia e embriologia bucodental. 2ª Edição. Editora: **Guanabara: Koogan**, p. 218-228, 2006.
- FONSECA, R. B.; HAITER-NETO, F.; CARLO, H. L.; SOARES, C. J.; SINHORETI, M. A.; PUPPIN-RONTANI, R. M.; CORRER-SOBRINHO, L. Radiodensity and hardness of enamel and dentin of human and bovine teeth, varying bovine teeth age. **Archives Oral Biology**, v.53, p.1023-1029, 2008.
- GARBEROGLIO e BRÄNNSTRÖM. Scanning electron microscopy investigation of human dentinal tubules. **Archives Oral Biology**, v. 21, p. 355-362, 1976.
- GOTLIV, B.A.; ROBACH, J.S.; VEIS, A. The composition and structure of bovine peritubular dentin: mapping by time of flight secondary ion mass spectroscopy. **Journal of Structural Biology**, v. 156, p.320-333, 2006.
- GOTLIV, B.A.; VEIS, A. Peritubular dentin, a vertebrate apatitic mineralized tissue without collagen: role of a phospholipid-proteolipid complex. **Calcified Tissue International**, v. 81, p.191-205, 2007.
- GOTLIV, B.A.; VEIS, A. The composition of bovine peritubular dentin: matching TOF-SIMS. Scanning electron microscopy and biochemical component distributions. **Cells Tissues Organs**, v.189, p.12-19, 2009.
- HARA, A. T.; QUEIROZ, C. S.; PAES LEME, A. F.; SERRA, M. C.; CURY, J. A. Caries progression and inhibition in human and bovine root dentine in situ. **Caries Research**, v.37, p.339-344, 2003.
- INOKOSHI, S.; HARNISRATTISAI, C.; SHIMADA, Y.; TATSUMI, T.; HOSODA, H. Study on resin-impregnated layer of various dentin bonding techniques. **Dental Materials**, v. 14, n. 2, p. 95-96, 1989.
- INOKOSHI, S.; HOSODA, H.; HARNIRATTISAI, C.; SHIMADA, Y.; TATSUMI, T. A study on the resin-impregnated layer of dentin. Part I: A comparative study on the decalcified and undecalcified sections and the application of argon ion beam etching to disclose the resin impregnated layer of dentin. **Journal Conservative Dentistry**, v.43, p.427-442, 1990.
- ISOKAWA, S.; TODA, Y.; KUBOTA, K. A scanning electron microscopic observation of etched human peritubular dentin. **Archives Oral Biology**, v.15, p.1303-1306, 1970.
- JOHANSEN, E.; PARKS, H.F. Electron-microscopic observations on sound human dentine. **Archives Oral Biology**, v.7, p.973-981, 1962.

- KATO, M.T et al. Activity of matrix metalloproteinases in bovine versus human Dentine. **Caries Research**, v.45, p.429-434, 2011.
- MARSHALL JR, G.W et al. Atomic force atomic of acids effects on dentin. **Dental Materials**, v. 9, n. 3, p. 265-268, July 1993.
- MARSHALL JR, G.W et al. Dentin demineralization: effects of dentin depth, pH and different acids. **Dental Materials**, v. 13, n. 5 p. 338-343, 1997.
- NAKABAYASHI, N.; KOJIMA, K.; MASUHARA, E. **Journal of Biomedical Materials Research**, n.16 p.265, 1982.
- PASHLEY, D.H. The effects of acid etching on the pulpodentin complex. **Operative Dentistry**, n. 17, p. 229-242, 1992.
- PASHLEY, D.H.; CIUCCHI, B.; SANO; HORNER, J.A. Permeability of dentin to adhesive agents. **Quintessence International**, n. 24, p.618-631, 1993.
- PASHLEY, E.L.; TAO, L.; DERKSON, G.; PASHLEY, D.H. Dentin permeability and bond strengths after various surface treatments. **Dental Materials**, v.5, p.375-378, 1989.
- PERDIGÃO, J et al. The effect of a re-wetting agent on dentin bonding. **Dental Materials**, v.15, p. 282-295, 1999.
- PERDIGÃO, J.; LAMBRECHTS, P.; VAN MEERBEEK, B.; TOME, A.R.; VANHERLE, G.; LOPES, A.B. Morphological field emission-SEM study of the effect of six phosphoric acid etching agents on human dentin. **Dental Materials**, v.12, p.262-271, 1996.
- REEDER, Q.W.; WALTON, R.E.; LINVINGSTON.; M.J.; PASHLEY, D.H. Dentin permeability: Determinants of hidraulic conductance. **Journal of Dental Research**, v.57, p.187-193, 1978.
- REIS, A. F.; GIANNINI, M.; KAVAGUCHI, A.; SOARES, C. J.; LINE, S. R. Comparison of microtensile bond strength to enamel and dentin of human, bovine, and porcine teeth. **Journal of Adhesive Dentistry**, v.6, p.117-121, 2004.
- REYES-CARMONA, J. F.; FELIPPE, M. S.; FELIPPE, W. T. Biomineralization ability and interaction of Mineral Trioxide Aggregate and White Portland Cement with dentin in a phosphate-containing fluid. *Journal of Endodontics*, Baltimore, v.36, n.5, p.731-736, 2009.
- RUSSELL, J. B. Química Geral. Editota: **São Paulo: Pearson Education do Brasil, Makron Books**, v.1, 1994.
- SANO, H.; SHONO, T.; SONODA, H.; TAKATSU, T.; CIUCCHI, B.; CARVALHO, R. et al..Relationship between surface area for adhesion and tensile bond strength. Evaluation of a micro-tensile bond test. **Dental Materials**, v.10, p.236-240, 1994.

- SANO, H.; SHONO, T.; TAKATSU, T.; HOSODA, H. Microporous dentin zone beneath resin-impregnated layer. **Operative Dentistry**, v.19, p.59-64, 1994.
- SARDELLA, A.; MATEUS, E. Curso de Química: química geral. Editora: **Ática**, São Paulo/SP, 1995.
- SCHILKE R, LISSON JA, BAUB O, GEURTSSEN W. Comparison of the number and diameter of dentinal tubules in human and bovine dentine by scanning electron microscope investigation. **Archives Oral Biology**, v.45, p.355–361, 2000.
- SHROFF, F.R.; WILLIAMSON, K.I.; BERTAUD, W.S. Electron microscope studies of dentine. **Oral Surgery**, v.7, p.662–670, 1954.
- SHROFF, F.R.; WILLIAMSON, K.I.; BERTAUD, W.S.; HALL, D.M. Further electron microscope studies of dentine. **Oral Surgery**, v.9, 432–443, 1956.
- STANGEL, L.; SACHER, E.; ELLIS, T; BERTRAND, L. Chemical characterization of the resin-dentin interface by micro-Raman spectroscopy. **Journal of Dental Research**, v.73, p.584-585, 1994.
- TAKUMA, S. Electron microscopy of the structure around the dentinal tubule. **Journal of Dental Research**, v.39, p.973–981, 1960.
- TAKUMA, S.; EDA, S. Structure and development of peritubular matrix in dentin. **Journal Dental Research**, v.45, p.683–692, 1966.
- THOMAS, H.F.; CARELLA, P. Correlation of scanning and transmission electron microscopy of human dentinal tubules. **Archives Oral Biology**, v.29, n.8, p.641–646, 1984.
- TEIXEIRA, C.S.; FELIPPE, M.C.S.; FELIPPE, W.T. The effect of application time of EDTA and NaClO on intracanal smear layer removal: an SEM analysis. **International Endodontic Journal**; v.38, p.285–90, 2005.
- VAN MEERBEEK, B. et al. Comparative SEM and TEM examination of the ultrastructure of the resin-dentin interdiffusion zone. **Journal of Dental Research**, v.72, p.495-501, 1993.
- VAN MEERBEEK, B.; CONN, L.J.; DUKE, E.S.; EICK, J.D.; ROBINSON, S.J.; GUERRERO, D. Correlative transmission electron microscopy examination of nondemineralized and demineralized resin-dentin interfaces formed by two dentin adhesive systems. **Journal of Dental Research**, v.74, p.879-888, 1996.
- VAN MEERBEEK, B.; INIKOSHI, S.; BRAEM, M.; LAMBRECHTS, P.; VANHERLE, G. Mophological aspects of the resin-dentin interdiffusion zone with different adhesive systems. **Journal of Dental Research**, v.71, p.1530-1540, 1992.

WEGEHAUPT, F.; GRIES, D.; WIEGAND, A.; ATTIN, T. Is bovine dentine an appropriate substitute for human dentine in erosion/abrasion tests? **Journal of Oral Rehabilitation**, v.35 p.390–394, 2008.

YAMADA, T.; NAKAMURA, K.; IWAKU, M.; FUSAYAMA, T. The extent of the odontoblast process in normal and carious human dentin. **Journal Dentistry Res**, v.62, p.798-802, 1983.