

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI
“FEDERICO II”**



FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

Scuola di Dottorato in Medicina Clinica e Sperimentale

Dottorato in Scienze
Odontostomatologiche

TESI DI DOTTORATO IN ENDODONZIA

**Valutazione in vitro degli effetti della sterilizzazione e degli
irriganti canalari sugli strumenti rotanti al Nichel-Titanio con
Microscopia a Forza Atomica (AFM) e Microscopia
Elettronica a Scansione (SEM) con EDS**

RELATORE

Chiar.mo Prof. Sandro Rengo

CANDIDATO

Dott. Gianluca Ametrano

ANNI ACCADEMICI 2007-2010

INTRODUZIONE

CAPITOLO I

STRUMENTI ENDODONTICI AL NICHET-TITANIO, E LORO UTILIZZO NELLA PRATICA ENDODONTICA

Introduzione

1.1 Caratteristiche della lega al Nichel Titanio

1.1.1 Caratteristiche metallurgiche della lega

1.1.2 Lavoro degli strumenti rotanti al NiTi

1.2 Rivestimenti degli strumenti rotanti NiTi con Nitruro di Titanio (TiN)

1.3 Linee guida per l'utilizzo degli strumenti NiTi

1.4 Irriganti canalari

1.4.1 Soluzioni irriganti disinfettanti

1.4.2 Soluzioni irriganti chelanti

1.4.3 Tecnica di irrigazione

1.5 Sterilizzazione degli strumenti endodontici

CAPITOLO II

MICORSCOPIA A SCANSIONE DI SONDA (SPM)

Introduzione

2.1 Potere risolutivo dei sistemi ottici classici

2.2 Principi di funzionamento del Microscopio Elettronico a Scansione (SEM)

2.2.1 Microanalisi EDS (Energy Dispersive X-ray Spectroscopy)

2.3 Principi di funzionamento del Microscopio a Forza Atomica (AFM)

2.3.1 Cantiever, punta dell'AFM

2.3.2 Piezoelettrico di scansione

2.3.3 Motorino passo-passo

2.3.4 L'Elettronica

2.4 Rugosità superficiale

CAPITOLO III

EFFETTI DELL'IPOCLORITO DI SODIO E DELL'EDTA SUGLI STRUMENTI ROTANTI AL NICHEL-TITANIO VALUTATI CON L'AFM

3.1 Risultati

3.2 Discussione

CAPITOLO IV

4.1 Risultati, Analisi SEM con EDS

4.2 Discussione, Analisi SEM con EDS

4.3 Risultati, Analisi AFM

4.4 Discussioni, Analisi AFM

CONCLUSIONI

Introduzione

Nel XXI secolo, nell'era delle nanotecnologie, uno dei progetti più ambiziosi che ha suscitato un vivo interesse da parte della comunità scientifica è quello di cercare nuove tecniche d'indagine. L'interesse degli scienziati si è focalizzato soprattutto sulla ricerca di metodologie che potessero portare l'uomo verso l'abbattimento di quei limiti fisici che fin ad allora sembravano invalicabili. Tra questi, il *limite di diffrazione* di Abbe. Fino ai primi anni del '900 il limite fisico della diffrazione corrispondeva anche al limite di risoluzione dei microscopi ottici dell'epoca. La tenacia investigativa permise al fisico H. E. Synge da una corrispondenza con A. Einstein, a formulare una teoria innovativa e sensazionale sull'abbattimento dei limiti dell'ottica classica. Egli ipotizzò la realizzazione di un microscopio che utilizzasse un campo luminoso proveniente da una apertura di dimensioni più piccole della lunghezza d'onda della luce per illuminare una zona molto vicina di un campione da esaminare e successivamente raccogliere la luce riflessa o diffusa. Nonostante la brillante idea, le conoscenze tecniche dell'epoca non permisero a Synge di realizzare il primo microscopio in campo prossimo. Ci sono voluti molti anni prima che si potesse sancire l'inizio di una nuova era, dove le intuizioni di Synge potessero diventare realtà. Solo nel 1984, a distanza di molti anni dalla brillante intuizione, nei laboratori dell'IBM di Zurigo.

Grazie ai ricercatori Binnig e Rohrer, fu possibile costruire il primo microscopio a forza atomica AFM (*Atomic Force Microscopy*).

L'AFM era in grado di ottenere direttamente immagini tridimensionali (3D) di superfici solide con risoluzione atomica. Binnig e Rohrer ricevettero il Premio Nobel per la fisica nel 1986 per la loro scoperta. Questa lunga attesa andava attribuita alle difficoltà di costruzione di un sistema elettronico capace di riuscire a posizionare e mantenere una sonda a distanze minime dal campione, dell'ordine di decine di nanometri, tanto da sfruttare la forte localizzazione del campo. L'AFM lavora con forze di interazioni tra le superfici della punta e del campione dell'ordine di pochi μN . L'AFM fa parte della famiglia dei microscopi a scansione di sonda in grado di ricostruire, in tempo reale, l'immagine della topografia superficiale con potere risolutivo fino all'ordine del nanometro.

Per ottenere le immagini non utilizzano lenti, ma sensori costituiti da punte acuminate interagenti con la superficie del campione. Le principali differenze sono nella natura della sonda e nella corrispondente interazione con il campione. Il microscopio a forza atomica presenta diversi vantaggi rispetto al microscopio elettronico. L'AFM non richiede nessun trattamento speciale (metallizzazione) che potrebbe modificare o distruggere irrimediabilmente il campione. Recentemente, il microscopio a forze atomiche (AFM) è stato utilizzato come strumento di indagine per la valutazione su scala nanometrica delle superfici e delle interfacce dei biomateriali in maniera tridimensionale. L'AFM è stato recentemente introdotto per indagare anche le caratteristiche superficiali degli strumenti al Nichel Titanio nuovi ed usati. La fabbricazione dei primi strumenti endodontici risale al 1875, questi primi strumenti erano foggiate a mano da sottili fili di acciaio.

Negli anni c'è stato un notevole miglioramento di questi strumenti grazie alla standardizzazione meccanica e al progresso tecnologico. Nuovi materiali sono stati sperimentati nella costruzione dei file endodontici, quello che oggi è di maggior successo è il Nichel-Titanio. Gli strumenti al Nichel Titanio sono diventati sempre più popolari e di largo uso da parte di tutti gli operatori, grazie alle loro proprietà di superelasticità e di resistenza alla frattura torsionale, rispetto ai vecchi file in acciaio inossidabile.

I File al Nichel Titanio hanno permesso inoltre di abbattere quelli che erano i lunghi tempi della strumentazione unicamente manuale, permettendo un'ottimale sagomatura del sistema canalare. Per l'utilizzo sicuro degli strumenti al Nichel Titanio su manipolo moltiplicatore di giri è importante attenersi alle linee guida. Purtroppo anche seguendo scrupolosamente le linee guide nell'utilizzo dei file al Nichel Titanio, può accadere che ci siano delle fratture improvvisi e non giustificate. Questo può essere imputato principalmente a due motivi: il primo è che ci possono essere dei difetti di superficie accorsi durante il processo di macchinazione industriale. Questi difetti, non visibili ad occhio nudo, portano ad una improvvisa e ingiustificata frattura dello strumento in condizioni cliniche apparentemente prive di rischio. Il secondo è che i processi di pulizia e di sterilizzazione, insieme ai contatti che lo strumento ha con le soluzioni irriganti, come l'ipoclorito di Sodio (NaOCl) e l'acido etilendiaminotetracetico (EDTA), possono promuovere i processi di deterioramento e corrosione che portano inevitabilmente a influenzare negativamente le proprietà meccaniche dello strumento, portando ad indesiderabili fratture.

Si è arrivati a queste conclusioni grazie a differenti tecniche di analisi della superficie degli strumenti al Nichel Titanio. Una tecnica ampiamente usata negli anni per valutare le caratteristiche dei differenti tipi di materiali è stata la tecnica SEM. E' stata accettata dalla comunità scientifica come una metodica adeguata per la valutazione delle superfici degli strumenti al Nichel Titanio.

Dal punto di vista operativo, il progetto di ricerca si è svolto presso il laboratorio di materiali dentari del Dipartimento di Scienze Odontostomatologiche e Maxillo-facciali dell'Università di Napoli "Federico II". Lo studio di questo progetto di dottorato si è rivolto alla valutazione, utilizzando la microscopia a scansione (SEM e AFM), degli effetti delle soluzioni irriganti, come NaOCl e EDTA e dei cicli di sterilizzazione sulle superfici nano strutturale degli strumenti rotanti endodontici al Nichel Titanio.

La tesi è stata suddivisa nei seguenti capitoli:

- Nel primo capitolo sarà fatta una panoramica degli strumenti rotanti al Nichel Titanio, delle loro caratteristiche meccaniche illustrandone le potenzialità e i limiti, prestando particolare attenzione alle superfici degli strumenti
- Nel secondo capitolo sarà fornita una descrizione dei principi fisici che sono alla base del microscopio elettronico a scansione SEM e del microscopio a forza atomica AFM e una descrizione degli apparati sperimentali e del loro funzionamento.

- Nel terzo capitolo saranno riportate le misure di rugosità superficiale Ra e RMS misurate con microscopia AFM degli strumenti rotanti al Nichel-Titanio in vitro, nuovi e dopo essere stati immersi a tempi diversi in Ipoclorito ed EDTA.
- Nel quarto capitolo saranno riportate le immagini SEM con i rispettivi spettri a raggi X (EDS), e misure di rugosità superficiale Ra e RMS misurate con microscopia AFM di strumenti rotanti al Nichel-Titanio nuovi e dopo vari cicli di sterilizzazione in autoclave.

Capitolo I

Strumenti endodontici al Nichel-Titanio e loro utilizzo nella pratica endodontica.

Introduzione

Le costanti ricerche su nuovi metalli hanno portato e continuano a portare rilevanti cambiamenti nelle diverse branche della medicina. Nel campo biomedico, l'applicazione di un metallo appartenente alla famiglia delle leghe a memoria di forma ha reso possibile utilizzare un materiale più elastico rispetto agli altri metalli, molto flessibile e con la capacità di recuperare una forma macroscopica precedentemente impostata. La lega di cui parliamo, definita nichel-titanio (NiTi) per la sua composizione, sin dalla sua invenzione ha suscitato grande interesse in diversi settori.

La lega al Nichel-Titanio (NiTi) fu messa a punto all'inizio degli anni sessanta da W.H.Buehler in un programma spaziale della Naval Ordnance Laboratory a Silver Springs nel Maryland, USA. Tale lega fu introdotta in odontoiatria nel 1971 da Andreasen allo scopo di realizzare fili ortodontici. La notevole complessità del sistema metallurgico del NiTi ha costituito, per molti anni, un freno alla diffusione del materiale nel settore industriale.

A partire dalla metà degli anni '80 ed in particolare dal 1991 si è cominciata ad osservare una progressiva diffusione di questa lega in settori ad elevato valore aggiunto (aereo spaziale-biomedicale), pronti ad accettare prodotti innovativi, potendone assorbire più facilmente i costi elevati. Negli ultimi anni, l'aumento della disponibilità commerciale del nichel-titanio ha comportato la diminuzione dei costi di produzione della lega, determinando così le condizioni per una maggiore diffusione in settori tecnologici differenti. Le particolari qualità che la lega possiede hanno reso agevole il suo utilizzo in svariate applicazioni biomediche, che vanno dall'ortopedia, alla chirurgia, all'odontoiatria; in quest'ultimo settore il NiTi ha rivoluzionato il modo di affrontare i trattamenti, sia in ortodonzia che in ambito endodontico.

In particolare, i trattamenti endodontici che prima erano lunghi, affidati all'abilità del singolo operatore e quindi non sempre riproducibili, sono divenuti più rapidi, standardizzati e alla portata di tutti gli operatori. Ciò ha permesso agli endodontisti di eseguire trattamenti maggiormente prevedibili, per ottenere costantemente un'alta percentuale di successo e la manualità non è più significativa come in passato.

Un problema tuttavia irrisolto è il differente utilizzo degli strumenti rotanti in NiTi rispetto agli strumenti d'acciaio tradizionali. Molte domande sono poste ai relatori durante i corsi o ai congressi. A quale velocità si devono ruotare? Quante volte può essere utilizzato uno strumento? Quale pressione bisogna esercitare su di esso? Quale sequenza deve essere utilizzata nei canali curvi? E questi sono solo alcuni dei quesiti più frequenti.

Diverse tecniche e varie sistematiche sono state presentate con la promessa di ridurre o eliminare la frattura degli strumenti in NiTi durante la preparazione dei canali radicolari.

Queste tecniche troppo di frequente hanno preferito dare rigide istruzioni, regole e sequenze a scapito della comprensione dei reali meccanismi; troppo spesso hanno promosso prodotti invece di fissare i veri obiettivi, o hanno mostrato artefatte presentazioni a scapito della scientificità e della verità. E la conseguenza di tutto ciò è che l'odontoiatra finisce col rimanere sorpreso della frattura dello strumento anche se ha seguito pedissequamente le istruzioni fornitegli. È quindi indispensabile conoscere nei dettagli il comportamento della lega NiTi, studiare le caratteristiche principali delle diverse sistematiche oggi disponibili per cercare, se possibile, di ottenere i più vantaggiosi risultati. La progettazione di nuovi materiali e di nuovi strumenti dunque, deve passare inevitabilmente attraverso la comprensione di come funzionano quelli che usiamo già.

1.1 Caratteristiche della lega al Nichel Titanio

Memoria di Forma. Si definisce memoria di forma la capacità delle leghe in NiTi di riacquistare, dopo una deformazione, la forma iniziale mediante riscaldamento. Tale caratteristica è molto sfruttata in ortodonzia, per nulla in endodonzia.

Superelasticità. Si definisce *elasticità*: la proprietà dei corpi di deformarsi per azioni di forze esterne e di riprendere la forma primitiva al cessare di queste. Esiste però un limite definito “limite elastico”, oltre il quale si ha una componente di deformazione plastica che non può essere recuperata con l'eliminazione del carico esterno.

Se ad esempio si confrontano due fili di pari sezione, uno in acciaio ed uno in NiTi, si possono meglio comprendere le straordinarie capacità di superelasticità di quest'ultimo. Se si applica ad entrambi i fili un momento flettente di 80°, quello in acciaio subirà una deformazione angolare permanente di 60°, quello in NiTi una inferiore ai 5°.

Il filo al Nichel-Titanio subirà dunque una deformazione quasi interamente elastica residuando una minima deformazione permanente ¹. Questa caratteristica è particolarmente evidente quando noi proviamo a flettere, per esempio con un dito, due strumenti endodontici identici, uno in acciaio e l'altro in NiTi. Lo strumento endodontico in acciaio presenta un'elevata rigidità, mentre quello in NiTi risulta particolarmente cedevole (elastico). E' quindi particolarmente vantaggioso l'utilizzo di strumenti endodontici in NiTi per sagomare il sistema canalare in armonia con l'anatomia originale.

Resistenza. Vari autori hanno dimostrato che le lime in NiTi sono molto più resistenti alla torsione oraria ed antioraria rispetto alle lime di pari grandezza ma in acciaio ².

Questa elevata resistenza della lega NiTi ha permesso la realizzazione di strumenti rotanti che hanno notevolmente semplificato la sagomatura dei canali radicolari.

1.1.2 Caratteristiche metallurgiche della lega

La lega NiTi contiene circa il 56% (in peso) di Nichel e il 44% (in peso) di Titanio. In alcune leghe una piccola percentuale (maggiore del 2% in peso) di Nichel può essere sostituito dal Cobalto ³.

Ne risulta una lega con una distribuzione equiatomica dei due elementi principali: Nichel e Titanio. Questa lega si è dimostrata tra i materiali più biocompatibili e notevolmente più resistente alla corrosione ³.

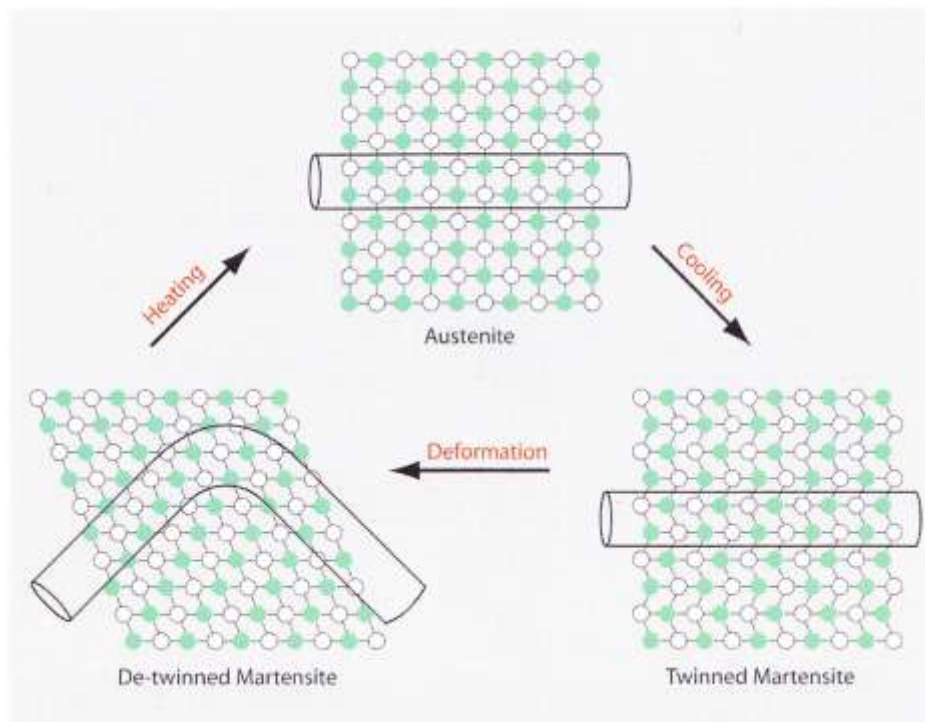


Figura 1.1 Illustrazione schematica della trasformazione martensitica e della memoria di forma degli strumenti NiTi (Thompson 2000)

Come visto in precedenza, il NiTi appartiene alla famiglia delle leghe intermetalliche, questo significa che tale lega può esistere in diverse forme cristallografiche, alle quali corrispondono tre fasi distinte con proprietà meccaniche diverse: austenitica, di trasformazione, martensitica ⁴ (Fig 1.1).

Descrivendo le singole fasi cristalline si ha:

- Fase Austenitica (A) : con reticolo cubico a corpo centrato. È la fase più stabile.
- Fase Martensitica (M): con reticolo esagonale compatto. È la fase più instabile e duttile.
- Fase di Trasformazione (T): è composta a sua volta da una serie di fasi intermedie che si trasformano l'una nell'altra determinando uno spostamento degli atomi di Ni e Ti su piani cristallini opposti e paralleli senza che ciò implichi una variazione di forma cristallografica.
- Ogni singola fase cristallina esiste in un limitato intervallo di temperature ⁴. La transizione da una fase all'altra è possibile solo all'interno di una gamma di temperature comprese tra quella iniziale e quella finale di trasformazione, come si vede anche nella (Fig 1.2).

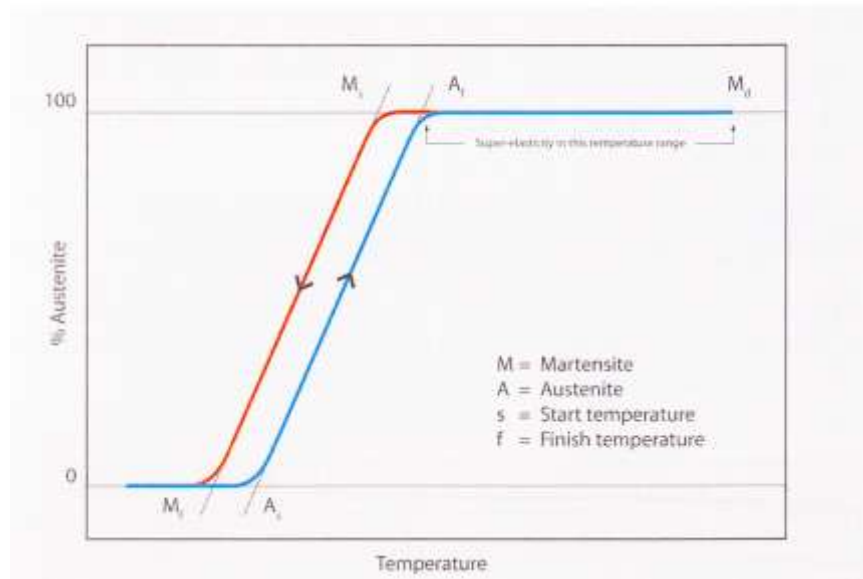


Figura 1.2 Isteresi della trasformazione martensitica (Thompson 2000). As: Temperatura di inizio trasformazione Austenitica. Af: Temperatura di fine trasformazione Austenitica. Ms: Temperatura di inizio trasformazione Martensitica. Mf: Temperatura di fine trasformazione Martensitica. Raffreddando la lega al di sotto della T.T.R. (transformation temperature range), oltre alla modifica cristallina, si ha anche un cambiamento delle sue proprietà fisiche con un aumento di duttilità (fase Martensitica). Riportando la temperatura al di sopra della TTR si ritorna alla fase più stabile energeticamente, con reticolo cubico a corpo centrato (fase Austenitica).

Tali cambiamenti di fase possono essere indotti anche dall'applicazione di stati di deformazione come avviene per gli strumenti endodontici al NiTi durante il loro lavoro all'interno dei canali radicolari ³.

La lega NiTi ha quindi un comportamento meccanico fortemente non lineare. Ciò significa che non c'è una corrispondenza proporzionale (lineare) tra tensioni e deformazioni.

Le leghe NiTi sono caratterizzate da un diagramma tensione-deformazione, diviso in tre distinte porzioni alle quali corrispondono le 3 fasi cristalline: austenitica, di trasformazione, martensitica (fig 1.3).

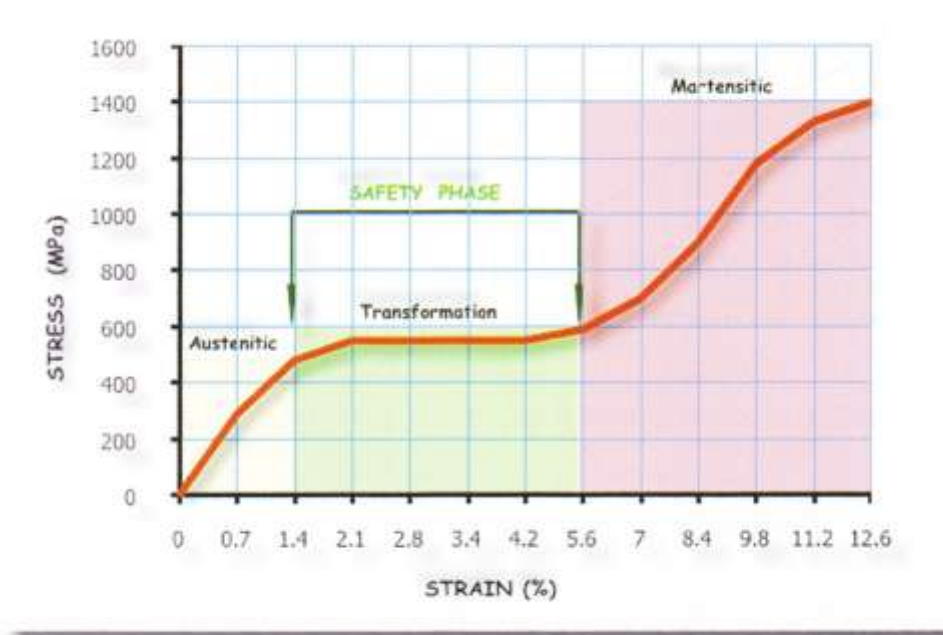


Figura 1.3 Fase di trasformazione degli strumenti NiTi

La fase più performante, per il lavoro degli strumenti endodontici rotanti in NiTi, corrisponde al secondo tratto del diagramma (Fase di Trasformazione) (Fig 1.3), in cui si ha il passaggio tra la fase cristallina più stabile di tipo Austenitico e la fase più instabile di tipo Martensitico, dove la lega presenta deformazioni importanti che culminano prima nello snervamento e poi nella rottura³. Nella fase di Trasformazione compare la caratteristica della superelasticità. Se osserviamo il diagramma (Fig1.3), vediamo come in questa fase le deformazioni possono crescere mentre le tensioni rimangono costanti. La lega può deformarsi in un range abbastanza ampio, mentre la fatica che accumula rimane costante.

Risulta intuitivo che più la lega lavora in questa fase più si fondono le caratteristiche di superelasticità e resistenza.

Lo strumento endodontico rotante NiTi potrà così sagomare il canale radicolare, seguendo l'anatomia canalare originale anche se complessa, senza raggiungere valori di tensione elevati.

1.1.3 Lavoro degli strumenti rotanti al NiTi

Se si analizza il lavoro degli strumenti rotanti al NiTi durante la sagomatura del sistema canalare, si vedrà che lo strumento rotante è soggetto continuamente a vari stati di tensione, responsabili della fatica (deterioramento). La fatica è un fenomeno meccanico. Un materiale sottoposto a carichi variabili nel tempo si danneggia fino a rottura, nonostante l'intensità massima dei carichi in questione sia sensibilmente inferiore a quella di rottura o di snervamento statico del materiale stesso. La fatica è determinata da due principali tipi di tensione:

Tensione torsionale: le tensioni torsionali sono molto deleterie e se di intensità elevate portano rapidamente lo strumento alla frattura.

Queste si verificano generalmente quando un'ampia superficie dello strumento friziona eccessivamente contro le pareti canalari (taper lock); se la punta dello strumento è più grande della sezione del canale da sagomare oppure se l'operatore esercita un'eccessiva pressione sul manipolo. A differenza delle tensioni flessionali, in gran parte dipendenti dall'anatomia originale del canale, e quindi difficilmente influenzabili, noi possiamo intervenire sulle tensioni torsionali riducendone in parte l'incidenza mediante un uso corretto degli strumenti.

Tensioni Flessionali: le tensioni flessionali sono le maggiori responsabili della fatica ⁶ e dipendono dall'anatomia originale del canale che, con le sue

curve, obbliga lo strumento a flettersi mentre lo percorre. Hanno dimostrato che il raggio di curvatura, l'angolo di curvatura e la grandezza dello strumento sono i fattori responsabili della fatica flessionale ¹¹. Uno strumento rotante NiTi fermo all'interno di un canale curvo, sarà sottoposto a due diversi tipi di tensione (Fig 1.4):

- tensione da compressione sulla superficie interna della curva
- tensione da trazione sulla superficie esterna della curva.



Figura 1.4 Tensioni flessionali: sul versante interno di uno strumento che ruota in un canale curvo si sviluppano tensioni da compressione, mentre sul versante esterno tensioni da trazione.

Nella parte centrale dello strumento esiste teoricamente un piano neutro dove non esistono tensioni. Questo piano neutro divide i due diversi tipi di sollecitazione. Le tensioni da trazione e compressione sono massime in corrispondenza della sezione con raggio di curvatura minimo, poi si riducono man mano ci si allontana dalla zona di massima sollecitazione (fig. 1.5).



Figura 1.5 Nello strumento rotante NiTi che ruota in un canale curvo le tensioni da trazione e compressione sono massime in corrispondenza della sezione dello strumento dove il raggio di curvatura è minimo.

Pertanto nello strumento in movimento (rotazione continua) tutte le tensioni sopra descritte cambieranno continuamente ad ogni rivoluzione ⁷. Si avrà un continuo passaggio da trazione a compressione, da compressione a trazione, in altre parole la lega sarà sottoposta continuamente a sollecitazioni di segno opposto. Da ciò, l'importanza di non fermare mai all'interno di un canale curvo lo strumento in movimento ⁶.

1.2 Rivestimento degli strumenti rotanti NiTi con Nitruro di Titanio (TiN)

Con l'avvento dei nuovi strumenti in Nichel Titanio, i quali hanno portato notevole migliorie nei piani di trattamento endodontico, ma come abbiamo visto ne precedente paragrafo , questi files durante la sagomatura del sistema canalare, sono soggetti ripetutamente a varistati di tensione responsabili della fatica (deterioramento).

Il materiale sottoposto a carichi variabili nel tempo si danneggia fino a rottura. Quindi, negli anni si è cercato di trovare qualche tecnica di lavorazione degli strumenti NiTi affinché non perdesse le loro peculiarità che li aveva contraddistinti nella pratica endodontica, ma ne guadagnassero in resistenza e duttilità. Alcune case produttrici hanno focalizzata la loro attenzione sul rivestire i files con un coating di nitruro di titanio tecnica diffusa già da anni nel campo aerospaziale e militare e successivamente nel settore biomedico.

Il nitruro di titanio, TiN, è un composto binario tra titanio e azoto. È un materiale ceramico estremamente duro usato per ricoprire leghe di titanio, acciaio, carburi e componenti di alluminio per migliorare le proprietà superficiali dell'oggetto. Tipicamente il nitruro di titanio ha una stechiometria vicina a 1:1 e una struttura cristallina tipo NaCl. Sono però noti e stabili termodinamicamente anche composti TiN_x con x compreso tra 0,6 e 1,2. Il TiN si ossida all'aria a 600 °C. I rivestimenti di TiN hanno un colore simile all'oro. A seconda del substrato e della finitura superficiale, il TiN ha un coefficiente di attrito compreso tra 0,4 e 0,6 rispetto a sè stesso (senza lubrificanti). La durezza dei rivestimenti di TiN è difficile da misurare, dato che i rivestimenti sono molto duri e quando sono molto sottili il test di durezza finisce col penetrare il substrato.

TiN non è tossico ed è stato utilizzato in strumentazione medica come lame di bisturi e seghe per uso ortopedico, dove sono importanti l'affilatura e la sua durata ⁴. Questi rivestimenti sono applicati o per crescita reattiva (ad esempio, per ricottura del pezzo di titanio in atmosfera di azoto) o per deposizione fisica da vapore, con uno spessore di circa 3 micrometri.

Rivestimenti più spessi sono meno resistenti all'uso perché tendono a staccarsi. I metodi più comuni per preparare film sottili di TiN sono la deposizione fisica da vapore (PVD) e la deposizione chimica da vapore (CVD). In entrambi i metodi si fa sublimare titanio puro sotto vuoto ad alta temperatura, e quindi lo si fa reagire con l'azoto. La tecnica PVD è preferibile per pezzi in acciaio perché la temperatura di deposizione è al di sopra della temperatura di austenizzazione dell'acciaio. Ricoperture di TiN con la tecnica PVD si usano anche per vari materiali con punto di fusione relativamente elevato come l'acciaio inossidabile, il titanio e le sue leghe. Alcune case produttrici di questo tipo di strumenti sostengono che i files NiTi con coating di TiN arginano il fenomeno della corrosione con il contatto con gli irriganti canalari e l'affaticamento da sterilizzazione ripetuta.

1.3 Linee guida per l'utilizzo degli strumenti al Nichel Titanio

L'utilizzo degli strumenti rotanti al Nichel Titanio non è immune da rischi. Tra questi potremmo nominare la frattura di un file in un canale, la creazione di una perforazione o di una falsa strada. Per diminuire il rischio di tali inconvenienti, è buona norma seguire alcune linee guida:

ACCESSO RETTILINEO: è di importanza fondamentale preparare una cavità di accesso tale che garantisca un accesso rettilineo verso gli orifizi canalari ⁸.

IRRIGAZIONE E LUBRIFICAZIONE: Nessuno strumento deve essere introdotto nello spazio canalare fino a che non è stato introdotto nella camera il giusto irrigante. Con polpa vitale sarebbe ideale un chelante viscoso. Se la polpa è necrotica, una soluzione riscaldata di ipoclorito di sodio al 5,25%. Per rendere sicuro l'uso degli strumenti rotanti al Nichel Titanio è sempre fondamentale il loro utilizzo in presenza di un irrigante lubrificante, in maniera da ridurre la frizione fra lo strumento e le pareti canalari e raggiungere l'obiettivo della sagomatura ⁵.

PERVIETA' CANALARE RIPRODUCIBILE: devono essere utilizzati strumenti piccoli, flessibili, in acciaio, con conicità 0,02, per creare o confermare la sondabilità. Inoltre queste lime forniscono informazioni riguardo l'accesso rettilineo, i diametri trasversi e l'anatomia del sistema canalare ⁹.

LUNGHEZZA DI LAVORO: bisogna sempre tenere presente la lunghezza di lavoro, definita come la distanza tra un repere coronale e il limite radiografico apicale del canale ⁹.

MOTORI: esistono manipoli dedicati che hanno il "torque control" e con un numero di 250/300 giri al minuto.

1.4 Irriganti canalari

Lo scopo della detersione è quello di rimuovere dall'interno del sistema radicolare tutto il materiale intracanalare, sia esso di origine pulpare, vitale o necrotico, sia esso costituito da microrganismi. La famiglia degli irriganti si può dividere in due gruppi: disinfettanti e chelanti.

1.4.1 Soluzioni irriganti disinfettanti

Come già accennato precedentemente, gli strumenti non devono lavorare mai in un canale asciutto, ma sempre completamente immersi nelle soluzioni irriganti che devono riempire interamente la camera pulpare e i canali radicolari. La soluzione irrigante oggi universalmente più usata che risponde alla maggior parte dei requisiti richiesti è l'ipoclorito di sodio (NaOCl).



Questi è in grado di sciogliere le sostanze organiche e quindi i residui di polpa, la qual cosa è facilmente documentabile se si prende un tiranervi con residui pulpari intorno e lo si immerge in una soluzione di ipoclorito di sodio. La sua azione solvente è certa sui tessuti necrotici e sui frammenti pulpari che hanno perso il loro apporto sanguigno, ma è dubbia invece nei confronti dei tessuti vitali. Nei confronti dei batteri Gram +, Gram – e spore si è dimostrato un potente battericida, inoltre può essere utilizzato per sterilizzare i coni di guttaperca nella fase di otturazione tramite immersione di questi per un minuto. Si è visto inoltre che aumentandone la temperatura, aumenta anche le sue capacità germicide. Tale irrigante possiede una bassa tensione superficiale ed è quindi in grado di arrivare a detergere zone non raggiungibili dagli strumenti come canali laterali, riassorbimenti, depressioni, anfrattuosità dello spazio endodontico, compreso il delta apicale. Non è quindi necessario spingerlo con forza all'interno del canale, perché è in grado di arrivare passivamente in profondità del canale, aiutato in questo anche dall'azione degli strumenti canalari. In questa maniera fornisce una lubrificazione continua all'azione degli strumenti canalari, e ne facilita il lavoro favorendone l'introduzione anche in canali sottili e tortuosi. Diminuisce così il rischio di frattura. Inoltre la lubrificazione insieme alla bassa tensione superficiale permette di mantenere in sospensione i residui dentinali evitando l'intasamento dell'apice. L'azione degli strumenti rotanti produce un'abbondante limatura dentinale che deve essere tenuta sotto controllo da parte dell'operatore attraverso dei continui rinnovi della soluzione irrigante. Questo evita che i residui dentinali precipitino e intasino il delta apicale. Tuttavia l'ipoclorito di sodio è citotossico, se spinto oltre apice. D'altra parte è inerte sui tessuti sani, soprattutto se cheratinizzati.

Il suo uso è relativamente innocuo sia per il paziente che per l'operatore. Per il primo, in caso di contatto in cavo orale, basterà sciacquare la bocca del paziente con la siringa aria acqua per eliminare lo sgradevole sapore. Per il secondo, il contatto con le mani è assolutamente innocuo. Andrebbe comunque evitata, nei limiti del possibile, una sua estrusione oltre apice che potrebbe essere causa di infiammazione anche molto severa e di danni (parestesie) permanenti date le sue caratteristiche di agente ipertonico, caustico, irritante. Concludendo, l'ipoclorito di sodio al 5,6% non è altro che la comune varichina del commercio (ACE), si intuisce dunque la facile reperibilità e l'economicità di tale soluzione.

1.4.2 Soluzioni irriganti chelanti

L'utilizzo dei chelanti in Endodonzia è suggerito dalla capacità di queste soluzioni di legarsi chimicamente allo ione Ca^{++} e quindi alla possibilità di ammorbidire la dentina. La sostanza più utilizzata a questo scopo è l'acido etilendiaminotetracetico (EDTA) che combinandosi con gli ioni Ca^{++} dei cristalli di idrossiapatite si trasforma nel sale etilendiaminotetracetato di calcio.



L' EDTA fu introdotto in Endodonzia per la prima volta da Nygaard-Ostby nel 1957 per facilitare la preparazione dei canali radicolari, in particolar modo in quelli stretti e curvi. Tali sostanze possono essere tranquillamente usate in canali stretti e tortuosi solo dopo che essi sono stati completamente sondati: a questo punto il chelante facilita l'azione dello strumento nella rimozione della dentina intorno a sé. È invece da sconsigliare il loro uso nei canali che risultano insondabili per la presenza di calcificazioni o ostacoli di qualsiasi natura. Infatti, lo strumento si fa strada nella dentina ammorbidita dal chelante. L'operatore non può sapere se sta strumentando il canale originale o se sta "costruendo" un canale nuovo, cioè una falsa strada. L'uso del chelante è inoltre raccomandato da molti autori per rimuovere lo strato di fango dentinale, smear layer, il quale rimane spalmato sulla superficie endodontica alla fine della strumentazione. Tale strato occlude i tubuli dentinali e ne diminuisce la permeabilità, inoltre essendo costituito da materiale inorganico non può essere digerito dall'ipoclorito di sodio. L'uso del chelante è inoltre inibito dalla presenza dell'ipoclorito di sodio e di questo si dovrà tenere conto durante il suo uso all'interno del canale .

1.4.3. Tecnica di irrigazione

L' ago della siringa deve essere il più sottile possibile e deve essere introdotto nel canale il più profondamente possibile, in maniera tale da rinnovare la soluzione irrigante più apicale.

Una volta che l'ago è stato introdotto nel canale lo si estrae leggermente in maniera da essere certi che non si impegni contro le pareti. Per maggiore sicurezza si potrebbero effettuare dei movimenti corono apicali durante l'irrigazione. La pressione di irrigazione deve essere minima ed il liquido deve fuoriuscire quasi passivamente.

1.5 Sterilizzazione degli strumenti endodontici

Gli strumenti dopo essere stati usati nella pratica endodontica devono essere sterilizzati, affinché possano essere riutilizzati. Gli strumenti canalari, le frese, la strumentazione chirurgica, di conservativa, protesica, ortodontica vengono lavati eliminando la soluzione disinfettante attraverso due fasi.

- una fase di lavaggio manuale
- una fase di lavaggio automatica (utilizzando apparecchi ad ultrasuoni)

Prima di essere lavati, nella fase automatica è importante che gli strumenti vengano imbustati. Un buon confezionamento è fondamentale al fine di mantenere la sterilità del materiale fino al momento dell'utilizzo. Vengono utilizzate a tal scopo sigillatrici termiche di ultima generazione. Una volta aperte le confezioni, lo o gli strumenti da usare, devono essere impiegati nel minor tempo possibile. Se uno o più strumenti non vengono utilizzati, devono essere considerati ugualmente contaminati e quindi sottoposti nuovamente al processo di sterilizzazione.

È il momento più importante di tutto il processo in quanto permette a tutti gli strumenti di essere perfettamente esenti da ogni tipo di microorganismo patogeno, ivi comprese le spore. Viene effettuata in autoclavi di classe B a vapore saturo. Queste apparecchiature sono programmate secondo i requisiti imposti dal Comitato Europeo di Normalizzazione. Viene controllata la stampante, presente in ogni autoclave, che collegata al sistema di valutazione del processo, controlla in automatico i fattori essenziali che assicurano la sterilizzazione. Questo sistema è quindi in grado di segnalare all'operatore eventuali specifiche anomalie del processo dell'autoclave. Oltre alla lettura del report ad ogni sterilizzazione, la garanzia dell'avvenuto processo è anche data dalla presenza, su tutte le confezioni degli strumenti, di un indicatore chimico che vira di colore, come indicato dal produttore della confezione stessa, se il processo è avvenuto correttamente. Purtroppo anche i processi di sterilizzazione influiscono e aumentano la percentuale di deterioramento dello strumento, aumentando così il rischio di frattura.

Riferimenti Bibliografici

- ¹ Inan U., Gonulol N. Deformation and Fracture of Mtwo Rotary Nickel-Titanium Instruments After Clinical Use. *J Endod.* 2009;35:1396-9.
- ² Bahia MG, Martins RC, Gonzalez BM, Buono VT. Physical and mechanical characterization and the influence of cyclic loading on the behaviour of nickel-titanium wires employed in the manufacture of rotary endodontic instruments. *Int Endod J.* 2005;38:795-801.
- ³ Thomsons SA. An overview of nickel-titanium alloys used in dentistry. *Int Endod J* 2000;33:297-310
- ⁴ Peña J, Solano E, Mendoza A, Casals J, Planell JA, Gil FJ. Effect of the M(s) transformation temperature on the wear behaviour of NiTi shape memory alloys for articular prosthesis *Biomed Mater Eng.* 2005;15:289-93.
- ⁵ Ruddle CJ. The ProTaper endodontic system: geometries, features, and guidelines for use. *Dent Today* 2001;20:60-67
- ⁶ Pruett JP, Clement DJ, Carnes DL. Cyclic fatigue testing of nickel-titanium endodontic instruments. *J Endod* 1997;23:77– 85
- ⁷ Sattapan B, Nervo GJ, Palamara JE, Messer HH. Defects in rotary nickel-titanium files after clinical use *J Endod* 2000 Mar;26:161-5.
- ⁸ Schilder H.: Corso teorico-pratico di endodonzia di base. *Isinago. Firenze, 1988*
- ⁹ Ruddle CJ. The ProTaper endodontic system: geometries, features, and guidelines for use. *Dent Today* 2001;20:60-

Capitolo II

Microscopia a scansione di sonda (SPM)

In questo capitolo introdurremo le nozioni dei microscopi a scansione a sonda, gli SPM; prestando particolare attenzione al microscopio SEM (Scanning Electrical Microscopy) e al microscopio AFM (Atomic Force Microscopy). Illustreremo il loro funzionamento nel dettaglio e da quali leggi fisiche sono governati. Ed infine, illustreremo i protocolli in vitro di trattamento dei Files; sia immersi in NaOCl e EDTA, sia sterilizzati più volte con vari cicli di autoclave.

Introduzione

I microscopi a scansione di sonda SPM (Scanning Probe Microscopy) studiano le proprietà superficiali di campioni attraverso un'interazione di tipo fisico tra sonda e superficie. I microscopi SPM hanno rappresentato una rivoluzione nella scienza delle analisi di superfici dei materiali, e hanno trovato in seguito, una vasta applicazione utilizzando tecniche diverse: la litografia, la nanoscrittura e la costruzione di attuatori nanometrici, ritagliandosi negli ultimi anni un ruolo fondamentale per lo studio di materiali micro e nano strutturati, nella scienza delle superfici.

Nei microscopi ottici, come s'è visto, il limite fisico all'ingrandimento utile di una immagine è rappresentato dal potere di risoluzione, che a sua volta dipende dalla lunghezza d'onda della luce. Non troveremo nessuna utilità ad ingrandire una immagine se la nitidezza dei particolari ingranditi non cresce di pari passo. Utilizzando una fonte di illuminazione monocromatica violetta ($\lambda = 400 \text{ nm}$) ed un sistema ottico nelle migliori condizioni possibili il limite di risoluzione raggiunto è di circa 170 nm ; anche utilizzando lenti al quarzo e radiazioni ultraviolette (con una lunghezza d'onda fra 200 e 300 nm) si riesce a portare il potere di risoluzione al massimo fino a 100 nm , $0,1 \mu\text{m}$, scontrandoci col problema di visualizzare un'immagine prodotta con una luce non visibile all'occhio umano e dannosa. La luce visibile, ricordiamo, è solo una porzione del vasto spettro di frequenze delle radiazioni elettromagnetiche; il limite del potere di risoluzione può, quindi, essere aggirato utilizzando radiazioni (non visibili) di lunghezze d'onda più piccole. Il problema è che queste radiazioni non possono essere visualizzate direttamente dai nostri occhi, e necessitano di sistemi completamente diversi per essere utilmente focalizzate. A questo scopo sono stati ideati e realizzati il microscopio elettronico a trasmissione (TEM) e quello a scansione (SEM), nei quali la radiazione elettromagnetica utilizzata è rappresentata da un fascio di elettroni accelerato nel vuoto. Il potere di risoluzione nel microscopio elettronico dipende dagli stessi fattori che influenzano il microscopio ottico: lunghezza d'onda della radiazione ed apertura numerica degli obiettivi. Le ottiche nel microscopio elettronico sono costituite da campi elettromagnetici: il fascio di elettroni nell'attraversare questi campi viene deflesso e focalizzato nella maniera voluta.

Le ottiche elettromagnetiche risentono anch'esse dei difetti visti per quelle fabbricate in vetro, ma il grado di correzione non è così perfetto, e le aperture numeriche risultano basse. Grazie all'elevatissima frequenza del fascio di elettroni il potere di risoluzione del microscopio elettronico risulta enorme, con un limite teorico pari a circa 2 \AA . Anche se la risoluzione ottenibile con i campioni biologici non è quella teorica, una risoluzione 10 volte peggiore, pari a circa 20 \AA consente comunque di utilizzare ingrandimenti spinti fino a $10000x$ e più, mentre il microscopio ottico ci forniva la possibilità di vedere distinti due punti distanti fra loro $0,2 \mu\text{m}$ circa ed ingrandimenti massimi di circa $1000x$. Anche il microscopio a forza atomica (AFM, Atomic Force Microscopy) utilizza una sottile sonda che viene fatta scorrere lungo la superficie da analizzare; in questo caso, però, vengono rilevate le leggere forze attrattive e repulsive generate dall'interazione fra la sonda e gli atomi del campione. I leggeri spostamenti della sonda stessa dovuti a queste forze vengono rilevati attraverso un raggio laser che consente di rilevare i movimenti. Uno dei benefici di questo sistema sta nel fatto che possono essere "lette" anche superfici elettricamente non conduttive, a differenza del microscopio SEM. Questo consente l'analisi di campioni biologici non trattati. La microscopia AFM (Atomic Force Microscopy) nasce storicamente nel 1984 nei laboratori di ricerca dell'IBM di Zurigo grazie al lavoro dei ricercatori Binnig e Rohrer i quali crearono il primo strumento in grado di ottenere direttamente tridimensionale (3-D) immagini di superfici solide con risoluzione atomica ¹. Binnig e Rohrer ricevettero il Premio Nobel per la fisica nel 1986 per la loro scoperta.

Questa lunga attesa andava attribuita alle difficoltà di costruzione di un sistema elettronico capace di riuscire a posizionare e mantenere una sonda a distanze minime dal campione, dell'ordine di decine di nanometri, tanto da sfruttare la forte localizzazione del campo.

L'AFM lavora con forze di interazioni tra le superfici della punta e del campione dell'ordine di pochi μN .

Il microscopio a forza atomica può essere utilizzato per la misurazione di tutte le superfici sia elettricamente conduttive che isolanti. L'AFM consente oltre che misurazioni topografiche anche misurazioni di forza d'attrito (FFM)³⁻⁸. Un certo numero di ricercatori hanno continuato a migliorare la AFM/FFM, utilizzati per misurare l'adesione e l'attrito delle superfici solide e liquide su scala nanometrica^{2,9-22}. Ma oggi l'AFM viene utilizzato, sfruttando le proprietà elastiche della leva, anche per misurazioni di proprietà meccaniche degli elementi^{2,7,8,13,15,18-21,23-28}. Questo strumento è estremamente duttile, infatti, può essere utilizzato in qualsiasi ambiente come aria^{29,30}, vari gas^{8,9}, liquidi³¹⁻³³, vuoto^{1,34}, a basse temperature (inferiore a circa 100 K)^{8,35-39} e alte temperature^{8,40,41}. L'Imaging in liquido permette di studiare in ambiente biologico. La produzione commerciale di SPM è iniziata con l'STM nel 1987 e poi è proseguita con la AFM nel 1989 dalla Digital Instruments Inc.

2.1 Potere risolutivo dei sistemi ottici classici

Fino al XIX secolo, i limiti tecnologici nella costruzione delle lenti e le aberrazioni sferiche e cromatiche costituivano i fattori limitanti ai fini della “bontà” delle immagini. Con il progresso della tecnologia, ci si è resi conto che proprio i fenomeni di *diffrazione* impongono un limite assoluto alle prestazioni di qualsiasi sistema ottico.

La *diffrazione* ⁴² è un fenomeno tipico della natura ondulatoria della luce; essa si manifesta, in particolare quando un fascio di luce viene deviato da un ostacolo (o un'apertura) di dimensioni confrontabili o minori della lunghezza d'onda sicché non vale più la legge di propagazione rettilinea in un mezzo omogeneo dell'ottica geometrica (Fig. 2.1).

La diffrazione si manifesta quando un fronte d'onda viene “intercettato”, quindi deformato da ostacoli e aperture. In tal caso solo una parte del fronte d'onda è in grado di produrre onde secondarie la cui sovrapposizione, secondo il principio di Huygens, determinerà la propagazione successiva delle onde. L'onda originaria interferendo con se stessa, causerà una sovrapposizione delle perturbazioni originate da una distribuzione continua di sorgenti coerenti. L'energia luminosa si distribuisce in zone dello spazio dando luogo a seconda dei casi a *frange*, *anelli di diffrazione*, o in generale a *figure di diffrazione*.

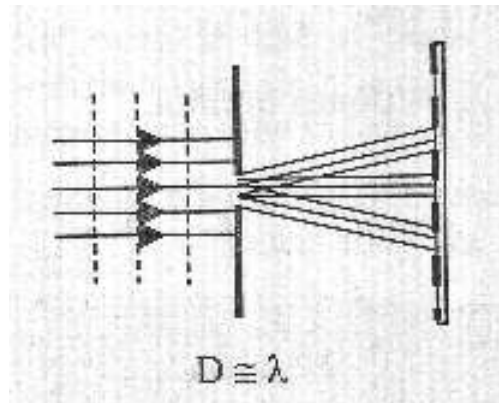


Figura 2.1: Fenomeno di diffrazione con radiazione di lunghezza d'onda confrontabile con le dimensioni dell'apertura

Ci occuperemo dettagliatamente della diffrazione di un'apertura circolare di diametro D (Fig. 2.2), giacché molti sistemi e strumenti ottici, tra i quali, quello utilizzato per questo specifico progetto di tesi, hanno componenti con i bordi a forma circolare;

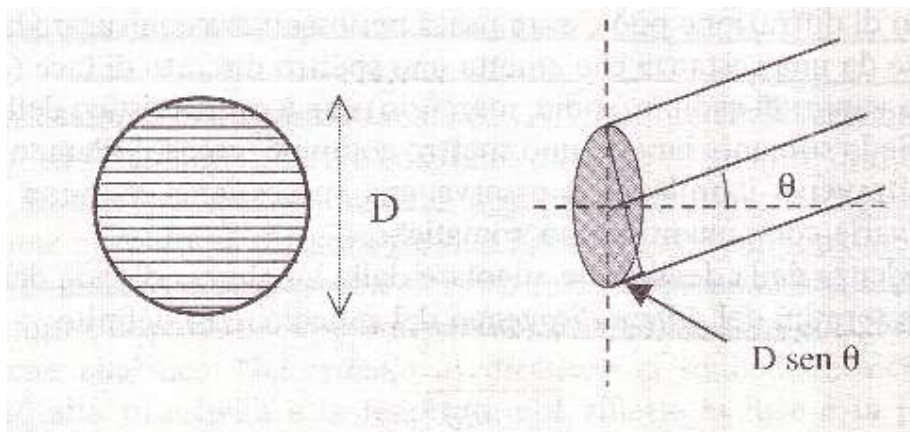


Figura 2.2: Diffrazione di una apertura circolare di diametro D

in tutti questi casi la capacità di distinguere i dettagli dipende in modo cruciale dal fenomeno di diffrazione. La trattazione formale porta al risultato, trovato per la prima volta da Gorge Airy nel 1835 (*formula di Airy*) applicando la formula di Kirchhoff:

$$I(\theta) = 4I_0 \frac{J_1(\alpha)}{\alpha^2} \quad (2.1)$$

dove $I_0 = I_{\max}$, $\alpha = \frac{\pi D \sin\theta}{\lambda}$ e $J_1(\alpha)$ è la *funzione di Bessel* di ordine 1.

Di grande importanza è il primo zero della funzione $J_1(\alpha)$, che è anche uno zero per I . Esso si ha per la condizione $\alpha = \alpha_1$:

$$\alpha_1 = 1,22\pi \quad \Leftrightarrow \quad \sin\theta_1 = 1,22 \frac{\lambda}{D} \quad (2.2)$$

Per i microscopi è importante distinguere sono i dettagli di due oggetti piccoli e vicini. Occorre quindi trovare la distanza minima $\delta_{\min}(\Delta x)$ che deve esistere fra due punti affinché essi possano essere percepiti come distinti (Fig. 2.3).

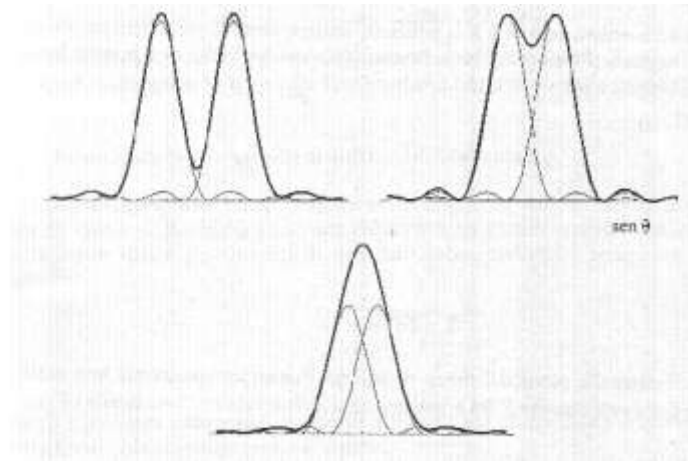


Figura 2.3: Differenti separazioni tra due massimi centrali.

Come conseguenza del criterio di Rayleigh, due punti oggetto distanti δ saranno distinguibili se i due punti immagine disteranno almeno δ'_{\min} pari al raggio del disco di Airy:

$$\delta'_{\min} = R_A = 1,22 \frac{\lambda_0}{2n' \text{sen} \alpha'} \quad (2.3)$$

Tuttavia, per essere in grado di produrre immagini nitide di punti molto vicine all'asse, l'obiettivo sarà quello di assumere valida la relazione dei seni:

$$n \delta_{\min} \text{sen} \alpha = n' \delta'_{\min} \text{sen} \alpha' \quad (2.4)$$

In questo caso risulta:

$$\delta_{\min} = 1,22 \frac{\lambda_0}{2n \operatorname{sen} \alpha} \quad (2.5)$$

dove abbiamo supposto che l'oggetto si trovi in un mezzo di indice di rifrazione n , mentre l'immagine si forma in aria per cui $n' \cong 1$ (Fig. 2.4). La quantità $1/\delta_{\min}$ si chiama *potere risolutivo del microscopio* e si può esprimere in termini di *apertura numerica* dell'obiettivo $NA = n \operatorname{sen} \alpha$:

$$\delta_{\min} = 0,61 \frac{\lambda}{NA} \quad (2.6)$$

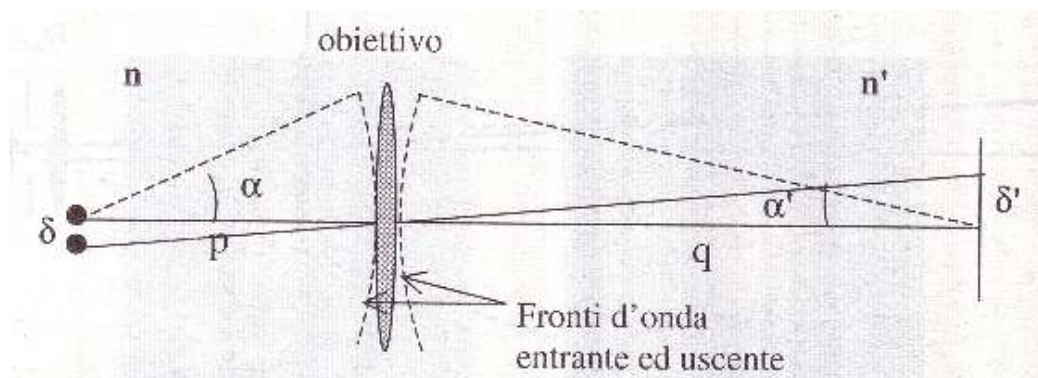


Figura 2.4: Schema del potere risolutivo di un microscopio

I migliori microscopi hanno una apertura numerica $NA=1,45$; quindi se illuminassimo l'oggetto con luce di lunghezza d'onda $\lambda = 400nm$ (nel blu) il potere risolutivo sarà: $\delta_{\min} \approx \lambda/2$, approssimativamente si evince che $\delta_{\min} \approx 200nm$. Il termine discusso può essere considerato in termini della meccanica quantistica.

In accordo con il *principio di indeterminazione* di *Hisenberg*, per ciascuna delle componenti (x_i) della posizione di un fotone e del suo momento coniugato (p_i) risulterà essere:

$$\Delta x_i \cdot |p_i| \geq \hbar \quad (2.7)$$

Dal momento che ciascuna componente p_i è legata alla rispettiva componente k_i del vettore d'onda della relazione: $p_i = \hbar k_i$, possiamo scrivere la relazione (2.7) come:

$$\Delta x_i \geq \hbar / |k_i| \quad (2.8)$$

Il possibile valore della componente del vettore d'onda della luce è limitata dalla condizione matematica:

$$k^2 = \sum_{i \in (x,y,z)} k_i^2 \quad (2.9)$$

La microscopia classica sfrutta il principio dell'ottica classica, cioè un'onda libera si propaga con tutte le componenti k_i del vettore d'onda reali:

$$|k_i| \leq |k| = \frac{2\pi}{\lambda} \quad (2.10)$$

le relazioni (2.8) e (2.10) fissano allora il limite per la migliore risoluzione ottenibile a \square . Nel progetto di tesi, dimostreremo, che sfruttando il metodo di nanolitografia, sarà possibile creare strutture su campioni polimerici fotosensibili, con microscopia SNOM, con risoluzione comparabile o inferiore al limite di diffrazione.

2.2 Principi di funzionamento del Microscopio Elettrico a Scansione (SEM)

Il Microscopio Elettronico a Scansione (SEM) è uno strumento elettro-ottico che permette, in seguito all'emissione di un fascio di elettroni, di analizzare i vari segnali prodotti dall'interazione degli elettroni del fascio con il campione in esame. L'elaborazione di questi segnali consente di ottenere un'ampia gamma di informazioni non solo morfologiche, ma anche compositive e strutturali relative alle varie parti di cui è costituito il campione.

Il SEM, infatti, pur essendo nato con una vocazione di microscopio ad elevata risoluzione e tridimensionalità, negli ultimi anni si è rivelato assai efficace anche nell'analisi della composizione chimica e dell'orientazione cristallografica di un campione, permettendo analisi puntuali e areali, sia qualitative che quantitative.

L'estrema versatilità di questo strumento è inoltre garantita dalla varietà tipologica dei campioni che possono essere analizzati, sia per quanto riguarda la loro natura (solo materiali contenenti fluidi non sono analizzabili) che la loro forma e dimensioni (di qualunque forma, fino a circa un decimetro cubo), nonché per la facile preparazione dei campioni stessi, che, qualora non siano naturalmente conduttivi (metalli), devono solo essere ricoperti da un sottilissimo strato di un elemento conduttore (grafite o oro).

Il SEM è costituito da un cannone elettronico, dove viene creato il fascio di elettroni, una camera da vuoto, dove viene posto il campione da esaminare interagendo con il fascio elettronico.

Vari tipi di rivelatori acquisiscono i segnali dell'interazione fascio-campione e li trasferiscono agli elaboratori ed in fine uno schermo, in cui si ricostruisce l'immagine del segnale (Fig. 2.5). Come si vede dalla figura 2.5 la sorgente elettronica in cima alla colonna genera il fascio elettronico, mediante un filamento (comunemente di tungsteno) che, portato ad elevata temperatura, produce elettroni per effetto termoionico. Gli elettroni vengono quindi fatti accelerare ad energia tra alcune centinaia ed alcune decine di migliaia di eV (in genere da 200 eV a 30 keV) grazie ad un anodo posto sotto il filamento. Il fascio che emerge dalla sorgente è divergente, ma viene fatto riconvergere ed è focalizzato da una serie di lenti elettromagnetiche e di fenditure all'interno della colonna.

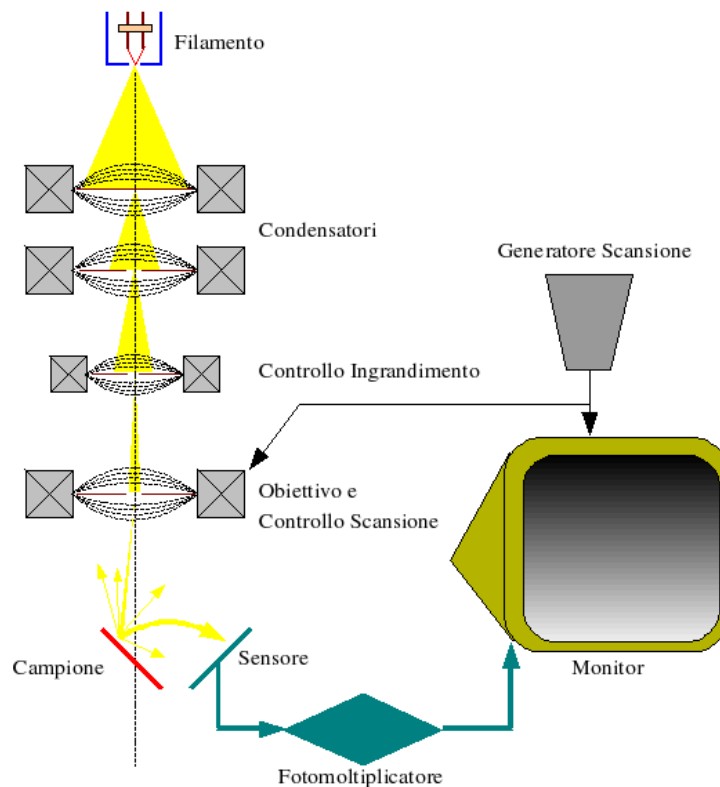


Figura 2.5 Schema generale del SEM.

All'estremità inferiore della colonna, una serie di bobine di scansione deflette il fascio fornendogli un movimento alternato lungo linee parallele ed equidistanti, in modo che, una volta raggiunta la superficie del campione, vada a ricoprirne un'area predefinita. Il fascio, infine, focalizzato dalla lente finale, esce dalla colonna e va a colpire il campione all'interno della camera da vuoto. Come gli elettroni del fascio penetrano all'interno del campione, essi perdono energia, che viene riemessa dal campione sotto varie forme. Ogni tipo di emissione è potenzialmente un segnale dal quale creare un'immagine. Dall'istante in cui il fascio elettronico colpisce la superficie del campione gli elettroni del fascio iniziano ad interagire con i nuclei e le nuvole elettroniche degli atomi di cui è costituito il campione, attraverso due meccanismi principali: diffusione elastica e diffusione anelastica.

Il risultato di questi processi è la produzione di una notevole varietà di segnali: elettroni secondari, elettroni retrodiffusi, elettroni assorbiti, elettroni trasmessi, elettroni Auger, coppie elettrone-lacuna, radiazione elettromagnetica (nello spettro UV-IR) e radiazione X. La regione del campione da cui si originano i segnali di interazione con il fascio e da cui questi escono per venire rivelati è chiamata volume di interazione (Fig. 2.6). La forma e le dimensioni di tale volume dipendono dalle caratteristiche del fascio incidente e dalla composizione del campione e, in molti casi, risultano più estese del diametro del fascio determinando così il limite di risoluzione, che nel caso del microscopio utilizzato è di 50Å.

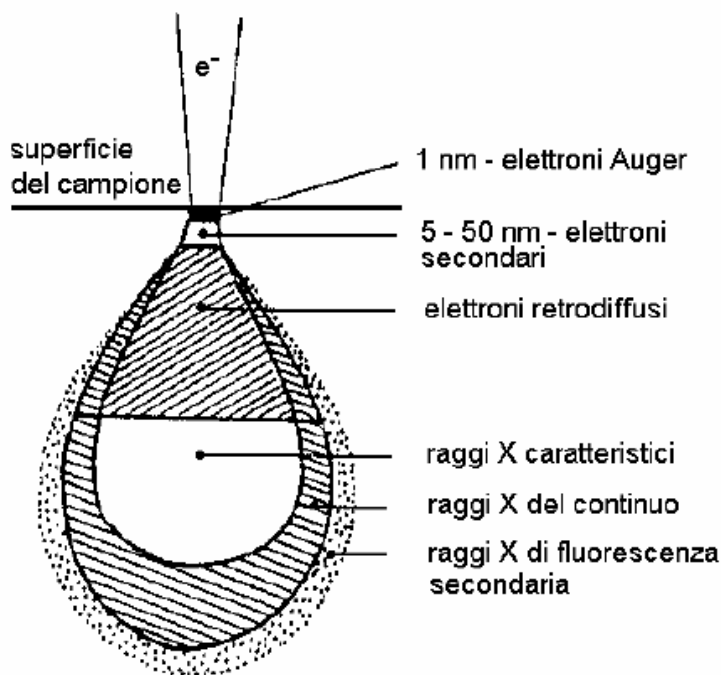


Figura 2.6 Zone del campione in cui si originano alcuni tipi di segnale prodotti dall'interazione fascio-campione.

A differenza del microscopio ottico, che fornisce un'immagine reale del preparato in esame, il SEM, grazie alla scansione del fascio elettronico, restituisce un'immagine virtuale a partire dai segnali emessi dal campione. La scansione infatti consente al fascio di colpire la superficie del campione linea per linea, fino a coprire l'area da esaminare, e i segnali così generati variano di intensità, punto per punto, in funzione delle anisotropie morfologiche, chimiche e strutturali del campione. Tali segnali vengono raccolti dagli appositi rivelatori e da analogici sono poi convertiti in segnali digitali per poter essere elaborati in maniera opportuna. Per visualizzare i segnali in un'immagine attraverso uno schermo a tubo catodico (CRT), la deflessione del fascio avviene in sincronia con il pennello del CRT, che è modulato con l'intensità del segnale.

In questo modo il sistema riporta il segnale punto per punto sul monitor, facendo corrispondere ad ogni punto un pixel, creando così l'immagine.

Ad eccezione di poche operazioni che possono essere compiute anche meccanicamente dall'operatore (ad es.: movimento del campione) il controllo dello strumento è completamente automatizzato ed avviene attraverso alcuni software specifici installati su diversi computer.

Le più intuitive tra queste operazioni riguardano direttamente il campione: il suo posizionamento, quindi il suo movimento laterale e verticale, la sua messa a fuoco e la scelta dell'ingrandimento da utilizzare. Altre funzioni fondamentali riguardano invece il fascio elettronico, che può essere adeguatamente configurato a seconda del tipo di analisi da effettuare.

I parametri che possono essere modificati sono sostanzialmente due: l'accelerazione (agendo sulla differenza di potenziale, variabile da alcune centinaia di Volt a 30kV) e il diametro finale o spot-size (che può variare da circa un micron ad alcuni micron, intervenendo sulle lenti elettromagnetiche).

2.2.1 Microanalisi EDS (Energy Dispersive Xray Spectroscopy)

Con il microscopio elettronico a scansione SEM oltre lo studio delle caratteristiche morfologiche di oggetti tridimensionali è possibile con la microanalisi a raggi X è quella di ottenere un'analisi chimica puntuale di un oggetto in esame, quindi la radiazione X non fornisce un'immagine legata ad un contrasto topografico dell'area interessata dalla scansione.

L'immagine risultante sarà uno spettro di Raggi X (Fig. 2.7) da cui si può risalire alla composizione chimica del materiale analizzato, dal momento che ogni picco dello spettro è riconducibile ad una ben precisa specie atomica.

La radiazione X deriva dalla ionizzazione dell'atomo nelle orbite più interne da parte del fascio incidente. Un elettrone primario può espellere un elettrone dell'orbita K, L o M dell'atomo, perdendo allo stesso tempo, per diffusione anelastica, l'energia E_K , E_L , E_M , corrispondente all'orbita dell'elettrone con cui ha interagito. L'atomo ionizzato potrà riacquisire la stabilità scendendo a livelli energetici inferiori, sia mediante l'occupazione della lacuna da parte di elettroni più esterni, con concomitante emissione del fotone X corrispondente, sia mediante l'emissione di un altro elettrone che ha assorbito l'energia appena liberata (elettrone Auger).

Le radiazioni X così emesse sono caratteristiche dell'atomo che le hanno prodotte e ne consentono il riconoscimento. Poiché il bombardamento elettronico genera non solo lo spettro caratteristico, ma anche uno spettro continuo (radiazione di fondo), dovuto all'interazione fra gli elettroni primari e i nuclei degli atomi.

E' necessario far uso di opportuni sistemi di rivelazione (spettrometro EDS-*Energy Dispersive X-ray Spectroscopy*) che permettano di analizzare e separare le diverse energie delle radiazioni, per poterne poi fare una misura, da cui infine sarà possibile ricavare la composizione del campione.

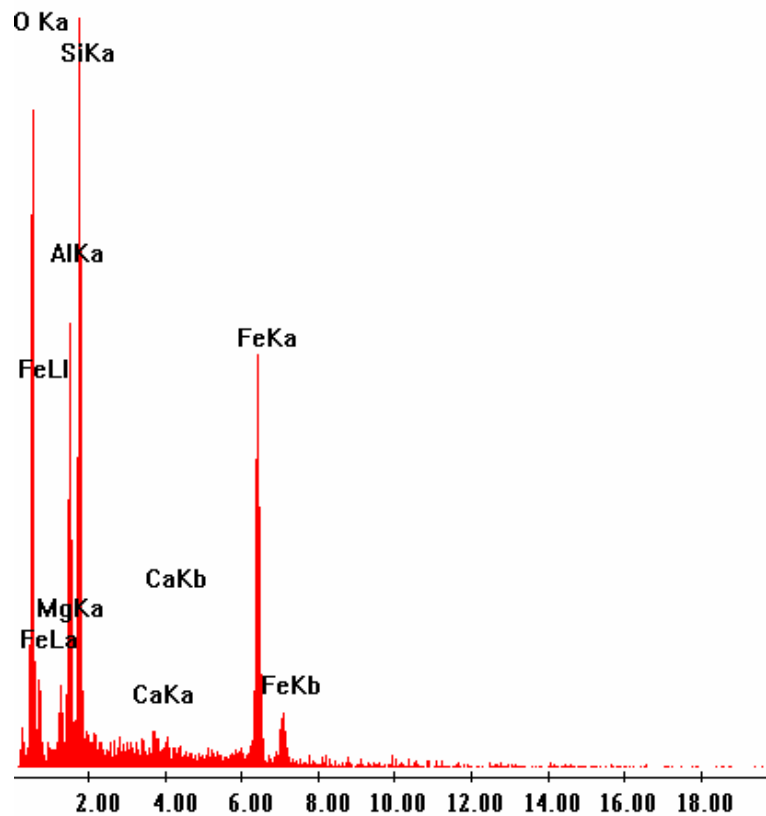


Figura 2.7 Spettro di Raggi X in cui i vari picchi identificano le diverse specie atomiche di cui è costituito il punto analizzato del campione

Esiste inoltre la possibilità di acquisire la radiazione X anche permettendo al fascio elettronico un movimento di scansione su un'area. In questo caso la radiazione, raccolta dallo spettrometro punto per punto e opportunamente restituita al CRT, fornisce una mappa della distribuzione per ogni elemento chimico considerato sotto forma di immagine (a toni di colore) dell'area esaminata (Fig. 2.8). Nella mappa così visualizzata l'intensità della radiazione X, e quindi la concentrazione dell'elemento, è proporzionale alla luminosità del punto riprodotto sullo schermo.

Quindi la variazione della concentrazione dell'elemento chimico corrisponde alla variazione delle intensità di colore, risultando più chiare le aree più ricche nell'elemento considerato.

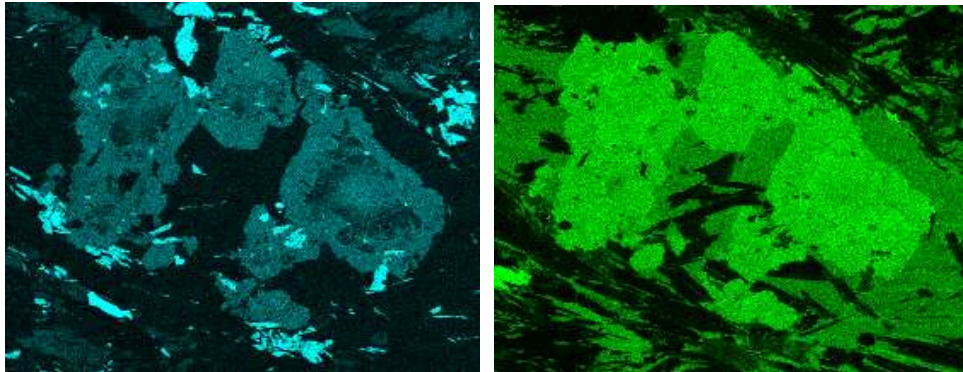


Figura 2.8 Mappe della distribuzione degli elementi calcio (a sinistra) e ferro (a destra)

2.3 Principi di funzionamento del microscopio a forza atomica (AFM)

L' AFM si basa su una tecnica di scansione ad altissima risoluzione, riproducendo immagini 3-D di superfici . Le forze di interazioni punta campione sono molto esigue, dell'ordine del μm . Queste piccole forze sono mantenute costanti attraverso la misurazione e il movimento di una leva molto flessibile di massa dell'ordine di pochi milligrammi. I microscopi a scansione, sono in grado di indagare superfici conduttori ed isolatori su scala atomica. L'AFM combina i principi dell' STM e il profilometro come è mostrato in figura 2.9. Il microscopio può essere utilizzato sia in modalità statica che in modalità dinamica. Nella modalità statica, indicato anche come modalità di repulsione o modalità di contatto ²⁹, una punta acuminata all'estremità di un cantilever è messo in contatto con la superficie di un campione. La deformazione del cantilever può essere misurata con un'approssimazione di 0,02 nm, quindi un cantilever tipico possiede una costante elastica di circa 10 N/m. La punta viene collocata nelle strette vicinanze della superficie del campione di cui effettua la scansione. Le forze di attrazione e repulsione tra la punta ed il campione che entra in gioco dipendono dalle forze di Van der Waals, la quale provoca una deflessione della microleva (la cui costante elastica è nota) in accordo con la legge di Hooke.

La deflessione è misurata utilizzando la luce riflessa di un laser dalla sommità della microleva, la quale verrà rilevata da un fotodiodo a quattro quadranti.

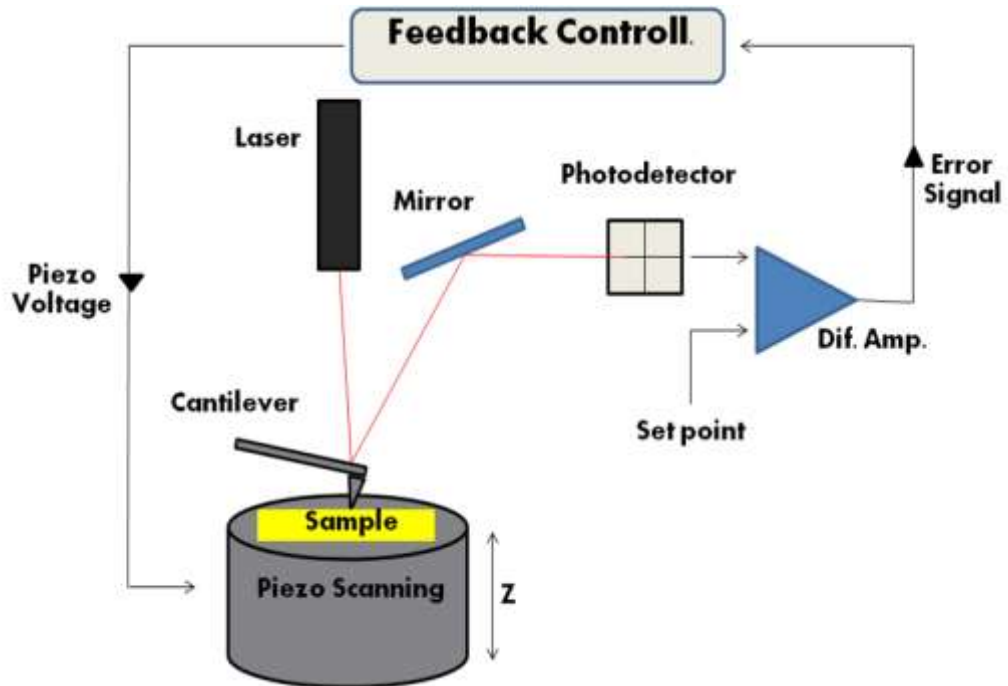


Figura 2.9 Rappresentazione schematica dell' AFM

Per mantenere costante la distanza della punta dalla superficie del campione, affinché quest'ultima possa seguire tutte le asperità superficiali dello stesso, c'è un circuito di feedback il quale regola la distanza tra la punta e il campione al fine di mantenere costante la forza che agisce tra loro. Generalmente il campione è collocato su un tubo piezoelettrico che può spostarlo in direzione perpendicolare (direzione z) per mantenere una forza costante e nel piano (direzioni x ed y) per analizzarne la superficie. La mappa risultante (x,y) rappresenta la topografia della superficie campione. Nella modalità dinamica di funzionamento, noto anche come imaging, la punta è portata in prossimità (entro pochi nm) ma non in contatto con il campione. Il cantilever viene fatto vibrare con una frequenza e un'ampiezza opportuna in modulazione di ampiezza (AM) ⁴³ o modulazione di frequenza

(FM) ⁴³⁻⁴⁶. Le forze di attrazione e repulsione che entrano in gioco tra gli atomi all'interfaccia punta-campione sono governate dalle forze di Van der Waals.

In entrambe le modalità, la superficie topografica si misura con la variazione del piezoelettrico di scansione che si muove lungo l'asse z affinché la distanza punta/campione rimanga costante (Fig. 2.9-2.10).

Nella modalità contact (statico) la forza di interazione tra punta e campione è misurata grazie alla deflessione della leva. Nella modalità non contact, senza contatto (o dinamico), il cantilever viene fatto vibrare e portato alla sua frequenza di risonanza; la misurazione dello smorzamento di frequenza ci fornirà il gradiente di forza. Per ottenere informazioni topografiche, la forza di interazione è usata come parametro di controllo per un circuito di feedback il quale mantiene la forza d'interazione punta/campione costante. Con un AFM che opera in modalità di contatto, le immagini topografiche possono raggiungere una risoluzione verticale inferiore a 0.1nm (a partire da 0,01 nm) e una risoluzione laterale di circa 0.2 nm ^{22,31,47-51}. Per ridurre al minimo gli effetti di attrito e le altre forze laterali nelle misure topografia nella modalità di contatto l'AFM può essere utilizzato nella modalità di modulazione ^{24,53}. Per ottenere risoluzione atomica con l'AFM, la costante della molla del cantilever dovrebbe essere più debole rispetto all'equivalente interazione interatomica. Per mantenere costante la distanza punta/campione si è visto negli anni che le tecniche ottiche sono risultate quelle più sensibili, affidabili e facilmente applicabili. La rilevazione ottica della deviazione del fascio è un metodo molto efficace per misurazioni anche a grande distanza di lavoro ed è anche in grado di misurare le variazioni angolari (forze di attrito).

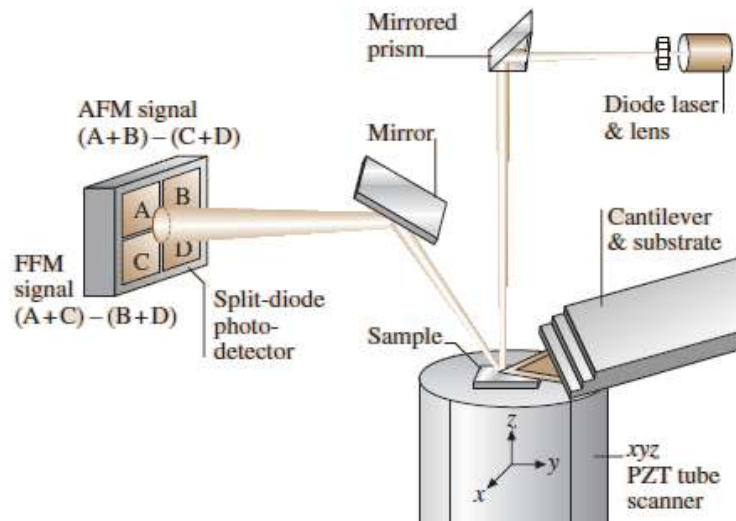


Figura 2.10 Rappresentazione schematica del percorso del fascio laser che arriva al fotodiode dell'AFM.

Quasi tutti gli SPM, utilizzano scannerizzatori piezo per analizzare il campione. Il funzionamento dei materiali piezoelettrici è molto semplice; sono materiali ceramici i quali, applicato un campo elettrico causa un cambiamento nella struttura cristallina, con espansione o contrazioni, facendo sì che avvenga un cambiamento netto di volume²⁴.

La tecnologia piezoelettrica è un modo per generare movimento tridimensionale. I tubo scanner sono ampiamente utilizzati nel microscopio a forza atomica²⁵. Questi riescono a fornire un ampio range di scansione con dimensioni ridotte. Come controllo punta/campione/piezoelettrico vengono utilizzati sistemi elettronici (circuiti di feedback) sia analogici che digitali. Oggi i circuiti più utilizzati sono quelli digitali i quali riescono ad avere un rumore di fondo molto più esiguo.

Un AFM ideale è un dispositivo privo di rumore, con un movimento del tubo scanner lineare con una punta di forma perfetta.. In realtà, i dispositivi di scansione sono colpite da distorsioni (lineari e non lineari) e queste distorsioni devono essere corrette.

Le distorsioni non lineari, principalmente, sono causate dalla presenza del ciclo di isteresi del piezoelettrico ceramico. Inoltre, il rumore elettronico può essere presenti nel sistema. Il rumore viene rimosso dal filtraggio digitale nello spazio reale ²⁶ o nel dominio spaziale della frequenza (spazio di Fourier) ²⁷.

L'AFM può opera sia ad "altezza costante" o "forza costante". Per descrivere ulteriormente il principio di funzionamento dell'AFM come mostrato nelle Figure. 2.9 e 2.10, il campione, in genere non più grandi di 10 mm × 10 mm, è montato su un tubo scanner PZT che consiste il quale si può muovere in tutte e tre le direzioni; nel piano orizzontale (xy) e in quello verticale (z). La punta di materiale estremamente duro è montata all'estremità di un cantilever flessibile il quale è portato a contatto con la superficie del campione. Grazie al tubo piezoelettrico il campione si muove nel piano con movimenti nanometrici. Ogni asperità sulla superficie del campione causa una deflessione verticale e laterale del cantilever. Un raggio laser a diodo (5mW di uscita massima di picco a 670 nm) è diretto sul dorso del cantilever, il raggio riflesso verrà catturato da uno specchio e inviato ad una cellula fotoelettrica (fotorilevatore split con quattro quadranti). Le asperità topografiche del campione causano una deflessione del cantilever, quindi cambierà anche la direzione del raggio laser riflesso che arriverà al foto rilevatore.

La variazione dello spot della luce, si tradurrà come una variazione di tensione a capo del fotodiodo, un circuito di feedback avrà il compito di modulare la tensione applicata allo scanner PZT per la regolazione dell'altezza, in modo tale che la deflessione verticale del cantilever rimarrà costante durante la scansione. La variazione di altezza PZT, rappresenterà quindi, una misura diretta della rugosità superficiale del campione. La maggior parte dei microscopi a scansione AFM può essere utilizzato per misure di topografia nella modalità cosiddetta tapping (contatto ad intermittenza), indicato anche come microscopia a forza dinamica.

Nella modalità di tapping, durante la scansione della superficie, il cantilever è montato su un supporto piezo che la fa vibrare con oscillazioni sinusoidali fino al suo valore di risonanza (7-40 Hz) con un'ampiezza oscillante costante (20-100 nm) introdotto in direzione verticale con un ciclo di feedback, mantenendo la forza media normale costante (Fig. 2.11).

La modalità tapping viene utilizzata nelle misurazioni topografiche per minimizzare gli effetti di attrito e di altre forze laterali, in particolare per superfici morbide.

Ad una prima istanza, l'angolo di scansione laterale (l'angolo di inclinazione tra la superficie del campione e l'asse longitudinale che attraversa la punta) può non sembra essere un parametro importante.

Tuttavia, la forza d'attrito tra la punta e il campione interesserà le misurazioni topografiche in un parallelo di scansione (scansione lungo l'asse del cantilever). Per la misura della forza di attrito applicata sulla superficie di punta durante lo scorrimento, vengono utilizzati fotodiodi a quattro quadranti, con quattro cellule fotoelettriche.

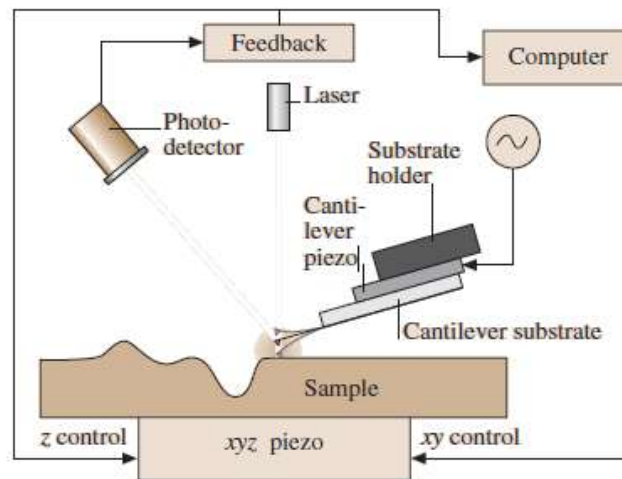


Figura 2.11 Rappresentazione schematica del funzionamento dell'AFM in *tapping mode*

Una forza di attrito tra il campione e la punta produrrà una torsione del cantilever di conseguenza, il raggio laser si rifletterà fuori del piano definito del fascio incidente. Questo produrrà una differenza di intensità del fascio laser ricevuto nel set di quadranti delle cellule fotoelettriche. La differenza di intensità tra le due serie di rivelatori (segnale FFM) è direttamente correlato al grado di torsione e quindi alla grandezza della forza di attrito. Questo metodo fornisce mappe tridimensionali del forza di attrito.

Uno dei problemi associati a questo metodo è che qualsiasi disallineamento tra il raggio laser e il fotorilevatore introdurrà errori nella misura. Il coefficiente di attrito si ottiene dalla pendenza dei dati di forza di attrito misurato in funzione dei carichi normali in genere sono compresi tra 10-150 nn. Questo approccio elimina eventuali contributi dovuti alle forze di adesione ⁷. Per il calcolo del coefficiente di attrito sulla base di un unico punto di misura, la forza d'attrito deve essere diviso per la somma da applicare al carico e alla forza di adesione intrinseca.

Inoltre, si è evinto che per il contatto in un unico punto dell'asperità della superficie del campione, il coefficiente d'attrito non è indipendente dal carico. La punta sulla superficie del campione si muoverà in modo tale che la sua traiettoria formerà un pattern triangolare come è mostrato in figura (Fig. 2.12). La velocità di scansione dipenderà sia dall'area che dalla frequenza di scansione.

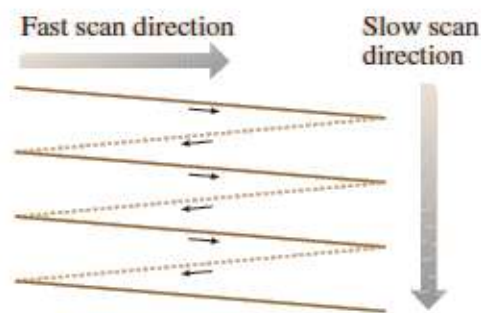


Figura 2.12 Rappresentazione schematica del movimento della punta sulla superficie del campione.

L'AFM si compone di tre parti principali: la testa ottica, che rileva la deviazione del fascio dovuto alla deflessione del cantilever, un tubo scanner PZT che controlla il movimento di scansione del campione montato su di esso e la base che supporta lo scanner e la testa e comprende circuiti per il segnale di deflessione e il circuito di feedback (Fig. 2.13a). L'AFM è collegato direttamente a un sistema di controllo, la testa ottica è costituita da un laser a diodi, da un fotodiodo a quattro quadranti e da uno specchio (Fig. 2.13b). L'utente via software può stabilire l'area di scansione fino ad un massimo supportato dallo scanner. La velocità di scansione deve essere diminuita se l'area di scansione aumenta.

Il tubo piezo richiede taratura nel piano x-y che è effettuata da un apposito reticolo di taratura taratura standard. Un'altra procedura molto importante è la taratura di forza, quando l'AFM, grazie alle proprietà di elasticità della leva e della sua elettronica sofisticata, può funzionare anche per la nanoindentation. La modalità di taratura in forza viene utilizzata per studiare le interazioni tra il cantilever e la superficie del campione.

Nella modalità di taratura in forza, le tensioni di X e Y applicate al tubo piezo sono tenute a zero e una tensione a dente di sega è applicata agli elettrodi del tubo piezo Z (Fig. 2.14a). La misura della forza inizia con il campione lontana e il cantilever nella posizione di riposo.

Applicando una certa tensione al piezo di scansione il campione viene spostato verticalmente su e giù rispetto il punto di riposo. Il tubo piezo muove il campione su e giù, di conseguenza anche la leva tenderà a deformarsi, il quale provocherà una variazione del segnale del fotodiode.

La curva forza-distanza, compromesso tra la deformazione della leva e la variazione del segnale in funzione della tensione applicata al tubo piezo è mostrata in figura 2.14b, la quale mostra una tipica curva forza-distanza.

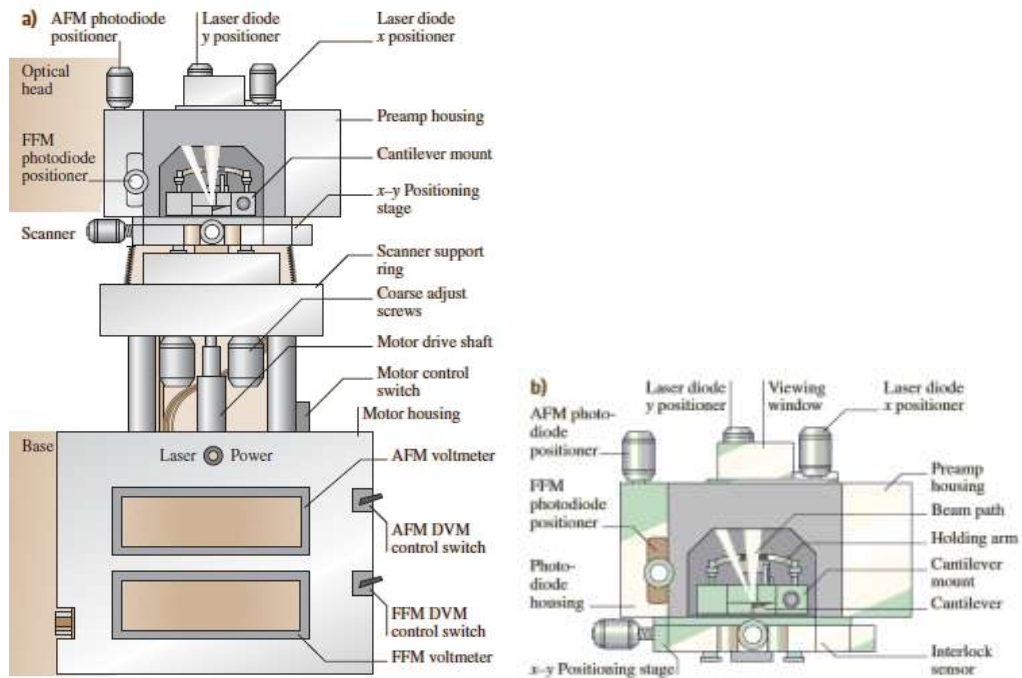


Figura 2.13: Rappresentazione schematica di un AFM commerciale con la descrizione di tutte le sue componenti. a) Base e testa dell'AFM, b) testa dell'AFM

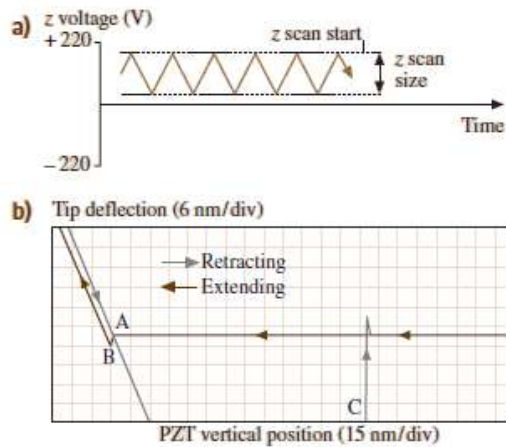


Figura 2.14: (a) calibrazione della forza a dente di sega, e (b) una tipica curva forza-distanza per una punta a contatto con un campione. Il contatto avviene nel punto B;

2.3.1 Cantilever, punta dell'AFM

Varie tipologie di sonde (cantilever) sono utilizzate nella microscopia a scansione a forza atomica, soprattutto la scelta è determinata dal tipo di superficie che si desidera analizzare. Il cantilever utilizzato nell' AFM dovrebbe soddisfare i seguenti criteri:

(1) avere una flessibilità costante (Rigidezza), (2) alta frequenza di risonanza, (3) un elevato fattore di qualità Q , (4) alta flessibilità laterale, (5), flessioni di breve durata, (6) alta riflettività del dorso (a specchio) per la deviazione del fascio rilevato dal fotodiodo e (7) una punta sporgente tagliente ⁵⁴.

Nell'acquisizione in tapping mode, la mole di dati o la risoluzione dell'immagine è legata anche alla frequenza di risonanza meccanica del cantilever. Per ottenere una banda larga di imaging, il cantilever AFM dovrebbe avere una frequenza di risonanza superiore a circa 10 kHz (30-100 kHz è preferibile) al fine di rendere il cantilever la parte meno sensibile del sistema. Le condizioni affinché il fattore di qualità sia alto è verificata riducendo la massa del cantilever. Il fattore di qualità $Q = \omega R / (c / m)$, dove ωR rappresenta la frequenza di risonanza dell'oscillatore smorzato, c è la costante di smorzamento e m è la massa dell'oscillatore. Aumentando la Q aumenta anche la sensibilità delle misurazioni. Tipici valori di Q sono compresi in un range tra 100 e 1000.

Se il cantilever presenta una rigidezza eccessiva nelle zone laterali, questo comporta un maggior attrito della punta nello scorrimento sulla superficie il quale può causare errori di misura topografiche.

Anche per misurazioni di attrito nella modalità di contac mode è preferibile avere leve con una rigidità laterale non eccessiva.

In passato, i cantilever erano tagliati a mano da lamine di metallo sottili o formati da fili sottili. Successivamente ad una delle due estremità veniva applicata una punta di diamante. Negli anni si sono fabbricati cantilever a geometrie diverse; il più semplice era a forma di L, successivamente si sono avute quelle a geometria single-V e doppia-V, ^{23, 55}. Per le dimensioni ridotte delle leve era difficile costruirle a mano con scarsa riproducibilità.

Con il passar degli anni, si sono affinate sempre di più e tecniche di micro fabbricazione per la costruzione di strutture planari di film sottili con dimensioni inferiore al micron. I cantilever a geometria V sono risultati negli anni tra i migliori con una costante di forza laterale maggiore rispetto a quelle rettangolari ⁵⁴. Attualmente le più diffuse sono di materiale Si₃N₄ con punta di diamante. In tabella 2.1 sono riportate le proprietà meccaniche; come la frq. di risonanza, la durezza etc.

In figura 2.15 sono riportate le proiezioni ortogonali della punta e del cantilever con e rispettive misure di grandezza.

Meyer et al. ⁵⁶ hanno utilizzato una leva rettangolare di silicio con lunghezza di 200 μ m, larghezza 21 μ m, spessore 0.4 μ m, e lunghezza della punta di 12.5 μ m, e con costante elastica 0.007N / m e costante di torsione di 0.72N / m il quale fornisce una sensibilità laterale di 10 PN di forza e uno angolo di risoluzione di 10⁻⁷ rad. Con questa geometria particolare, sensibilità alle forze laterali è migliorata di circa un fattore 100 rispetto alle leve commerciali in Si₃N₄ a V o rettangolare in Silicio. In figura 2.16 sono mostrate le scansioni SEM sia di un cantilever e sia di varie tipologie di punte.

Property	Young's Modulus (E) (GPa)	Density (ρ) (kg/m^3)	Microhardness (GPa)	Speed of sound ($\sqrt{E/\rho}$) (m/s)
Diamond	900–1,050	3,515	78.4–102	17,000
Si_3N_4	310	3,180	19.6	9,900
Si	130–188	2,330	9–10	8,200
W	350	19,310	3.2	4,250
Ir	530	–	~ 3	5,300

Tabella 2.1: Proprietà relative ai materiali utilizzati per la fabbricazione delle leve (cantilever)

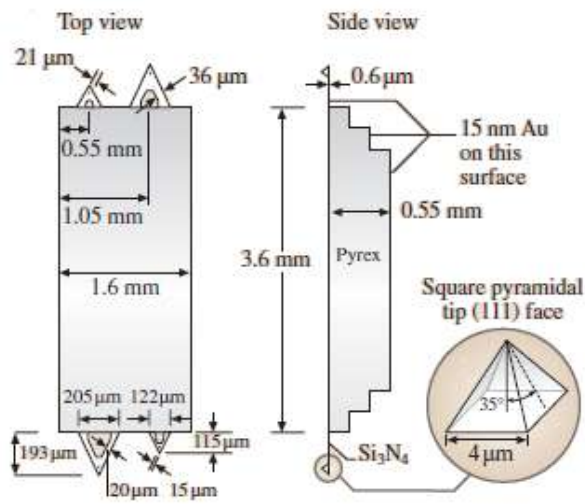


Figura 2.15 : Proezioni ortogonali della punta e del cantilever con e rispettive misure di grandezza

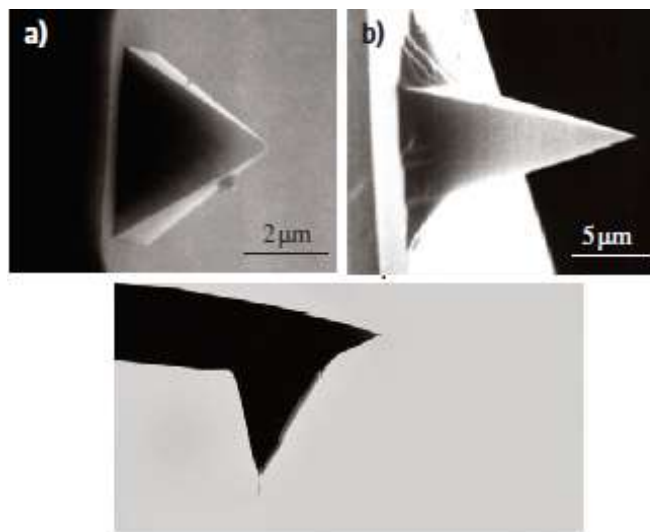


Figura 2.16 : Immagini SEM; a-b) Punta AFM, c) Cantilever

2.3.2 Piezoelettrico di scansione

Il movimento tridimensionale xyz è affidato ad un cilindro cavo piezoelettrico diviso in quattro quadranti il quale è montato nella base del microscopio. Fu introdotto per la prima volta nel 1986 da Binnig e Smith i quali riuscirono ad ottenere i tre movimenti ortogonali con l'utilizzo di un singolo tubo piezoelettrico. Il traslatore, quindi, consente la scansione della superficie e di mantenere la distanza costante della punta dal campione. Il piezo è prodotto dalla *Staveley* (EBL#3) di dimensioni: 3" di lunghezza, 0.02" di spessore e 1" di diametro. Il tubo è dotato di diversi elettrodi sulle superfici interna ed esterna. Applicando opportune differenze di potenziale (tipicamente fino a qualche centinaio di Volt) a coppie di elettrodi, è possibile ottenere, per effetto piezoelettrico, un movimento dell'estremità del tubo, dove è appoggiato il campione, nelle tre direzioni. In realtà fenomeni intrinseci al funzionamento del materiale, come l'isteresi o altri effetti non lineari conducono a spostamenti dal comportamento ideale soprattutto quando si effettuano ampie scansioni. Nel caso specifico la dimensione tipica della scansione è stata di $1 \times 1 \mu m^2$, mentre il tubo piezoelettrico ha la possibilità di muoversi in aree fino ad un massimo di $30 \times 30 \mu m^2$. (Fig. 2.17).

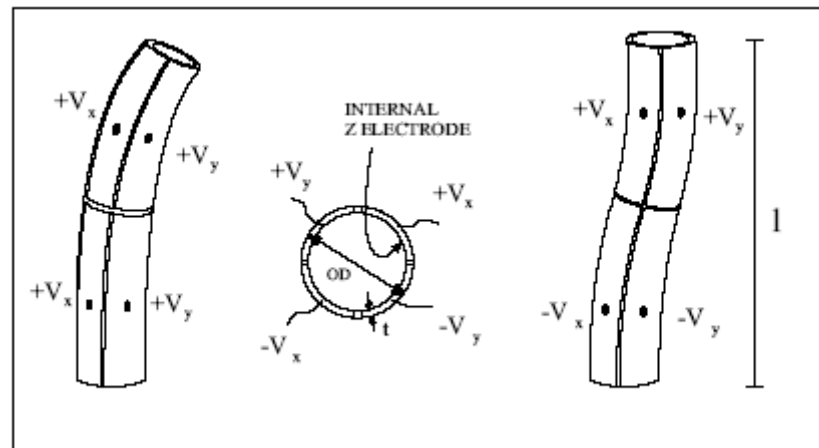


Figura 2.17: Tubo piezoelettrico a quattro quadranti.

2.3.3 Motorino passo-passo

Il motorino passo-passo o stepper che è inserito nel *corpo* dello SNOM, ha il compito di abbassare e alzare la *testa* del microscopio tramite una vite filettata, la quale costituisce una dei tre perni su cui è poggiata la testa (Fig. 2.18). Il suo compito principale è quello di mettere in condizioni il circuito di feedback di funzionare nel modo ottimale. Grazie ad un'interfaccia utente può anche, a fine operazione di scansione, per messa in sicurezza della sonda, alzare la vite di un numero di passi tale da evitare un impatto involontario e violento della punta sul campione.

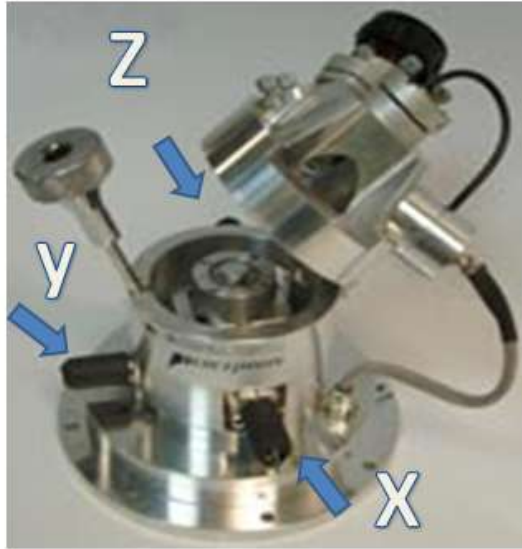


Figura 2.18: Immagine del microscopio AFM Perception della Assing s.p.a., le tre frecce evidenziano la posizione dei tre motorini passo-passo (x,y,z).

2.3.4 L'elettronica

L'elettronica dell'AFM rappresenta tutta la parte strumentale atta a rilevare e misurare i diversi segnali e a controllare la distanza della punta al campione affinché la sonda del microscopio sia messa in una posizione tale da garantire l'illuminazione da campo prossimo.

Questi componenti sono:

- Circuito di feedback per la distanza
- Amplificatore ad alta tensione
- Schede di acquisizioni integrate e oscillatore

L'amplificatore di feedback utilizzato è un circuito composto da tre tipi di controllo chiamato PID (Proporzionale Integratore Derivatore). Permette di compiere aggiustamenti fini per quanto riguarda il condizionamento del segnale. Si vuole che il segnale di errore V_{err} , cioè la variazione del segnale rispetto al set-point cioè la tensione di riferimento V_{rif} , sia separato su più canali (Fig. 2.19), ognuno dei quali ha la sua diversa risposta in frequenza. Il canale P dà un'uscita proporzionale al V_{err} ; I e D invece sono sensibili rispettivamente all'integrale e alla derivata nel tempo della tensione V_{err} . Aggiustando i pesi relativi forniti ai vari canali, si riesce ad ottenere una risposta in uscita che permette di seguire in modo appropriato la variazione del segnale in ingresso. Quindi il circuito di feedback serve in tempo reale a correggere un segnale di oscillazione affinché lo strumento possa reagire in modo rapido alle variazioni di oscillazioni dovute anche alla rugosità del campione in modo da non inficiare la misura.

La risposta del sistema dipende da numerosi fattori che non possono essere considerati dei parametri costanti ma che di volta in volta possono come la superficie del campione stesso (la quale può essere più o meno morbida), per cui l'aggiustamento del PID fa parte delle operazioni preliminari eseguite prima di ogni set di misure.

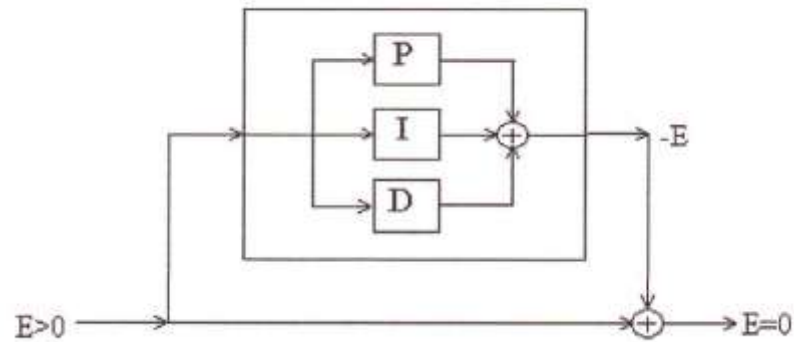


Figura 2.19: Schema a blocchi del circuito PID

2.3 Rugosità superficiale

Tutte le superfici lavorate sono caratterizzate da una rugosità superficiale che è, in sostanza, l'irregolarità della superficie rispetto alla superficie teorica. Le irregolarità possono presentarsi in modo casuale, come per esempio nei pezzi ottenuti per fusione o sottoposti a sabbiatura, oppure avere un andamento regolare caratteristico della lavorazione ad asportazione di truciolo.

La rugosità è in effetti costituita da una serie di solchi più o meno ordinati e regolari e con profondità variabile disposti su una superficie.

La rugosità si definisce e di misura immaginando di sezionare la superficie con un piano ad essa ortogonale. Questo piano, detto "piano di rilievo", intersecando la superficie definisce il "profilo reale" come intersezione nello spazio delle due superfici (Fig. 2.20).

Normalmente la rugosità si indica con il simbolo Ra e si misura in μm o in nm, però come vedremo fra poco essa non dà un quadro completo dello stato della superficie.

Il rilievo della rugosità viene eseguito su una certa lunghezza L_n detta lunghezza di valutazione, essa è 5 volte la lunghezza di base L che a sua volta dipende dal valore previsto della rugosità. Per la determinazione della rugosità Ra viene presa come riferimento la linea media del profilo, che è la linea per la quale è minima la somma delle distanze al quadrato dei punti del profilo dalla linea stessa (Fig. 2.21).

Assunta la linea media come asse delle ascisse, si definisce la rugosità Ra come il valore medio delle ordinate y (prese in valore assoluto) del profilo stesso. Quindi Ra è la media aritmetica delle distanze dei punti del profilo dalla linea media di riferimento espressa in nm.

Nell'insieme continuo si ha:

$$Ra = \frac{1}{L} \int_0^L |y| dx$$

Mentre nell'insieme discreto si ha:

$$Ra = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n |y_i|$$

Il valore della rugosità così definito è quindi un valore medio che non dice niente riguardo al tipo di irregolarità. Per esempio pochi picchi alti darebbero lo stesso risultato di molti picchi bassi.

E' per questa ragione che si introducono altri criteri per capire meglio lo stato della superficie. Il valore della rugosità così definito è quindi un valore medio che non dice niente riguardo al tipo di irregolarità. Per esempio pochi picchi alti darebbero lo stesso risultato di molti picchi bassi.

E' per questa ragione che si introducono altri criteri per capire meglio lo stato della superficie. Il valore Ra non è però sufficiente per definire completamente le caratteristiche morfologiche della superficie, in quanto profili dagli andamenti differenti dallo stesso scostamento medio aritmetico presenteranno lo stesso valore di Ra; per tale motivo si sono introdotti altri parametri, come RMS, media quadratica degli scostamenti dei punti del profilo dalla linea media; tale parametro, essendo una media quadratica è più sensibile ai bruschi scostamenti del profilo da un andamento regolare ed è in generale maggiore rispetto al valore Ra.

Quindi RMS nell'insieme discreto sarà:

$$RMS = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n y_i^2}$$

Questi parametri, quindi restituiscono un valore numerico, fornendoci così un valore inconfutabile sulla valutazione e il confronto delle superfici.

Nel nostro studio sperimentale, la variazione dei due parametri rispetto ai valori registrati sul campione controllo, rappresenta l'alterazione superficiale dovuta alla reazione chimica tra il nickel-titanio e l'irrigante canalare.

E quindi, trasporto di materia sulla superficie. Questo valore numerico rapportato in ambito clinico può rappresentare una minore efficienza durante l'utilizzo nella terapia endodontica.

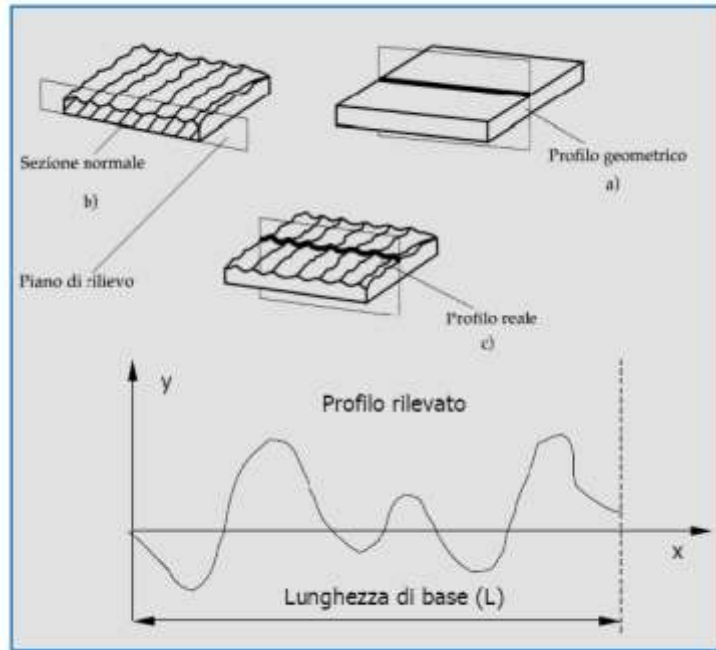


Figura 2.20: Definizione di rugosità

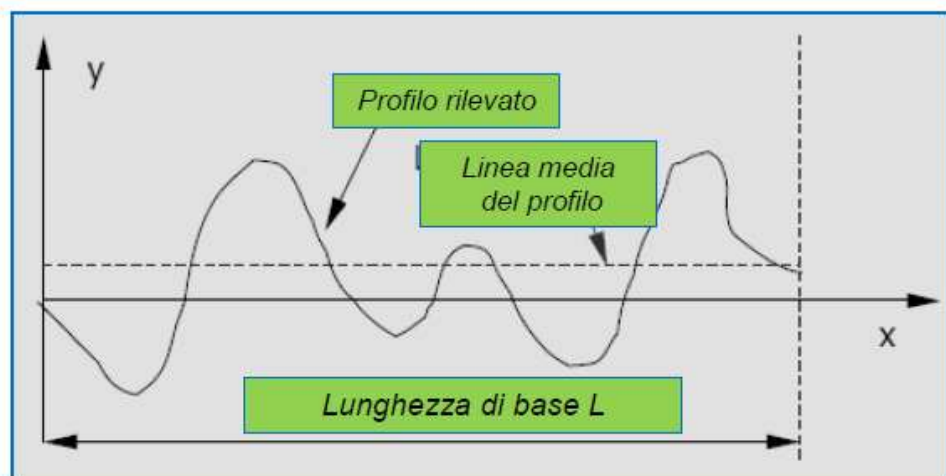


Figura 2.21: Determinazione della linea media di riferimento

2.4 Preparazione dei campioni

Nello studio di tesi sono stati eseguiti due esperimenti diversi, entrambi in vitro. **Il primo**, è stata effettuata un'analisi superficiale con il microscopio a forza atomica (AFM) dei Rotary Files NiTi Protaper (Densply Maillefer, Swiss Made) immersi negli irriganti canalari, EDTA e Ipoclorito di Sodio. **Il secondo**, è stata eseguita un'analisi comparativa superficiale di due tipi diversi di Rotary Files; Protaper (Densply Maillefer, Swiss Made) e AlphaKite (Komet, Lemgo, Germany) i quali si differiscono dai primi per un coating di Nitrato di Titanio. Le due tipologie di files sono stati osservati sia al microscopio a scansione elettronica (SEM) con microanalisi EDS e successivamente al microscopio a forza atomica (AFM) dopo vari cicli di sterilizzazione. Nel primo studio sono stati presi un totale di 20 file al Nichel Titanio Protaper (Densply Maillefer, Swiss Made) (Fig 2.22). Prima di essere analizzati, sono stati divisi in 5 gruppi. In ognuno di questi era presente un file S1, S2, F1 ed F2. Il primo era il gruppo controllo (nessun trattamento). Il secondo e il terzo gruppo prevedevano l'immersione in una soluzione al 5,25% di NaOCl rispettivamente per 5 e 10 minuti. Il quarto e quinto gruppo prevedevano invece l'immersione in una soluzione al 17% di EDTA rispettivamente per 5 e 10 minuti.

Nel secondo studio sono stati presi un totale di otto file NiTi rotanti, quattro Protaper (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Svizzera) e quattro AlphaKite (Komet, Lemgo, Germania) (Fig. 2.23).

Gli strumenti sono stati divisi in quattro gruppi, ogni gruppo composto un Alpha Kite e uno ProTaper.

Un gruppo è stato indicato come il gruppo controllo (nessun trattamento), e gli altri tre gruppi sono stati sterilizzati rispettivamente con 1, 5 e 10 cicli di autoclave, rispettivamente.

Ogni ciclo è stato eseguito a 121 ° C, con una pressione di 15 psi, per 15 minuti. Gli strumenti sono stati conservati a secco e al fresco, a temperatura ambiente.

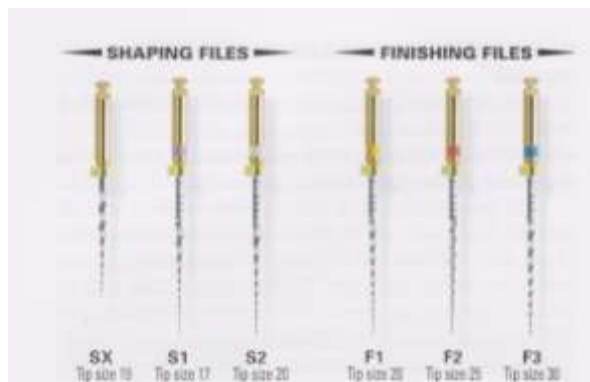


Figura 2.22 Sistema ProTaper



Figura 2.23 Sistema AlphaKite

2.5.1 Analisi AFM

I file sono stati attaccati su una base di metallo usando una colla a base di cianoacrilato a presa rapida. Ogni campione è stato posizionato sulla base dell' AFM (Assing, Italy), e sono state analizzate, su una area di 3 mm dalla punta del file, 20 aree diverse, prese casualmente. La tecnica di scansione delle immagini dell'AFM, sono state fatte in *contact mode*, sotto condizioni ambientali. Le aree scannerizzate erano dei quadrati perfetti (1 μ m x 1 μ m). Le immagini tridimensionali (400 x 400 linee) sono state processate dal software Gwyddion 2.19 (www.gwyddion.net). Sono stati registrati i parametri di rugosità media (Ra) e di rugosità quadratica media (RMA) e infine i dati sono stati analizzati statisticamente con analisi al *t* test.

2.5.2 Analisi SEM con EDS

Gli strumenti sono stati montati sullo sugli appositi stab di metallo, attaccati usando una colla a base di cianoacrilato a presa rapida . Successivamente sono stati inseriti all'interno della camera a basso vuoto del microscopio elettronico a scansione SEM (FEI, Netherlands), e analisi di superficie è stato effettuata su ogni strumento con la spettroscopia a dispersione di energia a raggi X (spettroscopia a dispersione di energia JEOL-EDS System, Sistema ISIS , Oxford Instruments, Giappone). Le misurazioni sono state effettuate su due posizioni per ogni strumento con ingrandimenti a 200x e a 1000x, su una area di 3 mm dalla punta del file.

Riferimenti Bibliografici

- ¹ G. Binnig, H. Rohrer, Ch. Gerber, E. Weibel: Surface studies by scanning tunneling microscopy, *Phys. Rev. Lett.* **49** (1982) 57–61
- ² B. Bhushan: *Handbook of Micro/Nanotribology*, 2nd edn. (CRC, Boca Raton 1999)
- ³ M. Reinstaedtler, U. Rabe, V. Scherer, U. Hartmann, A. Goldade, B. Bhushan, W. Arnold: On the nanoscale measurement of friction using atomic force microscope cantilever torsional resonances, *Appl. Phys. Lett.* **82** (2003) 2604–2606
- ⁴ R. Erlandsson, G. M. McClelland, C. M. Mate, S. Chiang: Atomic force microscopy using optical interferometry, *J. Vac. Sci. Technol. A* **6** (1988) 266–270
- ⁵ O. Marti, J. Colchero, J. Mlynek: Combined scanning force and friction microscopy of mica, *Nanotechnol.* **1** (1990) 141–144
- ⁶ G. Meyer, N. M. Amer: Simultaneous measurement of lateral and normal forces with an optical-beamdeflection atomic force microscope, *Appl. Phys. Lett.* **57** (1990) 2089–2091
- ⁷ B. Bhushan, V. N. Koinkar, J. Ruan: Microtribology of magnetic media, *Proc. Inst. Mech. Eng., Part J: J. Eng. Tribol.* **208** (1994) 17–29
- ⁸ B. Bhushan, J. N. Israelachvili, U. Landman: Nanotribology: Friction, wear, and lubrication at the atomic scale, *Nature* **374** (1995) 607–616
- ⁹ N. A. Burnham, D. D. Domiguez, R. L. Mowery, R. J. Colton: Probing the surface forces of monolayer films with an atomic force microscope, *Phys. Rev. Lett.* **64** (1990) 1931–1934
- ¹⁰ N. A. Burham, R. J. Colton, H. M. Pollock: Interpretation issues in force microscopy, *J. Vac. Sci. Technol. A* **9** (1991) 2548–2556
- ¹¹ C. D. Frisbie, L. F. Rozsnyai, A. Noy, M. S. Wrighton, C. M. Lieber: Functional group imaging by chemical force microscopy, *Science* **265** (1994) 2071–2074

- ¹² V. N. Koinkar, B. Bhushan: Microtribological studies of unlubricated and lubricated surfaces using atomic force/friction force microscopy, *J. Vac. Sci. Technol. A* **14** (1996) 2378–2391
- ¹³ V. Scherer, B. Bhushan, U. Rabe, W. Arnold: Local elasticity and lubrication measurements using atomic force and friction force microscopy at ultrasonic frequencies, *IEEE Trans. Mag.* **33** (1997) 4077–4079
- ¹⁴ V. Scherer, W. Arnold, B. Bhushan: Lateral force microscopy using acoustic friction force microscopy, *Surf. Interface Anal.* **27** (1999) 578–587
- ¹⁵ B. Bhushan, S. Sundararajan: Micro/Nanoscale friction and wear mechanisms of thin films using atomic force and friction force microscopy, *Acta Mater.* **46** (1998) 3793–3804
- ¹⁶ U. Krottil, T. Stifter, H. Waschipky, K. Weishaupt, S. Hild, O. Marti: Pulse force mode: A new method for the investigation of surface properties, *Surf. Interface Anal.* **27** (1999) 336–340
- ¹⁷ B. Bhushan, C. Dandavate: Thin-film friction and adhesion studies using atomic force microscopy, *J. Appl. Phys.* **87** (2000) 1201–1210
- ¹⁸ B. Bhushan: *Micro/Nanotribology and its Applications* (Kluwer, Dordrecht 1997)
- ¹⁹ B. Bhushan: *Principles and Applications of Tribology* (Wiley, New York 1999)
- ²⁰ B. Bhushan: *Modern Tribology Handbook Vol. 1: Principles of Tribology* (CRC, Boca Raton 2001)
- ²¹ B. Bhushan: *Introduction to Tribology* (Wiley, New York 2002)
- ²² G. Binnig, Ch. Gerber, E. Stoll, T. R. Albrecht, C. F. Quate: Atomic resolution with atomic force microscope, *Europhys. Lett.* **3** (1987) 1281–1286

- ²³ N. A. Burnham, R. J. Colton: Measuring the nanomechanical properties and surface forces of materials using an atomic force microscope, *J. Vac. Sci. Technol. A* **7** (1989) 2906–2913
- ²⁴ P. Maivald, H. J. Butt, S. A. C. Gould, C. B. Prater, B. Drake, J. A. Gurley, V. B. Elings, P. K. Hansma: Using force modulation to image surface elasticities with the atomic force microscope, *Nanotechnol.* **2** (1991) 103–106
- ²⁵ B. Bhushan, A. V. Kulkarni, W. Bonin, J. T. Wyrobek: Nano/Picoindentation measurements using capacitive transducer in atomic force microscopy, *Philos. Mag. A* **74** (1996) 1117–1128
- ²⁶ B. Bhushan, V. N. Koinkar: Nanoindentation hardness measurements using atomic force microscopy, *Appl. Phys. Lett.* **75** (1994) 5741–5746
- ²⁷ D. DeVecchio, B. Bhushan: Localized surface elasticity measurements using an atomic force microscope, *Rev. Sci. Instrum.* **68** (1997) 4498–4505
- ²⁸ S. Amelio, A. V. Goldade, U. Rabe, V. Scherer, B. Bhushan, W. Arnold: Measurements of mechanical properties of ultra-thin diamond-like carbon coatings using atomic force acoustic microscopy, *Thin Solid Films* **392** (2001) 75–84
- ²⁹ G. Binnig, C. F. Quate, Ch. Gerber: Atomic force microscope, *Phys. Rev. Lett.* **56** (1986) 930–933
- ³⁰ B. Bhushan, G. S. Blackman: Atomic force microscopy of magnetic rigid disks and sliders and its applications to tribology, *ASME J. Tribol.* **113** (1991) 452–458
- ³¹ O. Marti, B. Drake, P. K. Hansma: Atomic force microscopy of liquid-covered surfaces: atomic resolution images, *Appl. Phys. Lett.* **51** (1987) 484–486
- ³² B. Drake, C. B. Prater, A. L. Weisenhorn, S. A. C. Gould, T. R. Albrecht, C. F. Quate, D. S. Cannell, H. G. Hansma, P. K. Hansma: Imaging crystals, polymers and processes in water with the atomic force microscope, *Science* **243** (1989) 1586–1589

- ³³ M. Binggeli, R. Christoph, H. E. Hintermann, J. Colchero, O. Marti: Friction force measurements on potential controlled graphite in an electrolytic environment, *Nanotechnol.* **4** (1993) 59–63
- ³⁴ G. Meyer, N. M. Amer: Novel optical approach to atomic force microscopy, *Appl. Phys. Lett.* **53** (1988) 1045–1047
- ³⁵ J. H. Coombs, J. B. Pethica: Properties of vacuum tunneling currents: Anomalous barrier heights, *IBM J. Res. Dev.* **30** (1986) 455–459
- ³⁶ M. D. Kirk, T. Albrecht, C. F. Quate: Lowtemperature atomic forcemicroscopy, *Rev. Sci. Instrum.* **59** (1988) 833–835
- ³⁷ F. J. Giessibl, Ch. Gerber, G. Binnig: A lowtemperature atomic force/scanning tunneling microscope for ultrahigh vacuum, *J. Vac. Sci. Technol. B* **9** (1991) 984–988
- ³⁸ T. R. Albrecht, P. Grutter, D. Rugar, D. P. E. Smith: Low temperature force microscope with allfiber interferometer, *Ultramicroscopy* **42–44** (1992) 1638–1646
- ³⁹ H. J. Hug, A. Moser, Th. Jung, O. Fritz, A. Wadas, I. Parashikor, H. J. Güntherodt: Low temperature magnetic force microscopy, *Rev. Sci. Instrum.* **64** (1993) 2920–2925
- ⁴⁰ C. Basire, D. A. Ivanov: Evolution of the lamellar structure during crystallization of a semicrystallineamorphous polymer blend: Time-resolved hotstage SPM study, *Phys. Rev. Lett.* **85** (2000) 5587–5590
- ⁴¹ H. Liu, B. Bhushan: Investigation of nanotribological properties of self-assembled monolayers with alkyl and biphenyl spacer chains, *Ultramicroscopy* **91** (2002) 185–202
- ⁴² L. Merola, *Esperimentazioni di Fisica, Ottica*, Liguori (2004)
- ⁴³ Y. Martin, C. C. Williams, H. K. Wickramasinghe: Atomic force microscope-force mapping and profiling on a sub 100-Å scale, *J. Appl. Phys.* **61** (1987) 4723–4729
- ⁴⁴ D. Sarid, V. Elings: Review of scanning force microscopy, *J. Vac. Sci. Technol. B* **9** (1991) 431–437

- ⁴⁵ F. J. Giessibl: Atomic resolution of the silicon(111)– (7×7) surface by atomic force microscopy, *Science* **267** (1995) 68–71
- ⁴⁶ B. Anczykowski, D. Krueger, K. L. Babcock, H. Fuchs: Basic properties of dynamic force spectroscopy with the scanning force microscope in experiment and simulation, *Ultramicroscopy* **66** (1996) 251–259
- ⁴⁷ T. R. Albrecht and C. F. Quate: Atomic resolution imaging of a nonconductor by atomic force microscopy, *J. Appl. Phys.* **62** (1987) 2599–2602
- ⁴⁸ S. Alexander, L. Hellemans, O. Marti, J. Schneir, V. Elings, P. K. Hansma: An atomic-resolution atomic-force microscope implemented using an optical lever, *J. Appl. Phys.* **65** (1989) 164–167
- ⁴⁹ G. Meyer, N. M. Amer: Optical-beam-deflection atomic force microscopy: The NaCl(001) surface, *Appl. Phys. Lett.* **56** (1990) 2100–2101
- ⁵⁰ A. L. Weisenhorn, M. Egger, F. Ohnesorge, S. A. C. Gould, S. P. Heyn, H. G. Hansma, R. L. Sinsheimer, H. E. Gaub, P. K. Hansma: Molecular resolution images of Langmuir–Blodgett films and DNA by atomic force microscopy, *Langmuir* **7** (1991) 8–12
- ⁵¹ J. Ruan, B. Bhushan: Atomic-scale and microscale friction of graphite and diamond using friction force microscopy, *J. Appl. Phys.* **76** (1994) 5022–5035
- ⁵² A. J. den Boef: The influence of lateral forces in scanning force microscopy, *Rev. Sci. Instrum.* **62** (1991) 88–92
- ⁵³ M. Radmacher, R. W. Tillman, M. Fritz, H. E. Gaub: From molecules to cells: Imaging soft samples with the atomic force microscope, *Science* **257** (1992) 1900–1905
- ⁵⁴ T. R. Albrecht, S. Akamine, T. E. Carver, C. F. Quate: Microfabrication of cantilever styli for the atomic force microscope, *J. Vac. Sci. Technol. A* **8** (1990) 3386–3396

- ⁵⁵ O. Marti, S. Gould, P. K. Hansma: Control electronics for atomic force microscopy, *Rev. Sci. Instrum.* **59**(1988) 836–839
- ⁵⁶ E. Meyer, R. Overney, R. Luthi, D. Brodbeck: Friction force microscopy of mixed Langmuir–Blodgett films, *Thin Solid Films* **220** (1992) 132–137

Capitolo III

Effetti dell'Ipoclorito di sodio e dell'EDTA sugli strumenti rotanti al Nichel-Titanio valutati con l'AFM

In questo capitolo saranno riportate le misure di rugosità superficiale Ra e RMS misurate con microscopia AFM, degli strumenti rotanti al Nichel-Titanio nuovi e dopo essere immersi a tempi diversi in Ipoclorito ed EDTA.

3.1 Risultati

Nel nostro studio abbiamo ottenuto immagini tridimensionali della topografia superficiale di quattro files diversi 2 twisted files e 2 shape files Protaper (S1, S2, F1, F2) in Nichel-Titanio nuovi e immersi in Ipoclorito di Sodio per 5 e 10 minuti e in EDTA per 5 e 10 minuti, le immagini le abbiamo elaborate con il software Gwyddion[®] e le abbiamo confrontate. In tutti i fili analizzati sono state osservate irregolarità topografiche che sono state misurate con scala nanometrica. Per individuare eventuali differenze statisticamente significative nella topografia della superficie dei diversi files, sono stati valutati i parametri topografici verticali.

Le misurazioni sono state effettuate prendendo in considerazione dei parametri statistici che sono la rugosità media (Ra) e la rugosità quadratica media (Rms). I valori sono stati espressi come media \pm la deviazione standard. Analizzando questi dati si è verificato che c'è stato un aumento della rugosità superficiale statisticamente significativa per i files immersi negli irriganti canalari rispetto ai gruppi controllo (Fig. 3.1 e 3.2). Le immagini del gruppo controllo dei files S1 e S2 sono risultate diverse rispetto ai gruppi controllo degli strumenti F1 e F2 (Fig. 3.1 e 3.2), mentre tutte le immagini dei ProTaper trattati rivelano un aumento della rugosità rispetto ai controlli (Fig. 3.1 e 3.2). I valori di Ra e RMS dei file S1 e S2 sono stati significativamente più bassi rispetto ai files F1 e F2 ($P < 0,001$, ANOVA). L'immersione degli strumenti ProTaper in soluzioni NaOCl e EDTA per 5 e 10 minuti hanno mostrato un aumento significativo ($P < 0,05$ ANOVA) dei valori medi di Ra e RMS rispetto ai controlli (Tabella 1,2). In particolare, F1 e F2 avevano valori più elevati di Ra e RMS, mentre l'incremento più significativo è stato osservato per gli strumenti S2 immersi in soluzione NaOCl e EDTA per 10 minuti rispetto ai controlli e gli altri gruppi sperimentali (Tabella 1,2).

Ra	S1	S2	F1	F2
New	0.77 ± 0.21	0.50 ± 0.13	2.36 ± 1.02	2.30 ± 0.69
NaOCl 5'	1.20 ± 0.79*	0.73 ± 0.22**	3.27 ± 1.34*	3.30 ± 0.87*
NaOCl 10'	2.46 ± 0.70***	1.19 ± 0.67**	4.26 ± 1.04**	4.18 ± 1.37*
EDTA 5'	1.86 ± 0.67***	3.87 ± 0.30***	5.10 ± 1.07***	3.82 ± 0.61***
EDTA 10'	4.02 ± 1.17***	4.56 ± 1.20***	5.07 ± 0.91***	5.18 ± 1.67***

Tabella 1: Media ± Deviazione standar dei valori di Ra (nm) per il gruppo sperimentale. L'* rappresenta la significatività (Student t Test) tra i files nuovi e quelli immersi in soluzione [* ($P < 0.05$), ** ($P < 0.001$), *** ($P < 0.0001$)].

RMS	S1	S2	F1	F2
New	1.09 ± 0.36	0.65 ± 0.17	3.09 ± 1.47	2.88 ± 0.72
NaOCl 5'	1.71 ± 0.98*	0.95 ± 0.32**	4.33 ± 1.90*	4.10 ± 1.13*
NaOCl 10'	3.28 ± 1.17***	1.60 ± 0.82***	4.85 ± 1.70*	5.10 ± 2.22*
EDTA 5'	2.45 ± 0.80***	4.96 ± 1.20***	5.52 ± 1.16***	4.79 ± 0.74***
EDTA 10'	5.09 ± 1.47***	6.15 ± 0.90***	7.16 ± 1.18***	7.00 ± 3.14**

Tabella 2: Media ± Deviazione standar dei valori di RMS (nm) per il gruppo sperimentale. L'* rappresenta la significatività (Student t Test) tra i files nuovi e quelli immersi in soluzione [* ($P < 0.05$), ** ($P < 0.001$), *** ($P < 0.0001$)].

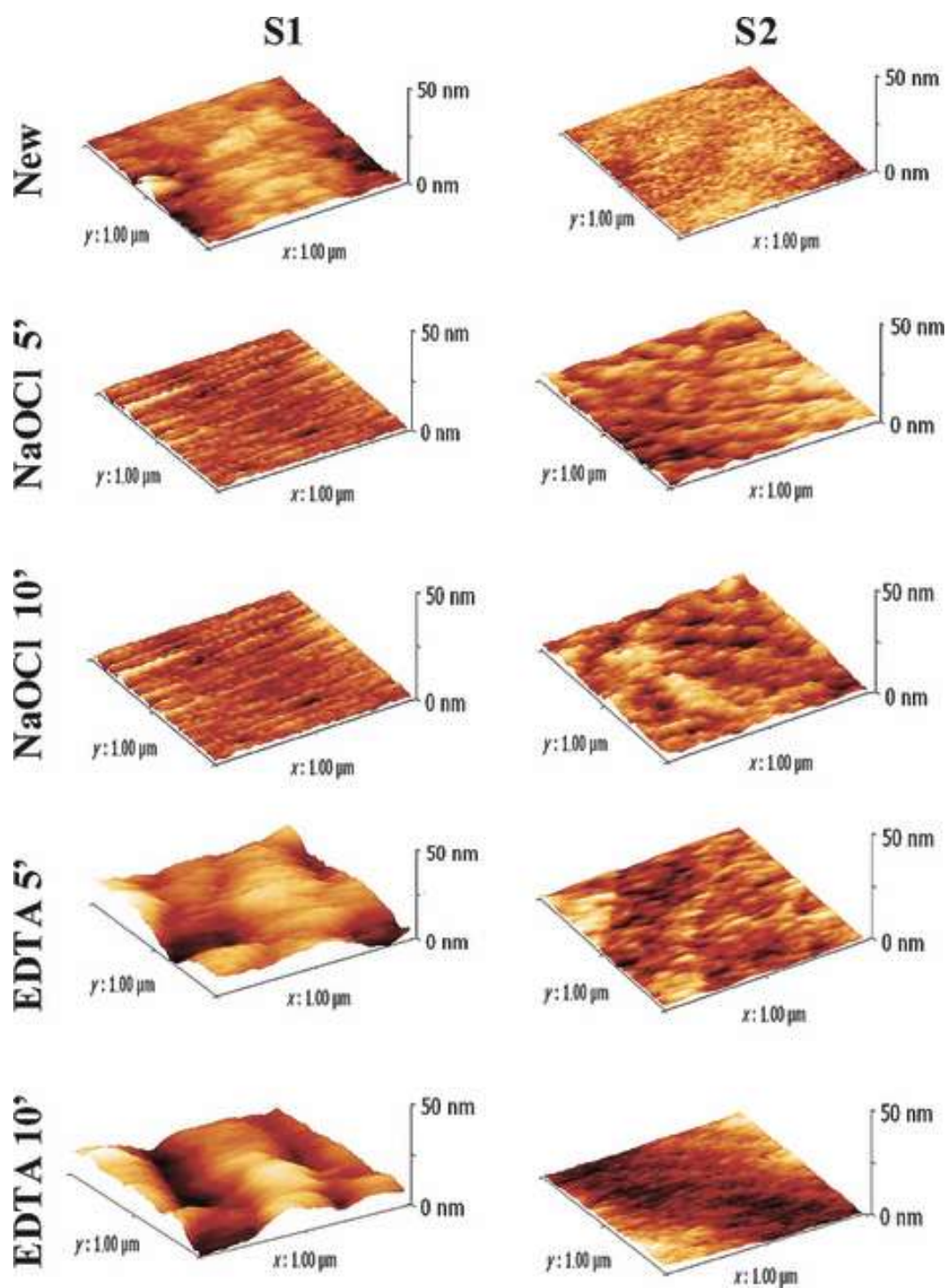


Figura 3.3: Immagini tridimensionali AFM di porzioni di superfici dei files Protaper F1 e F2 .

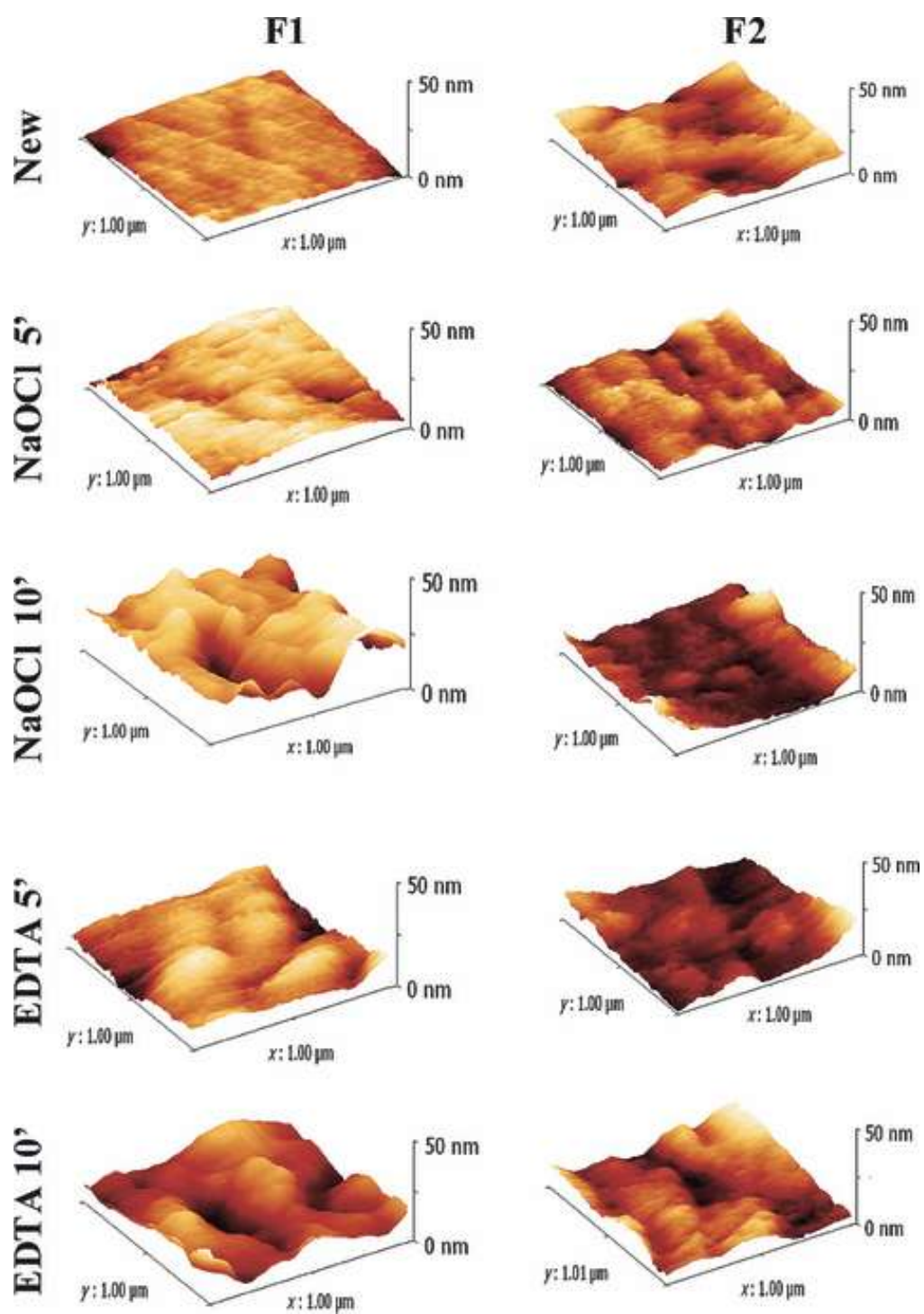


Figura 3.3: Immagini tridimensionali AFM di porzioni di superfici dei files Protaper F1 e F2 .

3.2 Discussioni

L'ipoclorito di sodio è un antimicrobico efficace, il quale ha la capacità di dissolvere i tessuti e quindi frequentemente utilizzato anche come agente di pulizia per i strumenti endodontici¹. L'EDTA è stato introdotto in endodonzia come agente chelante e lubrificante usato soprattutto nei casi di anatomie dei canali complesse, strette o calcificate, ma ha poca o nessuna attività antibatterica²⁻⁵. Nel presente studio, i cambiamenti delle superfici topografiche degli strumenti ProTaper immersi nelle soluzioni di NaOCl e di EDTA sono stati valutati usando la microscopia a scansione a forza atomica AFM. Entrambi gli irriganti causano un significativo deterioramento delle superfici degli strumenti con conseguente aumento dei parametri verticali, RMS e Ra rispetto ai nuovi strumenti. È stato dimostrato che l'immersione dei files in NaOCl 5,25% per 5 minuti causano pitting di corrosione localizzati e crepe sulla superficie che modificano l'integrità e la resistenza alla frattura degli strumenti NiTi⁶. È stato anche rilevato che strumenti NiTi immersi in soluzione al 5% di NaOCl per tempi lunghi (30 e 60 minuti) sono notevolmente corrosi dall'irrigante⁷. Inoltre, si è verificato tramite analisi a raggi X a dispersione di energia (EDX), che l'ipoclorito (NaOCl) al 5,25% influenza la composizione chimica delle superfici NiTi per tempi di immersione da 1-4 ore e le parti più colpite ed esposte sono localizzate nelle microfessure del materiale dovute e alla lavorazione e fabbricazione degli stessi strumenti⁸.

I risultati presenti in letteratura sugli strumenti endodontici a contatto con ipoclorito sono in linea con il nostro studio, mentre sono in contraddizione con altri studi recenti che non hanno riscontrato alterazioni superficiali causati da NaOCl ed EDTA sugli strumenti NiTi⁸⁻¹⁰. Darabara et al. (2004) utilizzando il metodo dei cicli di polarizzazione potenziometrica per valutare il pitting e corrosione interstiziale, caratteristiche degli strumenti NiTi esposti a soluzioni di EDTA al 17% e NaOCl al 5,25%, ha dimostrato l'elevata resistenza alla corrosione degli strumenti in entrambe le sostanze irriganti. Bonaccorso et al. (2008) ha confermato che a lungo termine il contatto tra strumenti NiTi ed EDTA non ha alterato la struttura della superficie di file. Tuttavia, i dati provenienti da questi studi riportati in letteratura sono basati su diversi tempi di contatto tra i file e irriganti e su analisi SEM invece di AFM, il che potrebbe spiegare le differenze tra i risultati. Ad oggi, l'analisi SEM è stata ampiamente utilizzata per valutare le caratteristiche delle superfici dei vari strumenti NiTi¹¹. Recentemente, l'analisi AFM è stato introdotto per fornire informazioni qualitative e quantitative, sulla topografia di vari materiali, compresi i file endodontiche^{6,12,13}. Recentemente, AFM è stato utilizzato per lo studio delle caratteristiche delle superfici degli strumenti rotanti NiTi^{6,12,13}. Le immagini tridimensionali e valori di rugosità degli strumenti rotanti analizzate nel nostro studio sono in accordo con i precedenti studi effettuati all'AFM^{6,12,13}. I dati hanno rivelato valori inferiori Ra e RMS per i strumenti S rispetto agli F, che è probabilmente da attribuire alle differenze derivanti dal processo di fabbricazione^{14,15}. Inoltre, il presente studio ha dimostrato un chiaro effetto di NaOCl sulle superfici degli strumenti ProTaper e ha fornito informazioni originali e nuove sul deterioramento provocato da contatto a breve termine tra i files e l'EDTA.

I dati sono in linea con precedenti studi AFM che hanno valutato l'effetto di NaOCl sugli strumenti rotanti RaCe⁶ e sugli strumenti ProTaper dopo l'uso clinico¹³. Tuttavia, in letteratura non sono presenti dati sull'influenza dell'EDTA sugli strumenti endodontici con analisi all'AFM. Il presente studio sembra essere il primo che ha dimostrato che l'EDTA potrebbe alterare le superfici degli strumenti endodontici NiTi. Interessante notare che i valori di RMS e Ra ottenuti dalle analisi AFM suggeriscono che l'EDTA altera le superfici dei ProTaper più che l'NaOCl. Queste differenze possono probabilmente essere attribuita al pH inferiore in EDTA rispetto NaOCl¹⁶. In sintesi, anche a tempi brevi di contatto tra le soluzioni NaOCl e EDTA e gli strumenti ProTaper, c'è un aumento dei valori di RMS e Ra, i quali indicano un effettivo deterioramento delle superfici. I risultati suggeriscono che l'AFM è un metodo adeguato per quantificare e valutare a livello nanometrico le superfici degli strumenti endodontici e gli effetti di irrigazione. Tuttavia, sono necessari ulteriori studi per confrontare l'effetto di differenti irriganti endodontici su varie superfici degli strumenti rotanti NiTi durante la performance clinica.

Riferimenti Bibliografici

- ¹ Spencer HR, Ike V, Brennan PA. Review: the use of sodium hypochlorite in endodontics-potential complications and their management. *Br Dent J* 2007;202:555-9
- ² Calt S, Serper A. Time-dependent effects of EDTA on dentin structures. *J Endod* 2002;28:17-9.
- ³ Zehnder M, Schmidlin P, Sener B, Wlatimo T. Chelation in root canal therapy reconsidered. *J Endod* 2005;31:817-20
- ⁴ Dotto SR, Travassos RM, de Oliveira MP, de Lima Machado E, Martins L. Evaluation of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) solution and gel for smear layer removal. *Aust Endod J* 2007;33:1-4.
- ⁵ Putzer P, Hoy L, Günay H. Highly concentrated EDTA gel improves cleaning efficiency of root canal preparation in vitro. *Clin Oral Investig* 2008;12:319-24.
- ⁶ Topuz O, Aydin C, Uzun O, Inan U, Alacam T, Tunca YM. Structural effects of sodium hypochlorite solution on RaCe rotary nickel-titanium instruments: an atomic force microscopy study *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008;105:661-5.
- ⁷ Busslinger A, Sener B, Barbakow F. Effect of sodium hypochlorite on nickel-titanium Lightspeed instruments. *Int Endod J* 1998;31:290-4.
- ⁸ Darabara M, Bourithis L, Zinelis S, Papadimitriou GD. Susceptibility to localized corrosion of stainless steel and NiTi endodontic instruments in irrigating solutions. *Int Endod J* 2004; 37:705-10

- ⁹ Bonaccorso A, Tripi TR, Rondelli G, Condorelli GG, Cantatore G, Schafer E. Pitting Corrosion Resistance of Nickel-Titanium Rotary Instruments with Different Surface Treatment in Seventeen Percent Ethylenediaminetetraacetic Acid and Sodium Chloride Solutions. *J Endod*. 2008 Feb;34:208-11
- ¹⁰ Cavalleri G, Cantatore G, Costa A, Grillenzoni M, Comin Chiaramonti L, Gerosa R. The corrosive effects of sodium hypochlorite on nickel-titanium endodontic instruments: assessment by digital scanning microscope. *Minerva Stomatol* 2009;58:225-31.
- ¹¹ Cazaux J. Recent developments and new strategies in scanning electron microscopy. *J Microsc* 2005;217:16-35.
- ¹² Valois CR, Silva LP, Azevedo RB. Multiple autoclave cycles affect the surface of rotary nickel-titanium files: an atomic force microscopy study. *J Endod* 2008;34:859-62.
- ¹³ Inan U, Aydin C, Uzun O, Topuz O, Alacam T. Evaluation of the surface characteristics of used and new ProTaper Instruments: an atomic force microscopy study *J Endod* 2007;33:1334-7.
- ¹⁴ Martins RC, Bahia MG, Buono VT. Surface analysis of ProFile instruments by scanning electron microscopy and X-ray energy-dispersive spectroscopy: a preliminary study. *Int Endod J* 2002;35:848-53.
- ¹⁵ Alpati SB, Brantley WA, Svec TA, Power JM, Mitchell SC. Scanning electron microscope observations of new and used nickel-titanium rotary files. *J Endod* 2003;667-9
- ¹⁶ Bayramoğlu G, Alemdaroğlu T, Kedici S, Aksüt AA. The effect of pH on the corrosion of dental metal alloys. *J Oral Rehabil* 2000;27:563-75.

Capitolo IV

Effetti sulle superfici degli strumenti rotanti al Nichel-Titanio dei cicli multipli di sterilizzazione valutati con analisi SEM con EDS e AFM

In questo capitolo saranno riportate le immagini SEM con i relativi spettri delle relative specie atomiche dei campioni testati e i parametri di rugosità superficiale tramite studio AFM degli strumenti trattati e non dopo vari cicli di sterilizzazione in autoclave.

4.1 Risultati, Analisi SEM con EDS

Nel nostro studio abbiamo ottenuto immagini tridimensionali al SEM di 8 files, quattro per ogni brand (Protaper, Alphakite) in Nichel-Titanio nuovi e sterilizzati per 1, 5 e 10 cicli in autoclave. Le immagini e i rispettivi spettri li abbiamo confrontati. Nella figura 1 e 2 sono mostrate le immagini SEM rappresentative, con ingrandimento 1000x, degli strumenti al Nichel-Titanio, AlphaKite (Komet, Lemgo, Germania) e Protaper (Densply Maillefer, Swiss Made) appartenenti al gruppo controllo.

Dalle immagini si evince che i due files sono di geometria diversa, ma soprattutto presentano, strisce di metallo e segni di fresatura profonda (Fig. 4.1,4.2) dovute alle tecniche di lavorazione. I campioni successivamente sono stati sottoposti a vari cicli di sterilizzazione 1, 5, 10 cicli di autoclave. Come si evince dalle immagini al microscopio elettronico SEM, con il supporto dell'analisi energetica spettroscopica dispersiva (EDS), la quale ci ha fornito la composizione in percentuale degli elementi dei campioni (Tab. 4.1,4.2); ha indicato che per entrambi i tipi di files un incremento della rugosità superficiale, con la presenza di inclusioni e fori, distribuiti in modo casuale nella matrice della lega NiTi (Fig. 4.3-4.8). Questi risultati sono da attribuire ad alterazioni morfometriche nella composizione chimica indotta dalla procedura di sterilizzazione. L'analisi delle immagini supportata dall'EDS ha mostrato un incremento della rugosità superficiale con il crescere dei cicli di autoclave soprattutto per i files non trattati, senza copertura in Nitrato di Titanio. All'analisi dell'EDS, le leghe, di manifattura diversa, hanno presentato composizioni chimiche in percentuali differenti (Tab.4.1,4.2). I Protaper sono composti principalmente da Nichel (54,15 %) e Titanio (43,66%) (Fig. 4.9), mentre gli AlphaKite avendo un coating di Nitrato di Titanio (TiN) hanno mostrato una percentuale di Titanio (46,24%) molto più alta rispetto a quella di Nichel (30,38%), con un alta percentuale di Azoto (N) (21,08%) (Fig.4.10). Tracce di alluminio sono stati individuati in tutti i campioni. Mentre solo negli Alphakite sono state trovate tracce di Silicio (Si) e Magnesio (Mg).

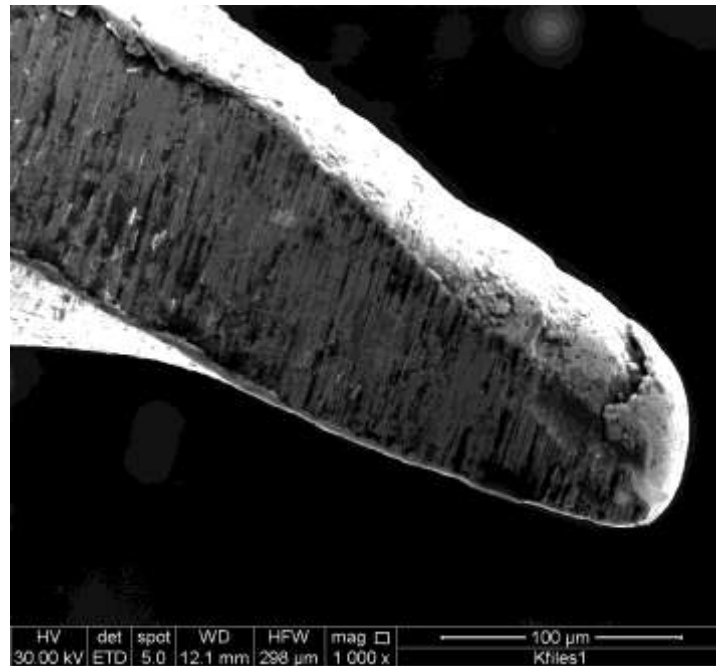


Figura 4.1: Immagine SEM ad ingrandimento 1000x della punta un AlphaKite (Komet, Lemgo, Germania) nuovo

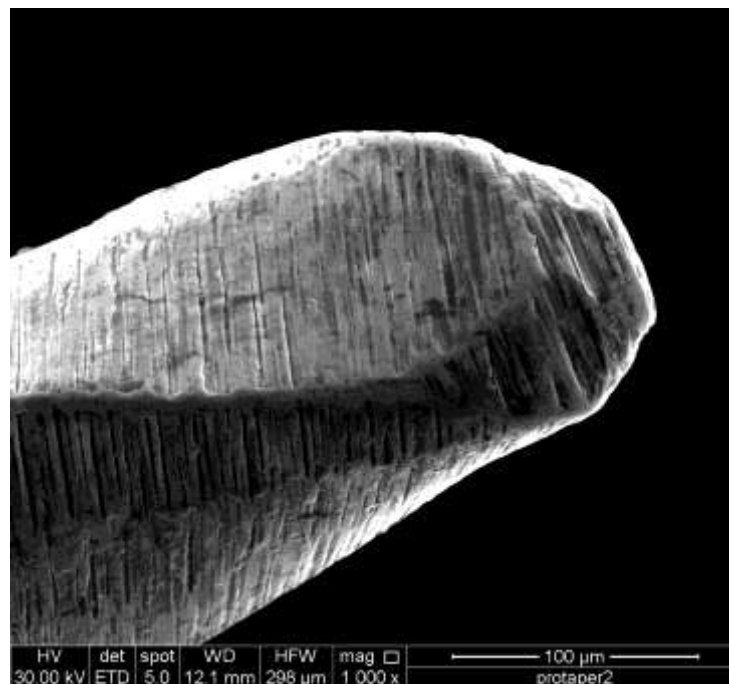


Figura 4.2: Immagine SEM ad ingrandimento 1000x della punta un Protaper (Densply Maillefer, Swiss Made)

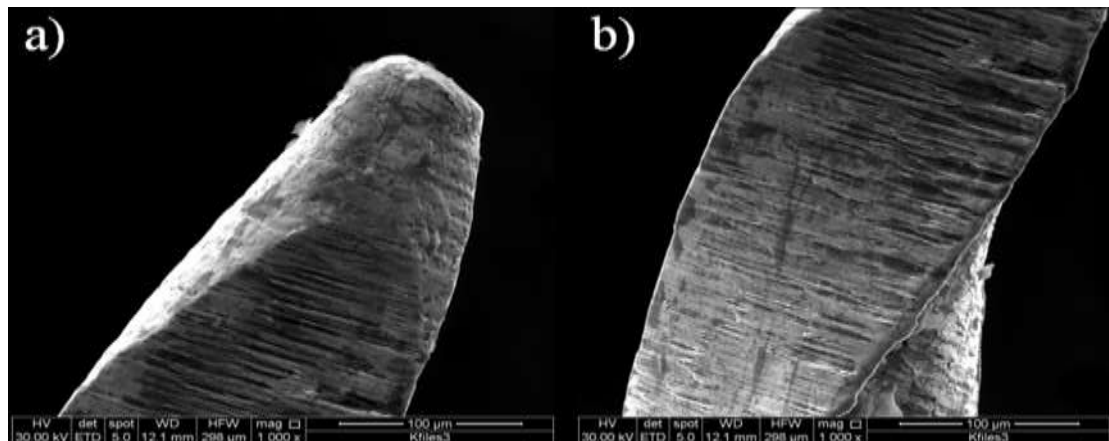


Figura 4.3: Immagini SEM con ingrandimento 1000x di un AlphaKite dopo un ciclo di autoclave. a) punta dello strumento; b) porzione centrale dello strumento

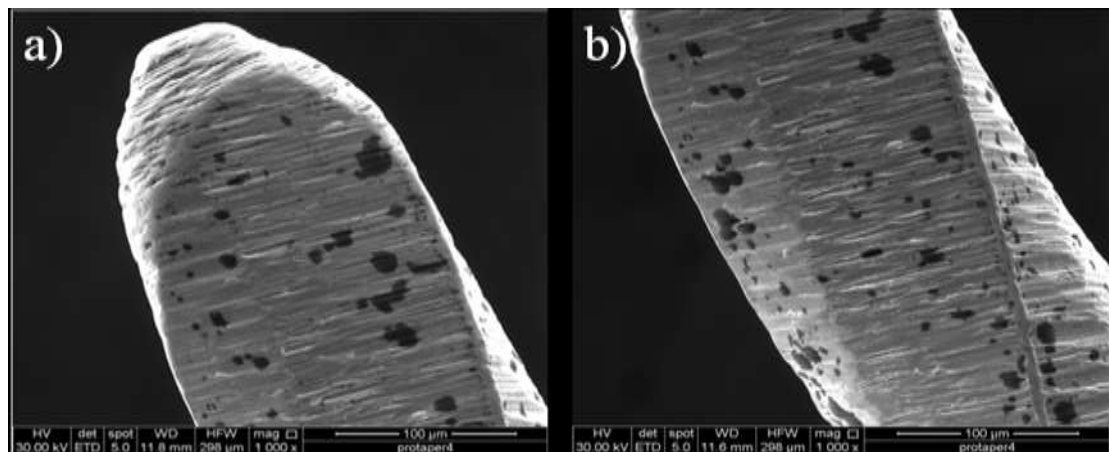


Figura 4.4: Immagini SEM con ingrandimento 1000x di un Protaper dopo 1 ciclo di autoclave. a) punta dello strumento; b) porzione centrale dello strumento

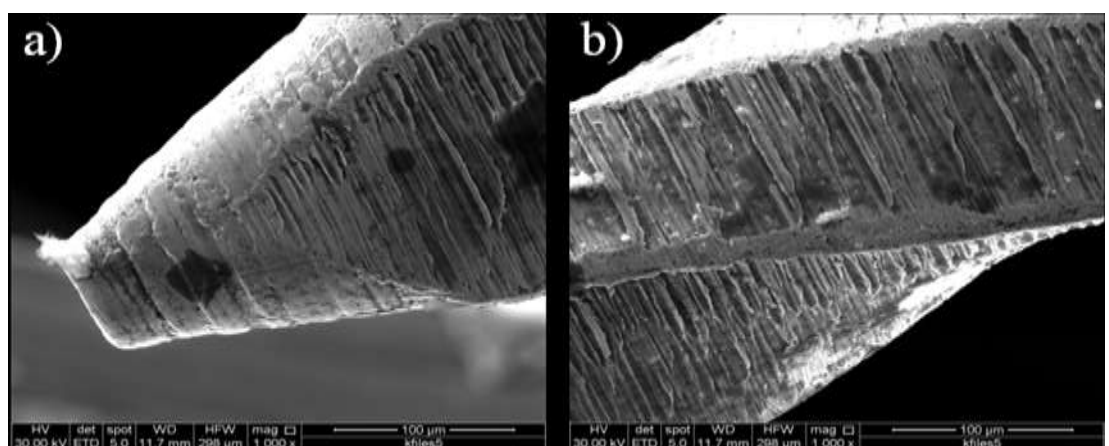


Figura 4.5: Immagini SEM con ingrandimento 1000x di un AlphaKite dopo 5 ciclo di autoclave. a) punta dello strumento; b) porzione centrale dello strumento

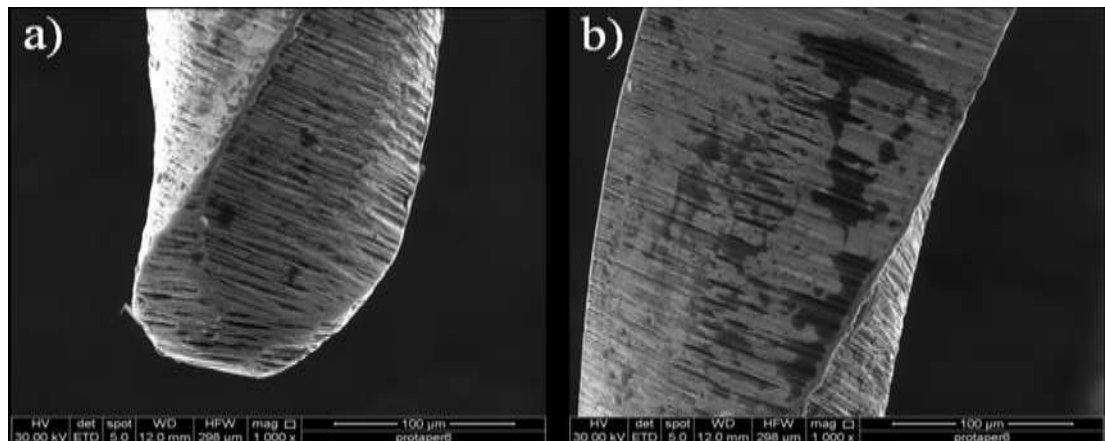


Figura 4.6: Immagini SEM con ingrandimento 1000x di un Protaper dopo 5 ciclo di autoclave. a) punta dello strumento; b) porzione centrale dello strumento

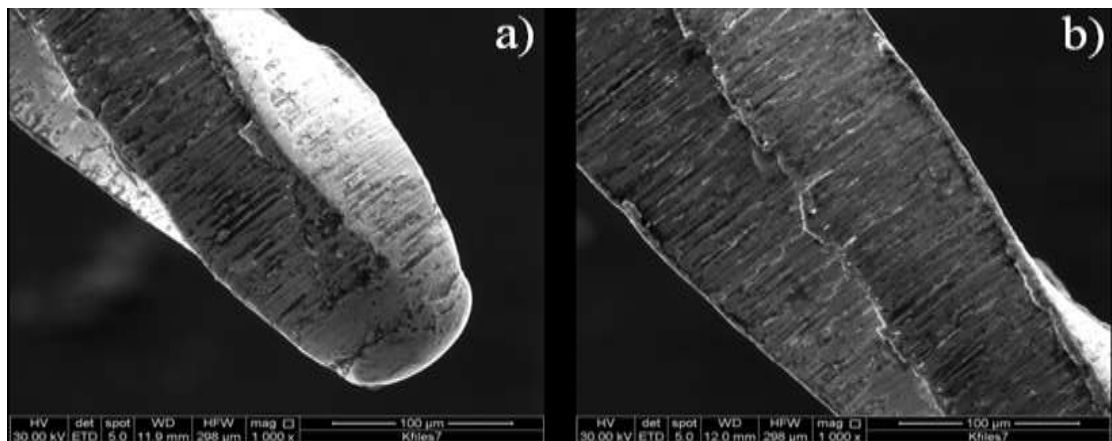


Figura 4.7: Immagini SEM con ingrandimento 1000x di un AlphaKite dopo 10 ciclo di autoclave. a) punta dello strumento; b) porzione centrale dello strumento.

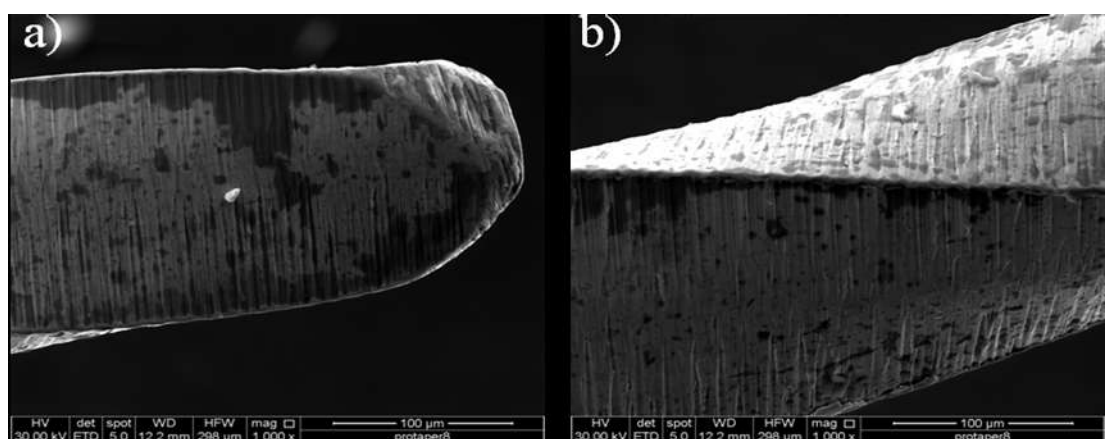


Figura 4.8: Immagini SEM con ingrandimento 1000x di un Protaper dopo 10 ciclo di autoclave. a) punta dello strumento; b) porzione centrale dello strumento.

Kfile	Controllo	1 ciclo	5 cicli	10 cicli
Titanio (Ti)	46,24	44,88	50,84	44,88
Nickel (Ni)	30,38	44,2	36,97	44,68
Azoto (N)	21,08	13,89	10,62	9,98
Alluminio (Al)	1,39	0,7	0,63	3,4
Silicio (Si)	0,47	0,32	0,53	0,55
Magnesio (Mg)	0,44	0,25	0,41	0,51

Tabella 4.1: Percentuali in peso delle varie specie atomiche che costituiscono la lega metallica dello strumento rotante AlphaKite

Protaper	Controllo	1 ciclo	5 cicli	10 cicli
Titanio (Ti)	43,66	39,56	42,74	39,14
Nickel (Ni)	54,15	48,71	52,4	47,94
Azoto (N)	0	0	0	0
Alluminio (Al)	2,19	1,42	4,86	5,23
Silicio (Si)	0	0	0	0
Magnesio (Mg)	0	0	0	0

Tabella 4.2: Percentuali in peso delle varie specie atomiche che costituiscono la lega metallica dello strumento rotante Protaper

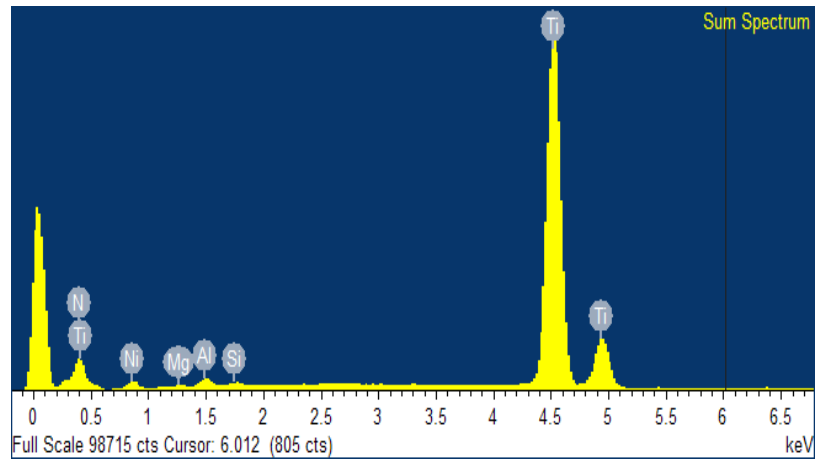


Figura 4.9: Spettro a Raggi X in cui i vari picchi identificano le diverse specie atomiche di cui è costituito il campione (Protaper)

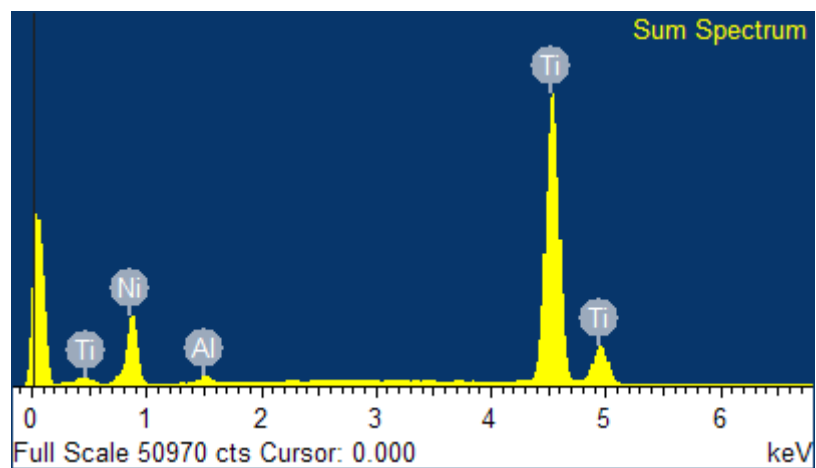


Figura 4.10: Spettro a Raggi X in cui i vari picchi identificano le diverse specie atomiche di cui è costituito il campione (Alphakite)

4.2 Discussioni, Analisi SEM con EDS

Le osservazioni al microscopio elettronico a scansione di strumenti rotanti NiTi nuovi e trattati con ripetuti cicli di autuocalve, hanno presentano irregolarità sulla maggior parte dei campioni anche di brand differenti. Sulle superfici degli strumenti sono state rilevate detriti, pitting e stirature. La presenza di materiale sulla superficie probabilmente è da attribuire alla decomposizione o l'ossidazione dell'olio lubrificante usato nel taglio e nella lavorazione dello strumento durante la fabbricazione ^{1,2}. Morfometriche variazioni tra gli strumenti della stessa marca può essere attribuito alla termomeccanica di ogni strumento durante la sua produzione. Questi risultati sono in accordo con i risultati di altri autori che hanno segnalato difetti strutturali su files nuovi dovuti alla fabbricazione ³⁻⁵. Come si vede dalle immagini i files che hanno il rivestimento di TiN, depositato con la tecnica di evaporazione fisica (PVD) per l'aumento della resistenza alla frattura; presentano le superfici di taglio poco acuminate con profilo non regolare. Le conseguenze di queste imperfezioni, potrebbero in termini di durata e di efficienza di taglio nell'uso clinico, essere determinanti. Secondo Schafer ⁶ e Thompson¹ la presenza di questi difetti sulle superfici di taglio degli strumenti, potrebbe essere responsabile della loro relativamente bassa efficacia e potrebbe compromettere la loro resistenza alla corrosione. D'altra parte, Eggert et al.⁴ ha sostenuto che la presenza di questi imperfezioni non era probabilmente pertinente alla loro prestazioni cliniche. In tutti i campioni che sono stati sottoposti a ripetuti cicli di sterilizzazione, una maggiore rugosità superficiale si è verificato rispetto a quelli che non sono stati sterilizzati.

Una possibile spiegazione potrebbe essere un'alterazione nel spessore del passivo strato di ossido che copre le superfici NiTi superfici. Rapisarda et al.⁷ e Thierry et al.^{8,9} hanno trovato un aumento di ossido di TiO₂ sullo strato superficiale di leghe NiTi che sono stati esposti a sterilizzazione. In questo studio, sostanziale variabilità dei valori si è verificato (Tabella 4.3,4.4) tra i campioni di marche diverse, nonché tra i campioni della stessa marca. Questa è da attribuita dalla diversa composizione chimica degli strumenti di marche diverse. Come infatti nello stesso studio progettato anche di valutare la composizione atomica dei 2 differenti strumenti endodontici rotanti tramite la spettroscopia a raggi X (EDS). Le tracce di alluminio rilevate in entrambi campioni di marchi diversi in quantità minime sono probabilmente dovute per l'assemblaggio finale dei file durante il quale gli strumenti lavorati, viene tirato sotto pressione il gambo in alluminio. Le tracce di silicio e magnesio presenti negli Alphakite potrebbe essere dovuto o alla presenza di tappi di silicone, ma soprattutto da una lega metallica meno raffinata. Un punto interessante è la presenza di pitt distribuiti omogeneamente su tutta la superficie per i files Protaper, che all'aumentare dei cicli di sterilizzazione tendono sempre di più ad allargarsi su tutta la superficie. Le differenze nelle proprietà fisiche tra gli strumenti endodontici analizzati è da attribuire alla progettazione e alle caratteristiche diverse. Entro i limiti di questo studio, i risultati sembrano indicare gli AlphaKite come gli strumenti che resistono meglio a livello superficiale ai cicli di sterilizzazione, grazie al coating di TiN, il quale, però penalizza le superfici di taglio dello strumento.

Quindi altri studi in vitro e in vivo serviranno affinché le due tipologie e filosofie di concepimento di questi due strumenti possa apportare nuove informazioni all'operatore nella pratica clinica.

4.4 Risultati, Analisi AFM

Nello studio specifico abbiamo ottenuto immagini tridimensionali della topografia superficiale di otto files, quattro per ogni brand (Protaper, Alphakite) in Nichel-Titanio nuovi e sterilizzati per 1,5 e 10 cicli in autoclave. Le immagini le abbiamo elaborate con il software Gwyddion[®] e le abbiamo confrontate. In tutti i fili analizzati sono state osservate irregolarità topografiche che sono state misurate con scala nanometrica. Per individuare eventuali differenze statisticamente significative nella topografia della superficie dei diversi files, sono stati valutati i parametri topografici verticali. Le misurazioni sono state effettuate prendendo in considerazione dei parametri statistici che sono la rugosità media (Ra) e la rugosità quadratica media (Rms). I valori sono stati espressi come media \pm la deviazione standard. I valori sono stati espressi come media \pm la deviazione standard. Analizzando questi dati si è verificato che c'è stato un aumento della rugosità superficiale statisticamente significativa per i files immersi negli irriganti canalari rispetto ai gruppi controllo (Fig. 4.11). L'esposizione dei campioni, per entrambi brand, ai cicli di autoclave aumenta i parametri di rugosità Ra ed RMS con valori sempre più elevati con il crescere del numero di sterilizzazioni confrontati con il campione del gruppo controllo ($p < 0.05$).

Per i Protaper si è verificata un incremento significativo rispetto al controllo per 5 cicli e 10 cicli, mentre per gli Alphakite l'incremento dei parametri Ra ed RMS non è risultato significativo rispetto al gruppo controllo (Tab. 4.3,4.4).

Ra	AlphaKite	Protaper
New	156,3 5± 25,40	171,22 ± 31,18
1 Cycle	165,22 ± 20,35	200,15 ± 37,32
5 Cycles	180,27 ± 27,31	350,37 ± 29,38*
10 Cycles	255,21 ± 39,27	512,11 ± 42,87*

Tabella 4.3: Media ± Deviazione standar dei valori di Ra (nm) per il gruppo sperimentale. L'* rappresenta la significatività (Student t Test) tra i files nuovi e quelli sterilizzati [$P < 0.05$].

RMS	AlphaKite	Protaper
New	198,45± 72,80	203,75 ± 43,81
1 Cycle	250,35 ± 31,20	345,17 ± 38,91
5 Cycles	270,15 ± 32,30	715,22 ± 47,71*
10 Cycles	301,32 ± 35,10	829,19 ± 39,16*

Tabella 4.4: Media ± Deviazione standar dei valori di RMS (nm) per il gruppo sperimentale. L'* rappresenta la significatività (Student t Test) tra i files nuovi e quelli sterilizzati [$P < 0.05$].

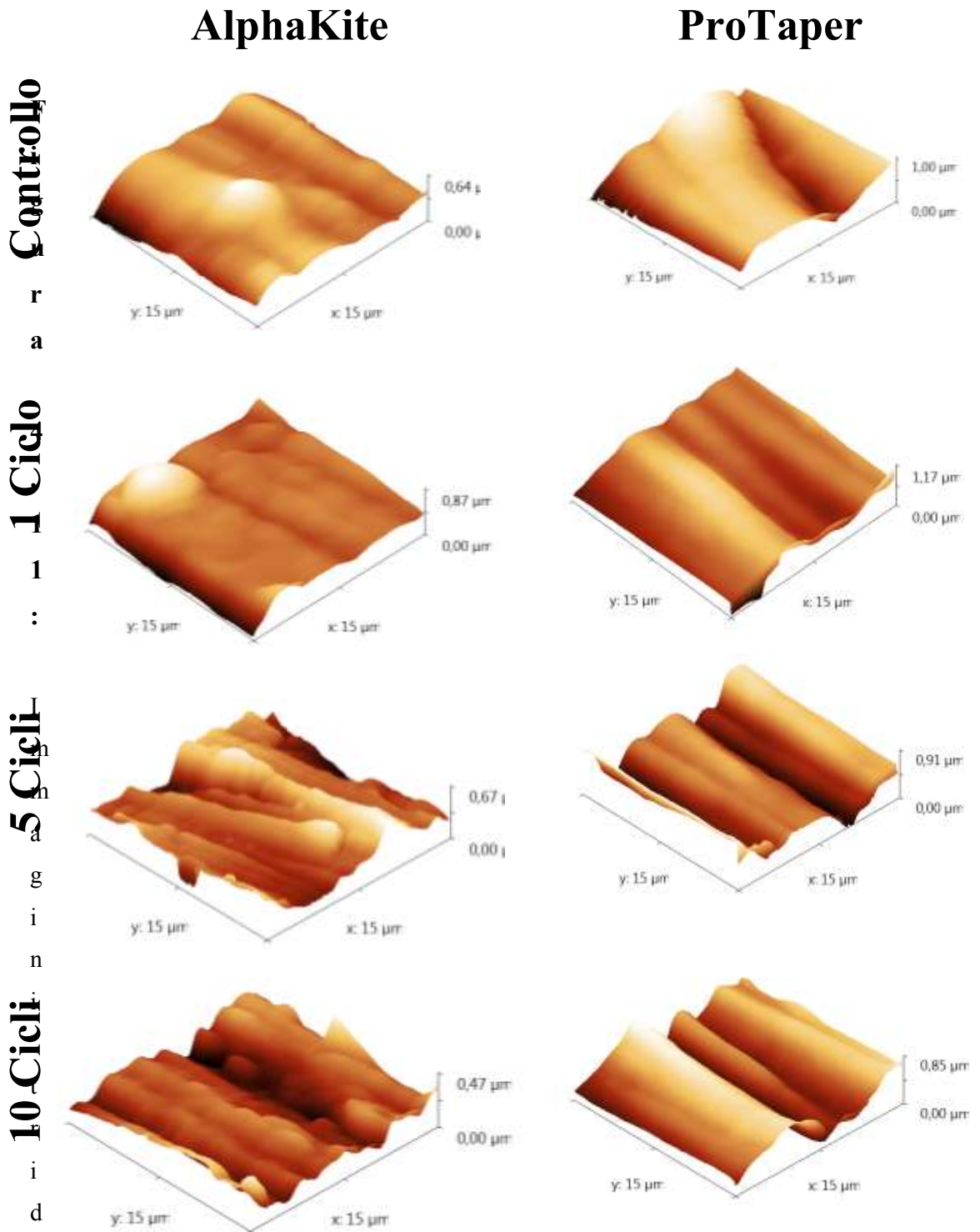


Figura 4.11: Immagini tridimensionali AFM di porzioni di superfici dei files AlphaKite e Protaper.

4.5 Discussioni, Analisi AFM

Gli effetti dei cicli in autoclave sui strumenti rotanti NiTi ha delle ripercussioni principalmente sulle proprietà meccaniche, di resistenza alla frattura ed efficienza di taglio ¹⁰⁻¹³. Tuttavia, nel valutare la qualità dei strumenti NiTi, è di estrema importanza considerare il carattere superficie, perché questo determina la resistenza alla corrosione di tali strumenti nel quadro di un ampio gamma di condizioni. Nel nostro studio abbiamo eseguito un'analisi di superficie a largo spettro, sia con metodo standard (SEM), largamente utilizzato per questo tipo di caratterizzazione di superfici metalliche, sia il metodo AFM, per la tecnica affidabile che offre, mezzo idoneo per l'acquisizione di dati qualitativi e quantitativi concernenti la topografia di superficie su scala nanometrica. Come si osserva dalle immagini rappresentative AFM, la superficie dei files rotanti dei gruppi controllo mostrano una topografia irregolare, dovuta ai processi di produzione (Fig.4.11). Per valutare se la profondità di irregolarità aumenta dopo molteplici cicli di autoclave, 2 differenti parametri verticali topografici (Ra ed RMS) sono stati valutati. In questo caso, si è constatato che il processo di sterilizzazione è stato in grado di aumentare i parametri Ra ed RMS della topografia di superficie sia nei Protaper che negli Alphakite (Fig.4.11). È ben noto che l'aumentano di irregolarità della superficie è associata con il meccanismo di frattura degli strumenti NiTi durante l'uso clinico, soprattutto nei canali curvi ¹⁴⁻¹⁶. Inoltre, è stato dimostrato che le irregolarità di superficie anche in modo sostanziale influenzano l'efficienza di taglio e pulizia di tali strumenti ^{14,17,18}.

Pertanto, i nostri risultati per le irregolarità topografiche rilevate dopo l'esposizione all'autoclave potrebbe avere una rilevanza clinica. È interessante notare che il numero di cicli necessari per aumentare la profondità delle irregolarità lungo la superficie cambia tra i diversi brand. Considerando che la sterilizzazione aumentano i parametri topografici superficiali Ra ed RMS dopo 5 cicli in autoclave se confrontato con il controllo, trovando un incremento ancor maggiore dopo 10 cicli (Fig.4.11). Ma negli AlphaKite l'incremento dei parametri di rugosità non è statisticamente significativo rispetto al controllo ($p < 0.05$), mentre nei Protaper l'incremento di rugosità è significativa ($p < 0.05$). Sebbene la natura di questi fenomeni non è chiara, questo risultato apparentemente contraddittorio potrebbe essere spiegato con le differenze nel processo di fabbricazione. Questo è confermato da studi che hanno dimostrato differenze sulle caratteristiche della superficie tra gli strumenti endodontici fabbricati utilizzando diverse lega di composizione o metodo di produzione^{19,20}. Infatti, gli Alphakite sono stati concepiti per essere più resistenti alla corrosione e alla frattura grazie ad un rivestimento aggiuntivo in Nitrato di Titanio (TiN). La tecnica di *Physics Vapor Deposition* PVD è una tecnica di deposizione ampiamente utilizzata per gli strumenti chirurgici. La deposizione per evaporazione viene spesso usata per creare rivestimenti duri compresi TiN, TiC, TiCN e TiAlN²¹. Come abbiamo detto in precedenza, le variazioni topografiche dopo un ciclo di sterilizzazione non sono riscontrabili, mentre l'effetto indesiderato è osservato solo dopo un certo numero di procedure di autolavaggio^{11,12}, probabilmente perché l'autoclave ha un effetto cumulativo sulla struttura dei file rotanti NiTi.

Inoltre, è importante ricordare che i fattori clinici, tra cui sollecitazioni prodotte durante la pratica endodontica e immersione nelle soluzioni disinfettanti mostrano, come anche il nostro studio all'AFM sugli irriganti canalari, che anche questi fattori sono causa di deterioramento degli strumenti NiTi^{18,22}. Tali fattori probabilmente contribuiscono ad accelerare la corrosione della superficie dei files rotanti NiTi file esposti in autoclave. Pertanto, l'uso singolo o il riutilizzo minimo dei files NiTi potrebbe essere una pratica sicura durante la terapia endodontica. L'effetto negativo di superficie del processo di sterilizzazione sugli strumenti NiTi è stata esaminata con la tecnica su scala nanometrica grazie all'AFM. I risultati hanno mostrato che più aumentano i cicli di autoclave, più aumentano i solchi e le irregolarità sulla superficie della lega. Inoltre, si è verificato che il numero di cicli necessari per provocare questo effetto sulla topografia superficiale è cambiato tra i diversi brand. Tuttavia, il singolo ciclo di autoclave non era pregiudizievole sulla bontà dello strumento. Questi risultati sono promettenti dal punto di vista clinico nello stabilire il numero adeguato di riutilizzo dello strumento durante la pratica endodontica.

Riferimenti Bibliografici

- ¹ Thompson SA (2000) An overview of nickel–titanium alloys used in dentistry. *International Endodontic Journal* 33, 297–310.
- ² Martins RC, Bahia MGA, Buono VTL (2002) Surface analysis of ProFile instruments by scanning electron microscopy and X-ray energy-dispersive spectroscopy: a preliminary study. *International Endodontic Journal* 35, 848–53.
- ³ Marsicovetere ES, Clement DJ, del Rio CE (1996) Morphometric video analysis of the engine driven nickel–titanium Lightspeed instrument system. *Journal of Endodontics* 22, 231–5.
- ⁴ Eggert C, Peters O, Barbakow F (1999) Wear of nickel–titanium Lightspeed instruments evaluated by scanning electron microscopy. *Journal of Endodontics* 25, 494–7.
- ⁵ Alapati SB, Brantley WA, Svec TA, Powers JM, Mitchell JC (2003) Scanning electron microscope observations of new and used nickel–titanium rotary files. *Journal of Endodontics* 29, 667–9.
- ⁶ Schäfer E (2002) Effect of sterilization on the cutting efficiency of PVD-coated nickel–titanium endodontic instruments. *International Endodontic Journal* 35, 867–72.
- ⁷ Rapisarda E, Bonaccorso A, Tripi TR, Condorelli GG (1999) Effect of sterilization on the cutting efficiency of rotary nickel–titanium endodontic files. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics* 88, 343–7.
- ⁸ Thierry B, Tabrizian M, Savadogo O, Yahia LH (2000a) Effects of sterilization processes on NiTi alloy: surface characterization. *Journal of Biomedical Materials Research* 49, 88–98.

- ⁹ Thierry B, Tabrizian M, Trepanier C, Savadogo O, Yahia LH (2000) Effects of surface treatment and sterilization processes on the corrosion behavior of NiTi shape memory alloy. *Journal of Biomedical Materials Research* 51, 685–93.
- ¹⁰ Mize SB, Clement DJ, Pruett JP, Carnes DL Jr. Effect of sterilization on cyclic fatigue of rotary nickel-titanium endodontic instruments. *J Endod* 1998;24:843–7.
- ¹¹ Rapisarda E, Bonaccorso A, Tripi TR, Condorelli GG. Effect of sterilization on the cutting efficiency of rotary nickel-titanium endodontic files. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1999;88:343–7.
- ¹² Schäfer E. Effect of sterilization on the cutting efficiency of PVD-coated nickel-titanium endodontic instruments. *Int Endod J* 2002;35:867–72.
- ¹³ Viana AC, Gonzalez BM, Buono VT, Bahia MG. Influence of sterilization on mechanical properties and fatigue resistance of nickel-titanium rotary endodontic instruments. *Int Endod J* 2006;39:709 –15.
- ¹⁴ Alapati SB, Brantley WA, Svec TA, Powers JM, Nusstein JM, Daehn GS. SEM observations of nickel-titanium rotary endodontic instruments that fractured during clinical use. *J Endod* 2005;31:40 –3.
- ¹⁵ Eggert C, Peters O, Barbakow F. Wear of nickel-titanium lightspeed instruments evaluated by scanning electron microscopy. *J Endod* 1999;25:494 –7.
- ¹⁶ Yokoyama K, Kaneko K, Yabuta E, Asaoka K, Sakai J. Fracture of nickel–titanium superelastic alloy in sodium hypochlorite solution. *Mater Sci Eng A* 2004;369:43– 8.
- ¹⁷ Assender H, Bliznyuk V, Porfyrakis K. How surface topography relates to materials properties. *Science* 2002;297:973– 6.
- ¹⁸ O’Hoy PY, Messer HH, Palamara JE. The effect of cleaning procedures on fracture properties and corrosion of NiTi files. *Int Endod J* 2003;36:724 –32.
- ¹⁹ Valois CR, Silva LP, Azevedo RB. Atomic force microscopy study of stainless-steel and nickel-titanium files. *J Endod* 2005;31:882–5.

- ²⁰ Darabara M, Bourithis L, Zinelis S, Papadimitriou GD. Assessment of elemental composition, microstructure, and hardness of stainless steel endodontic files and reamers. *J Endod* 2004;30:523–6.
- ²¹ Smith DL (1995) *Thin Film Deposition: Principles and Practice*. New York, USA: McGraw-Hill.
- ²² Inan U, Aydin C, Uzun O, Topuz O, Alacam T. Evaluation of the surface characteristics of used and new ProTaper Instruments: an atomic force microscopy study. *J Endod* 2007;33:1334–7.

Conclusioni

Negli ultimi decenni è avvenuto un enorme sviluppo tecnologico sempre più rivolto all'infinitamente piccolo, al fine di migliorare le tecniche d'indagine e quindi l'ottimizzazione anche delle pratiche cliniche. I risultati del nostro lavoro portano alla luce l'importanza da parte di tutti gli operatori, di tenere sempre ben presente il numero di volte che uno strumento viene utilizzato per trattare i canali radicolari. È risaputo che l'utilizzo degli strumenti al NiTi in canali stretti, tortuosi o calcificati, comporta inevitabilmente una minore durata dello strumento per l'enorme lavoro effettuato. Tuttavia, da questo studio si evince che anche in canali di facile strumentazione, dove lo strumento non è soggetto a grandi attriti, non bisogna mai dimenticare il ruolo che hanno le soluzioni irriganti sulla superficie degli strumenti endodontici e non meno i ripetuti processi di sterilizzazione al NiTi. Piccole accortezze, come scrivere il numero di volte che si utilizza un singolo strumento, possono evitare incresciosi inconvenienti quali la frattura in punta dello strumento che porta inevitabilmente al fallimento della terapia canalare. In ultimo, non di mena importanza, per l'abbattimento dell'insuccesso nella pratica endodontica, non va dimenticato l'influenza sul deterioramento dello strumento delle tecniche di fabbricazione e di manifattura. Come si evince dallo studio, una superficie non perfettamente liscia, ma stirata, irregolare contribuisce alla formazione di insenature e crepe, punti sensibili al deterioramento e alla corrosione. Quindi per un miglioramento progressivo di questi strumenti la ricerca dovrà concentrarsi sia sulle tecniche investigative ma soprattutto sulle tecniche di fabbricazione.