

ANALIZA MICROSCOPICĂ MODERNĂ A INTERFEȚEI ȚESUT DUR DENTAR – MATERIALE DE RESTAURARE DIRECTĂ

Autori:

Prof.Dr. Ion PĂTRAȘCU*

Stud. Bogdan GĂLBINAȘU*

Dr. Lucian Toma CIOCAN*

Stud. Bogdan IORDACHE*

Ing. Florin MICULESCU**

Dr. Ing. Florin STOICIU***

*Catedra de Propedeutică și Materiale Dentare, Facultatea de Stomatologie, U.M.F. „Carol Davila”, București

** Catedra de Știința Materialelor, Facultatea de Inginerie și Știința Materialelor, Universitatea Politehnică, București

*** Institutul de Metale Neferoase și Rare, București

Rezumat:

Scopul acestui studiu a fost de evalua posibilitățile de investigare prin tehnici clasice și moderne a interfeței dintre structurile dure dentare și materialele de restaurare directă.

Clasic, în funcție de metoda de investigare, pentru a vizualiza și a oferi informații cu privire la o interfață, este necesară o prelucrare specifică a probei. De asemenea, pentru fiecare tip de analiză efectuată este necesară o nouă probă, diferită de cea etalon, ceea ce mărește numărul factorilor de eroare în interpretarea rezultatelor finale. Din acest motiv am încercat standardizarea unei metode de obținere și a unui protocol de analiză a probelor care să permită o evaluare corectă a interfeței dintre substratul dur dentar și materialul restaurativ.

Material și metodă. În studiu am utilizat 14 molari de minte extrași, integri, la care s-au preparat cavități de clasa I Black, folosind freze fine și extra fine la turație înaltă și convențională. Cavitățile au fost obturate cu diferite materiale restaurative coronare existente la ora aceasta pe piața românească. După înglobare în rășină acrilică, fiecare probă a fost prelucrată metalografic pentru a putea fi investigată prin microscopie optică (stereomicroscopie și microscopie de reflexie) cât și prin electronmicroscopie (ESEM).

Rezultate și concluzii. Fiecare probă a putut fi examinată prin diferite metode, graduale din punct de vedere al calității și cantității de informație, fără a fi necesare condiționări specifice ale suprafeței înainte de o anumită investigație. Prin metoda descrisă, interfața poate fi analizată amănunțit la orice nivel și prin diferite mijloace imagistice fără a suferi deteriorări datorate metodelor diferite de pregătire a probelor.

Cuvinte cheie: interfață, material restaurativ, țesut dur dentar, analiză calcografică, E.S.E.M.

MODERN MICROSCOPY ANALYSIS OF HARD DENTAL TISSUES– DIRECT RESTORATIVE MATERIAL INTERFACE

Abstract:

The aim of this study was to evaluate the investigation procedures of the interface between hard dental tissues and direct restorative materials using classical and modern techniques.

Usually, depending on investigation method, for an accurate analysis of an interface, it is necessary a special type of probe preparation. In the same time, every type of analysis implies one new sample, different from the standard one, determining in this way the development of possible intruding factors which will affect the results interpretation. For this reason, we tried to standardize the probe obtaining and analyzing method for an accurate evaluation of the interface between hard dental tissues and restorative materials.

Materials and methods. In our work, we were using 14 third molars subtracted from oral cavity, every of them supporting a 1st Black cavity preparation using fine and extra fine burs at normal and high speed rotation. The cavities were filled with different direct materials available on Romanian market nowadays. After investing in an acrylic resin, the probes were metallographical prepared, and then investigated by optical microscopy (stereomicroscopy and reflexion microscopy) and also by electron microscopy (ESEM).

Results. Conclusions.

Every probe could be examined by different methods, gradually from information quality and quantity point of view, without being necessary special preconditioned of the surfaces before the analyze. Using this method, the interface could be detailed investigated at any level by different imagistic devices without possible errors generated by different methods of probe preparation.

Key words: interface, restorative material, hard dental tissue, calcographical analysis, E.S.E.M.

ARGUMENTE

Consultând literatura de specialitate și realizând o documentație bibliografică amănunțită cu privire la etanșeitatea materialelor de restaurare directă față de țesuturile dure dentare coronare am constatat neconcordanța dintre datele publicate și posibilitățile imagistice actuale de investigare.

SCOPUL CERCETĂRII

Scopul acestui studiu a fost de evalua posibilitățile de investigare prin tehnici clasice și moderne a interfeței dintre structurile dure dentare și materialele de restaurare directă.

Clasic, în funcție de metoda de investigare, pentru a vizualiza și a oferi informații cu privire la o interfață, este necesară o prelucrare specifică a probei. De asemenea, pentru fiecare tip de analiză efectuată este necesară o nouă probă, diferită de cea etalon,

cea ce mărește numărul factorilor de eroare în interpretarea rezultatelor finale. Din acest motiv am încercat standardizarea unei metode de obținere și a unui protocol de analiză a probelor care să permită o evaluare corectă a interfeței dintre substratul dur dentar și materialul restaurativ.

MATERIAL ȘI METODĂ

În evaluare am utilizat 14 unități odontoane indemne de leziuni carioase la nivelul cărora s-au preparat cavități de clasa I Black cu profunzime medie (smalț și dentină) cu ajutorul frezelor fine și extra fine la turație înaltă și convențională. Cavitățile au fost obturate cu diferite materiale restaurative coronare existente la ora aceasta pe piața românească. Ca materiale restaurative au fost utilizate produsele unor firme consacrate atât din clasa amalgamelor de argint (VIVADENT-AmalCap), rășinilor diacrilice compozite (KERR-Herculite, VIVADENT-TetricCeram) cât și a cimenturilor ionomere de sticlă (3M-ESPE – KetacMolar, KetacCem) (vezi figura 1).



Fig. 1: Unități odontoane la care s-au preparat și obturate cavități Cls. I Black

Pentru studiul în lumină reflectată a fost necesar ca probele să fie fixate într-o matrice pentru a putea fi pregătite prin șlefuire și lustruire. Ca matrice s-a folosit o rășină amorfă de tip Citofix. După întărirea rășinii probele au fost șlefuite mecanic, folosind succesiv hârtii abrazive cu granule având dimensiuni descrescătoare (100 - 1000). Operația de lustruire finală s-a efectuat pe postav de tip Lecloth, folosind o suspensie de $\alpha\text{Al}_2\text{O}_3$, cu granule având dimensiuni de $0,3\ \mu\text{m}$.

Fiecare probă a fost prelucrată metalografic prin metoda descrisă pentru a putea fi investigată prin microscopie optică (stereomicroscopie și microscopie de reflexie) cât și prin electronmicroscopie (ESEM). (vezi figura 2)



Fig. 2: Probele pregătite pentru analiza graduală opto-electronică

DISCUȚIE

Metode moderne de analiză optică

Pentru a putea stabili indicațiile și limitele metodelor moderne de investigare imagistică optică și electronică considerăm necesară descrierea succintă a acestora.

Microscopul polarizant, față de un microscop obișnuit se deosebește prin faptul că este prevăzut cu un dispozitiv pentru producerea și analizarea luminii polarizate compus din doi nicoli sau polaroizi.

Determinarea constantelor optice ale substanțelor cristalizate se face prin studiul reacției cristalelor asupra luminii polarizate.

Primul dintre nicoli, polarizorul care este montat între sursa de lumină și proba de studiat, are rolul de a produce lumina polarizată. Cel de-al doilea nicol, analizorul, montat între proba de analizat (în tubul microscopului, deasupra obiectivului) și ocular permite analiza modificărilor suferite de razele de lumină după ce au străbătut proba.

Schema de principiu a unui microscop polarizant (vezi figura 3) este alcătuită din următoarele componente:

- aparatul de iluminat și produs lumină polarizată;
- masa sau platina microscopului, pe care se așează proba de studiat;
- tubul microscopului în care sunt montate aparatele de mărit și analizat imaginea probei;
- stativul pe care sunt montate piesele de mai sus.

Microscoapele moderne sunt echipate și cu dispozitive de studiu în lumină reflectată a mineralelor opace.

Studiul probelor transparente, în secțiuni subțiri, poate fi făcut în lumină paralelă (ortoscop) sau lumină convergentă (conoscop). În lumină paralelă se pot face observații cu un singur nicol sau cu nicoli încrucișați. În lumina convergentă se fac numai studii cu nicolii încrucișați.

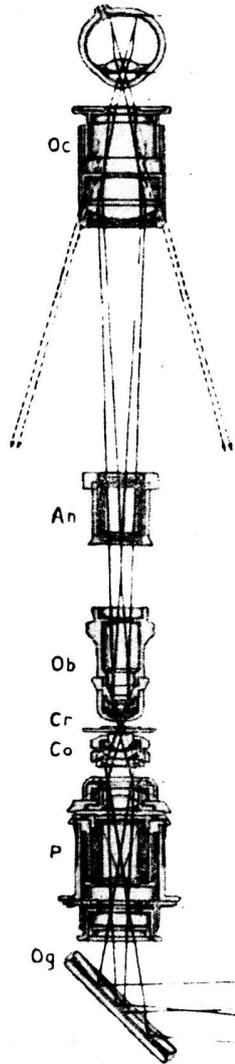


Fig. 3: Schema unui microscop polarizant (lumină transmisă);

Og - oglindă;
 P - polarizor (condensor);
 Co - lentile convergente;
 Cr - proba de analizat;
 Ob - obiectiv;
 An - analizor;
 Oc - ocular.

Studiul în lumină reflectată al probelor opace sub formă de secțiuni lustruite, se efectuează cu ajutorul *microscopului calcografic*.

Pentru studiul complet al unei substanțe organo-minerale (țesutul dur dentar) se folosesc microscopice ce pot fi folosite atât pentru studiile petrografice (în lumină transmisă) cât și pentru studiile calcografice (în lumină reflectată).

Un microscop petrografic ce poate fi folosit și pentru studiul în lumină reflectată are un dispozitiv numit opac iluminator.

Opac iluminatorul este dispozitivul cu ajutorul căruia se captează fasciculul de raze ale unei surse de lumină laterală, fascicul ce este dirijat descendent prin obiectiv spre secțiunea lustruită așezată pe platina microscopului. Opac iluminatorul este compus în principiu din: lentile convergente, diafragme (de profunzime și de câmp), nicol polarizor, nicol analizor și un dispozitiv ce deviază razele de lumină spre secțiunea lustruită. Acest

dispozitiv poate fi o lamelă de sticlă sau o prismă cu reflexie totală. Microscopul modern are atât lamelă de sticlă cât și prismă cu reflexie totală, acestea putând fi folosite alternativ în funcție de avantajele și dezavantajele fiecărui sistem. (vezi figura 4)

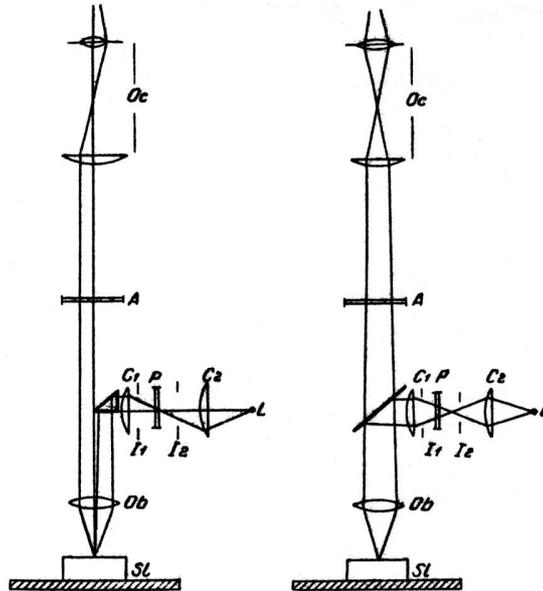


Fig. 4: Reprezentarea elementelor microscopului calcografic și a drumului razelor de lumină prin sistemul microscopic.

Oc - ocular; A - nicol analizor; C1 - lentilă colimator; I1 - diafragma de deschidere; P - nicol polarizor; I2 - diafragma de câmp; C2 - lentilă condensoare; Ob - obiectiv; S1 - secțiune lustruită; L - sursă de lumină.

În stânga reflectorul este o prismă ortogonală, în dreapta reflectorul este o lamă de sticlă.

Analiza calcografică a interfeței dintre țesuturile dure dentare și materialele de restaurare directă depinde de capacitatea de reflexie a celor două structuri.

Capacitatea de reflexie (R) sau puterea de reflexie se exprimă prin raportul dintre intensitatea luminii reflectate și incidenta pe suprafața lustruită a probei.

$$R = \frac{I_n}{I_i}$$

I_n - intensitatea luminii reflectate;

I_i - intensitatea luminii incidente.

Atât în cazul structurilor dure coronare cât și a materialelor de restaurare directă observațiile se fac în lumină plan polarizată. La aceste substanțe organo-minerale puterea de reflexie variază în funcție de orientarea cristalelor, astfel că există un indice minim R_1 (când între direcția de vibrație din cristal și direcția de vibrație a polarizorului unghiul

este 0°) și un indice R_2 maxim (când unghiul dintre direcțiile menționate mai sus este de 90°).

R_1 și R_2 se determină din relațiile:

$$R_1 = \frac{(n_1 - 1)^2 + k_1^2}{(n_1 + 1)^2 + k_1^2} \quad ; \quad R_2 = \frac{(n_2 - 1)^2 + k_2^2}{(n_2 + 1)^2 + k_2^2}$$

în care: k_1, k_2 - coeficienți de absorbție (minim și maxim);

n_1, n_2 - indici de refracție (minim și maxim);

R_1 și R_2 se numesc puteri de reflexie uniradiiale;

iar diferența $R = R_2 - R_1$ bireflexie, noțiune ce exprimă de fapt pleocroismul de reflexie.

Puterea de reflexie a acestor structuri mai este influențată și de lungimea de undă a luminii folosite.

Practic, la interfața dintre țesuturile dure dentare și materialele de restaurare directă coronară, puterea de reflexie a celor două structuri se poate aprecia calitativ și cantitativ.

Aprecierea calitativă, constă în compararea strălucirii materialului de restaurare studiat, cu strălucirea unui material etalon. Aprecierea se poate face direct, când structurile sunt secționate sub același unghi, deziderat destul de greu de atins pentru studiul prbelor biologice. Evaluarea ar fi posibilă cu ajutorul unui dispozitiv ce se montează pe două microscopie și care proiectează alăturat într-o singură imagine materialul studiat și materialul etalon.

Aprecierea cantitativă, se realizează cu ajutorul unei celule fotoelectrice sau cu ajutorul microfotometrului.

Determinarea cu ajutorul celulei fotoelectrice (determinare fotoelectrometrică) se realizează măsurând intensitatea curentului electric generat de celula fotoelectrică montată în ocularul microscopului.

Determinarea cu ajutorul microfotometrului (determinare microfotometrică) se bazează pe compararea intensității luminii reflectate de suprafața lustruită a probei cu intensitatea luminii captate direct de la sursa de lumină. Intensitatea luminii sursei este reglată la valoarea intensității luminii reflectate de structura etalon.

Măsurătorile se fac cu filtre de lumină colorate în roșu, portocaliu sau verde pentru a se putea compara valorile înregistrate cu valorile etalon.

Metode moderne de analiză electronică

Prin *analiza de tip SEM* se pot obține informații privind topografia, morfologia, microstructura și compoziția elementală a probelor examinate. Microscopie tradiționale SEM pot analiza un specimen doar în condițiile obținerii atmosferei de vid înaintat și dacă proba este conductivă din punct de vedere electric. De cele mai multe ori proprietățile materialelor biologice, organice și anorganice pot fi analizate doar utilizând metode complicate de preparare a probelor, pentru a putea satisface condițiile de lucru în vid înaintat. În afară de faptul că aceste metode de pregătire a probelor necesită mult timp și aparatură specială, pot modifica starea inițială a probei și pot induce artefacte care pot degrada calitatea imaginii, sau pot altera acuratețea analizei.

Limitările funcționale ale microscopelor de tip SEM sunt bine cunoscute. Spre exemplu, chiar și atunci când straturile de acoperire conductive permit obținerea

imaginilor, la materialele cu diferență de înălțime pe suprafața analizată, cum sunt interfețele și suprafețele rugoase, apar în mod frecvent zone de încărcare electrică pe ariile analizate.

În 1983 a fost introdus în producție detectorul de electroni secundari în mediu gazos. În figura 5 este prezentat schematic modul de funcționare al acestui detector: fasciculul de electroni pătrunde în camera probei cu o tensiune pozitivă de 300 V, trece prin gaz și atinge suprafața probei. La pătrunderea fascicolului în camera probei pot avea loc două evenimente: fascicolul poate trece neîmprăștiat prin mediul gazos sau se poate ciocni cu gazul din camera probei și poate ioniza moleculele acestuia înainte de a atinge suprafața probei.

În cazul ESEM-ului, pulverizarea unui gaz în camera probei asigură un mediu cu presiune ridicată, necesar obținerii imaginilor cu ajutorul detectorului GSED. În ESEM cel mai utilizat mediu este cel format de vaporii de apă, deoarece aceștia sunt ușor de ionizat și foarte ușor de procurat. Mai pot fi utilizate și gaze cum sunt azotul, argonul, dioxidul de carbon sau combinații ale acestora. Sub influența unui câmp de câteva sute de volți, electronii secundari și cei retroîmprăștiați sunt atrași către detector. În drumul către suprafața detectorului, electronii se ciocnesc cu moleculele de vaporii de apă, formând perechi electron-ion. Procesul de accelerare se repetă prin ciocniri succesive și ionizarea rezultată este amplificată proporțional în cascade, cu semnalul original al electronilor. Detectorul colectează și amplifică semnalul și recrează imaginea probei.

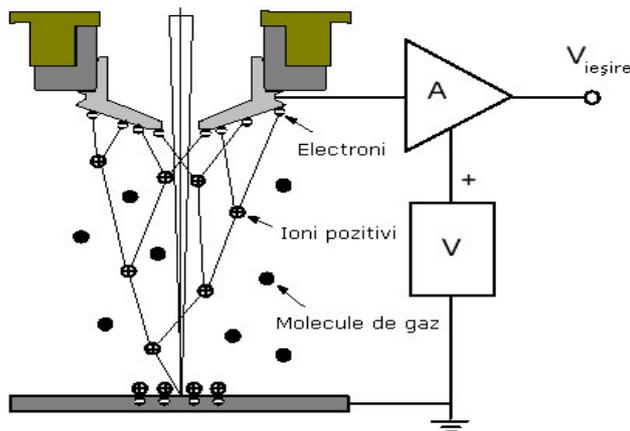


Fig. 5: Schema de principiu a detecției electronilor cu detectorul GSED

La concurență cu fasciculul ionizat, ionii pozitivi suportă o forță de respingere față de suprafața detectorului, care este încărcată pozitiv și o forță de atracție față de acumulara de sarcină negativă din suprafața probei. Acești ioni pozitivi se recombina cu excesul de sarcină negativă, prevenind astfel încărcarea electrică a suprafeței probei.

Creșterea presiunii în camera probei descrește timpul dintre ciocniri, ceea ce va conduce la formarea unei zone de electroni împrăștiați care va înconjura ceea ce a mai rămas din electronii neîmprăștiați. Această zonă, reprezentată schematic în figura 6, afectează rezoluția maximă tangibilă, prin crearea unei difuzibilități a imaginii în zona unde suprafața probei prezintă muchii mai ascuțite, reduce adâncimea de pătrundere a curentului fascicolului și posibilitatea impactului calitativ și cantitativ la investigațiile care folosesc microanaliza cu raze X.

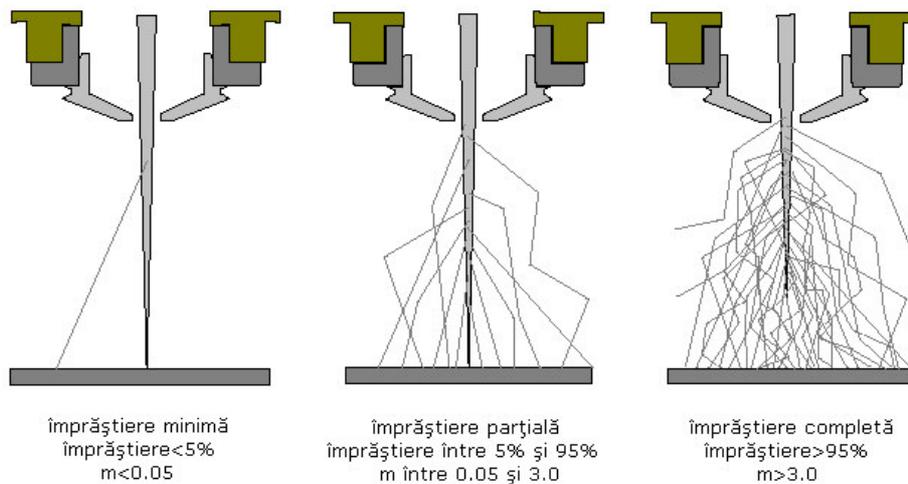


Fig. 6.: Reprezentarea tipurilor posibile de împrăștiere ale electronilor în camera probei

Rezoluția microscopului ESEM depinde de abilitatea de a focaliza fascicolul de electroni într-o zonă cât mai mică posibil pe suprafața probei. În camera de lucru a microscopului (figura 7), ciocnirea dintre fascicolul de electroni și gazul din cameră produce împrăștierea fascicolului.

Extinderea împrăștierii fascicolului odată cu apropierea de suprafața probei, se desfășoară în funcție de distanța dintre apertura finală și specimen, de compoziția gazului din camera probei, de presiunea acestuia, de tensiunea de accelerare și de curentul fascicolului.



Fig. 7: camera de lucru a electromicroscopului ESEM

REZULTATE

La analiza calcografică a probelor s-a observat apariția unei benzi întunecate la interfața dintre materialele de restaurare și țesutul dur dentar (vezi figura 8 *a, b, c*).

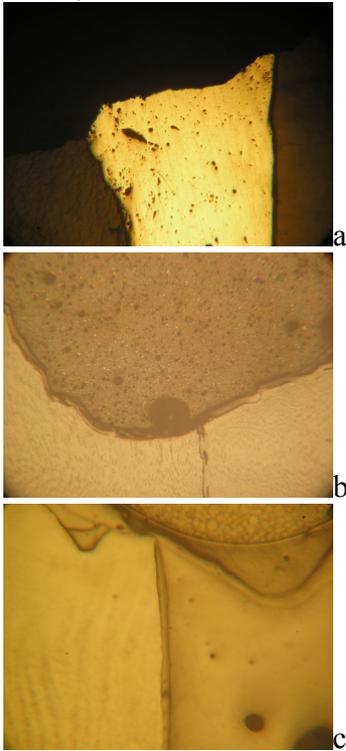


Fig. 8: Franje întunecate (Becke) apărute la interfața dintre țesuturile dure coronare și materialele de restaurare directă (a-amalgam de argint, b-ciment ionomer de sticlă, c-rășină diacrilică compozită)

Fenomenul optic generator al acestei benzi întunecate, denumit franjă Becke, apare datorită rezistenței la uzură diferite a celor două structuri. Prin șlefuirea și lustruirea unei probe multistructurale se obține o suprafață care numai aparent este plană. În realitate această suprafață prezintă un anumit relief format din plane paralele situate la o anumită distanță unul de altul.

Suprafețele de contact dintre structurile cu durități diferite sunt oblice față de axa optică a microscopului având unghiuri diferite. În funcție de aceste unghiuri, lumina incidentă pe suprafața probei va fi reflectată în mod diferit, putând apare mai multe situații, după cum urmează:

- o diferență netă de relief. În acest caz la interfață apare o franjă întunecată cauzată de eliminarea rezelor reflectate în afara câmpului vizual al microscopului;
- un relief identic. În acest caz limita dintre minerale se sesizează numai dacă sunt colorate diferit. Când nuanțele sunt foarte apropiate se fac observații cu nicoli încrucișați sau după condiționare cu reactivi specifici.

Pentru a remedia această deficiență de investigare imagistică, probele au fost condiționate cu soluție alcoolică de eozină 0,5% pentru 24 de ore. În figura 9 *a, b, c* se observă dispariția franjei întunecate cu posibilitatea de evaluare corectă a zonei de interfață la un ordin de magnitudine de 140.

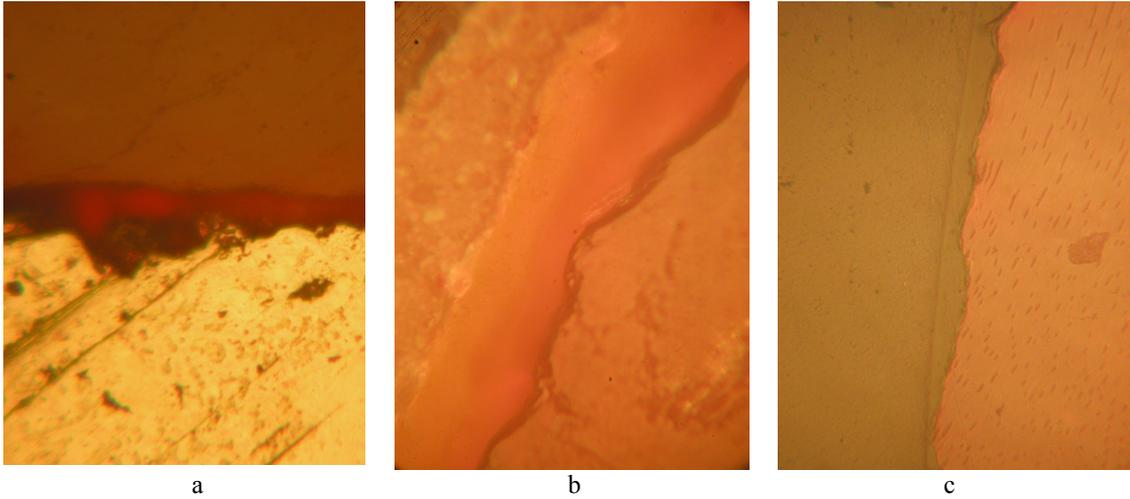


Fig. 9: Corectarea fenomenului Becke după condiționarea în soluție alcoolică de eozină 0,5%
 a-interfață amalgam de argint, b- interfață ciment ionomer de sticlă, c-intefață rășină compozită

Informațiile furnizate de microscopia calcografică pot fi augmentate prin investigarea electronmicroscopică ESEM la o mărire a zonei de interfață între x500-x1000. În figura 10 se poate observa etanșeitătea reală a zonelor examinate.

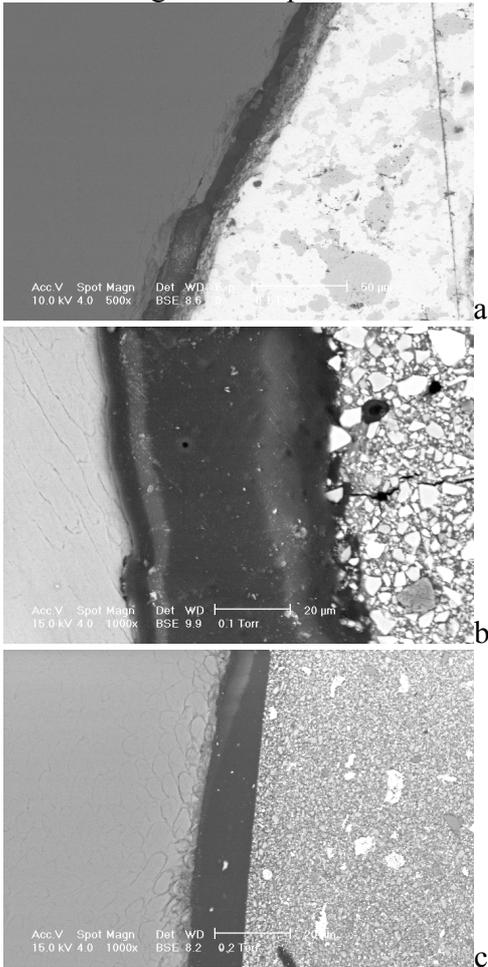


Fig. 10: Analiza ESEM a interfeței dintre țesuturile dure coronare și materialele de restaurare directă (a-amalgam de argint, b-ciment ionomer de sticlă, c-rășină diacrilică compozită)

CONCLUZII

Fiecare probă a putut fi examinată prin diferite metode moderne, atât optice calcografice cât și electronomicroscopice ESEM, graduale din punct de vedere al calității și cantității de informație, fără a fi necesare condiționări specifice ale suprafeței înainte de o anumită investigație. Prin metoda descrisă, interfața poate fi analizată amănunțit la orice nivel și prin diferite mijloace imagistice fără a suferi deteriorări datorate metodelor diferite de pregătire a probelor.

Avantajul evident al folosirii microscopului ESEM pentru caracterizarea structurilor biologice și a biomaterialelor îl reprezintă capacitatea acestuia de a obține rezultate imagistice și compoziționale de mare acuratețe cu o minimă pregătire a probelor, fără acoperiri conductive.

Caracterizarea ESEM se realizează prin metode imagistice, obținându-se informații privind morfologia și topografia suprafețelor probelor, dar și prin posibilitatea unei analize spectrale, rezultatele fiind utilizate pentru detalierea compoziției calitative și cantitative a acestor zone și pentru aflarea distribuției elementare, care poate furniza informații valoroase privind omogenitatea compozițională, adeziunea diferitelor materiale de restaurare directă coronară la țesuturile dure dentare și corelația dintre morfologia interfeței și compoziția chimică a stratului hibrid care se poate forma la acest nivel.

Bibliografie

- [1] Codarcea Al. – Mineralogie, vol.I, Cristalografia, Editura Didactică și Pedagogică, București, 1965
- [2] Craig R. G. – Restorative dental Materials, Mosby Inc., 1997;
- [3] Edward R. Prack - An introduction to process visualization capabilities and considerations in the environmental scanning electron microscope (ESEM) – Microscopy research and technique 25, 487-492 (1993);
- [4] Holger Schnarr, Manfred W. Futing - Some aspects of optimizing contrasts for the investigation of joint materials in the environmental scanning electron microscope – Scanning, Vol. 19, 79-84 81997);
- [5] Iosokawa S, Kubota K, Kuwajima K – Scanning electron microscope study of dentin exposed by contact facets and cervical abrasions, J Dent Res, 1973
- [6] J.C.P.D.S. – Powder Diffraction File, Search Manual, Swarthmore – U.S., 1976

- [7] O'Brien W. J. - Dental Materials, Properties and their Selection, Quintessence Publ., Chicago, 1989
- [8] Patrascu et colab. – Materiale Dentare, Ed. Horanda Press, București, 2002;
- [9] Phillips R. W. – Science of Dental Materials, 9th edition, W. B. Saunders Co., 1991;
- [10] Popescu, Gh. C. – Determinarea microscopică a mineralelor opace, Ed. Tehnică, București, 1971
- [11] Richard L. Schalek - Characterization of advanced materials using an Environmental SEM – Journal of advanced materials No. 6 (1999);
- [12] Richard Ray, Brenda Little, Patricia Wagner, Kevin Hart - Environmental scanning electron microscopy investigations of biodeterioration – Scanning Vol. 19, 98-103 (1997);
- [13] Todo A, Hirasawa M, Tosaki S, Hirota K – The surface roughness of glassionomer cement for restorative filling [abstract], J Dent Res 1996