

# **“ANÁLISE QUANTITATIVA DO CONTEÚDO MINERAL DO ESMALTE ATRAVÉS DE MICROTOMOGRAFIA SINCROTRÔNICA E MICRODUREZA KNOOP.”**

Márcia Regina do Espírito Santo, Alberto Carlos Botazzo Delbem, Ana Elisa de Mello Vieira, Kikue T. Sassaki, Mark Cannon, Stuart Stock, X. Xiao, Francesco DeCarlo. – **Sub-área** – Odontologia – Departamento de Odontologia Infantil e Social – Faculdade de Odontologia – Campus Araçatuba

Na última década, observou-se uma grande expansão da aplicabilidade da microtomografia (microCT) e do número de sistemas operando em diversos países. Uma análise da série “SPIE Developments in X-ray Tomography” mostra uma explosão de publicações sobre microCT após 2001.

A microtomografia utilizando radiação X apresenta as seguintes vantagens: por ser uma técnica não destrutiva, não há perda tecidual durante o seccionamento; precisos coeficientes de atenuação linear de tecidos mineralizados podem ser determinados com radiação monocromática; realização de estudos 3D; e monitoramento em tempo real de mudanças estruturais e de composição pode ser realizado, por exemplo, do efeito de processos químicos dinâmicos. (DAVIS; WONG, 1996)

O propósito do presente estudo foi a avaliação da microtomografia sincrotrônica e microdureza knoop para quantificar o conteúdo mineral de esmalte bovino.

Blocos de esmalte (4x4 mm) foram obtidos de dentes incisivos bovinos estocados em solução de formol a 2% neutra durante 30 dias em temperatura ambiente. Esses blocos tiveram sua superfície de esmalte polido seqüencialmente permitindo a seleção de blocos através da determinação da microdureza de superfície (SMH inicial). A microdureza de superfície foi determinada (SMH inicial) utilizando-se o microdurômetro Shimadzu HMV-2000, sob carga de 25 gramas por 10 segundos. Foram realizadas cinco indentações eqüidistantes entre si. O delineamento experimental foi casualizado e os blocos divididos em sete grupos experimentais de doze espécimes cada um, de acordo com a média de dureza da população total de blocos e seu intervalo de confiança ( $p < 0,05$ ). Os blocos foram submetidos individualmente durante sete dias a cinco ciclagens de pH, à temperatura de 37° C, permanecendo os últimos dois dias em solução remineralizante. (VIEIRA et al., 2005) O tratamento foi realizado duas vezes ao dia com dentífrício contendo 0 ppm (placebo), 275 ppm F, 550 ppm F, 1100 ppm F e Crest diluídos (1:3 – peso:peso) em água deionizada. Os blocos foram imersos sob agitação constante, durante um minuto, quando removidos das soluções desmineralizante (6 horas - Ca e P 2,0 mmol/L em tampão acetato 0,075 mol/L, 0,04 ppm F em pH 4,7 – 2,2 mL/mm<sup>2</sup>) e remineralizante (18 horas - Ca 1,5 mmol/L, P 0,9 mmol/L, KCl 0,15 mol/L em tampão cacodilato 0,02 mol/L, 0,05 ppm F em pH 7,0 – 1,1 mL/mm<sup>2</sup>). Os blocos foram lavados com jatos de água destilada/deionizada por 30 segundos, após remoção das soluções Des-Re e dentífrício/água deionizada.

Ao término, foi determinada novamente a SMH (SMH final) para cálculo da percentagem de variação da microdureza de superfície (%SMHC). Foram realizadas cinco indentações eqüidistantes entre si e, em relação à SMH inicial, 100 µm, sendo a percentagem de variação de microdureza de superfície (% SMHC) calculada [%SMHC = ((SMH final - SMH inicial)/ SMH inicial) x100].

Secções longitudinais foram feitas no centro dos blocos e uma das metades incluída em resina acrílica e polida. Uma seqüência de oito indentações a distâncias de 10, 30, 50, 70, 90, 110, 220 e 330 µm da superfície externa do esmalte foi realizada na região central dos blocos, e outras duas 100 µm acima e abaixo, sob carga de 15 gramas por 10 segundos. As médias foram calculadas em cada distância e os valores convertidos em conteúdo mineral (% vol. min.), de acordo com Featherstone et al. (1983). O cálculo da área integrada sob a curva (área formada entre os eixos “y”, “x” e curva do perfil de volume mineral), em percentagem de volume mineral x µm, foi obtido através da regra trapezoidal para os blocos tratados. A perda mineral (ΔZ), em % vol min x µm, foi obtida pela subtração da área integrada obtida para o bloco tratado daquela área integrada da projeção para o esmalte normal. (ARENDS; TEN BOSCH, 1992; ØGAARD et al., 1988; SULLIVAN et al., 1995)

A seguir, quatro blocos de cada grupo foram submetidos à microtomografia sincrotrônica. Foi utilizada radiação monocromática (20-27 KeV) e uma câmera CCD elemento 2K x 2K acoplada (via lentes AXIOPLAN®) a um cintilador CdWO<sub>4</sub> de único cristal. Os registros foram feitos a

cada 0,25° de 0° a 180° e normalizados quanto a não-uniformidades. Reconstrução foi realizada com 2,5 µm voxels isotrópicos.

Após captura, as imagens foram analisadas utilizando o Software Image J. Para tal, a imagem no formato RGB color foi convertida (barra de ferramenta: Image/type/8-bit) para 8-bit (grayscale). Foram ajustados brilho e contraste da imagem (barra de ferramenta: Image/adjust/Brightness/Contrast/auto), definição (barra de ferramenta: Process/Sharpen) e fundo (barra de ferramenta: Process/ subtract background/100/white background). O posicionamento da imagem foi corrigido, seu tamanho aumentado para 200% e uma área selecionada para análise (barra de ferramenta: Analyze/Plot Profile). Seis áreas foram analisadas em cada imagem, correspondendo uma profundidade de 330 µm. Valores voxels foram convertidos em conteúdo mineral (255 pixels = 100% do volume mineral). A área integrada foi calculada como descrito para a microdureza em secção longitudinal.

A média  $\pm$ dp da concentração de flúor total e iônico (µg F/g) nos dentifrício placebo, 275, 550, 1100 e Crest<sup>TM</sup> foram, respectivamente: 17,4  $\pm$ 3,3 e 17,2  $\pm$ 1,4, 235,9  $\pm$ 12,2 e 235,8  $\pm$ 9,6, 557,9  $\pm$ 21,3 e 558,2  $\pm$ 5,9, 1109,6  $\pm$ 31,4 e 1105,8  $\pm$ 11,1, 1223,8  $\pm$ 22,0 e 1235,0  $\pm$ 15,6. O valor médio da SMH inicial de todos os blocos foi 332,7  $\pm$ 5,1 e esta não apresentou diferença significativa entre os tratamentos ( $p > 0,05$ ).

O aumento na concentração de flúor nas soluções proporcionou uma menor perda mineral superficial (%SMH), na área mineral da lesão ( $\Delta Z$ ) em termos de microdureza interna e microtomografia sincrotrônica. A correlação de Pearson ( $p < 0,05$ ) foi utilizada para determinar a relação entre os diferentes métodos de análise e dose-resposta entre os tratamentos.

Observou-se correlação negativa entre concentração de flúor nos dentifrícios com os resultados de microdureza interna ( $r = -0,9861$ ;  $p = 0,00100$ ) e microtomografia sincrotrônica ( $r = -0,9802$ ;  $p = 0,0018$ ). Correlação positiva foi observada entre a concentração de flúor e %SMH ( $r = 0,9785$ ;  $p = 0,00280$ ). A análise entre as variáveis mostrou correlação positiva entre os dados de microdureza interna e microtomografia sincrotrônica ( $r = 0,9827$ ;  $p = 0,00080$ ). Correlação negativa foi encontrada entre %SMH quando comparada a microdureza interna ( $r = -0,9916$ ;  $p = 0,0000001$ ) e microtomografia sincrotrônica ( $r = -0,9827$ ;  $p = 0,0008$ ).

Os resultados deste estudo permitem concluir que a microtomografia sincrotrônica proporcionou a melhor resolução espacial para quantificação de gradientes minerais.

### Agradecimento

A utilização da Advanced Photon Source foi suportada pelo U. S. Department of Energy, Office of Science, Office of Basic Energy Sciences, sob contrato n. W-31-109-Eng-38.

### Referências

Arends J, Ten Bosch JJ: Demineralization and remineralization evaluation techniques. **J. Dent. Res.**, 1992;71:924-8.

Davis GR, wong FSL. X-ray microtomography of bones and teeth. **Physiol. Meas.**, 17(1996) 121-146.

Featherstone JDB, Ten Cate JM, Shariati M, Arends J. Comparison of artificial caries-like lesions by quantitative microradiography and microhardness profiles. **Caries Res.**, 1983;17(5):385-91.

Ögaard B, Rølla G, Arends J: *In vivo* progress of enamel and root surface lesions under plaque as a function of time. . **Caries Res.**, 1988;22:302-305.

Sullivan RJ, Fletcher R, Bachman R, Penugonda B, LeGeros RZ: Intra-oral comparison and evaluation of the ability of fluoride dentifrices to promote the mineralization of caries-like lesions in dentin and enamel. **J. Clin. Dent.**, 1995;6:135-138.

Vieira AEM, Delbem ACB, Sasaki KT, Rodrigues E, Cury JA, Cunha RF. Fluoride dose response in pH-cycling models using bovine enamel. **Caries Res.**, 2005; 39: 514-520.