



Universidade Estadual Paulista – UNESP
Faculdade de Odontologia de Araraquara



PATRICIA GABRIELA SABINO VIANA

Influência de diferentes métodos de esterilização de esmalte dental sobre sua morfologia, composição química, estrutura e formação de biofilmes *in vitro*

Araraquara

2013



Universidade Estadual Paulista – UNESP
Faculdade de Odontologia de Araraquara



PATRICIA GABRIELA SABINO VIANA

Influência de diferentes métodos de esterilização de esmalte dental sobre sua morfologia, composição química, estrutura e formação de biofilmes *in vitro*

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Reabilitação Oral, Área de Prótese, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para a obtenção do título de Doutor em Reabilitação Oral.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Vergani

Araraquara

2013

PATRICIA GABRIELA SABINO VIANA

Influência de diferentes métodos de esterilização de esmalte dental sobre sua morfologia, composição química, estrutura e formação de biofilmes *in vitro*

COMISSÃO JULGADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

Prof. Carlos Eduardo Vergani
Profa. Dra. Carolina Patrícia Aires
Profa. Cecilia Pedroso Turssi
Prof. Marcelo Ornaghi Orlandi
Profa. Juliane Tanomaru

Araraquara, 18 de Julho de 2013

Dados Curriculares

Patricia Gabriela Sabino Viana

Nascimento: 10/07/1980 – Bariri – SP

Filiação: Misael Sabino Viana

Maria Regina Fodra Sabino Viana

2000 - 2006: Curso de Graduação - Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

2007 - 2009: Curso de Pós-Graduação em Odontologia, nível mestrado - Reabilitação Oral (Área de Prótese), na Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

2009 – 2013 Curso de Pós-graduação em Odontologia, nível de doutorado – Reabilitação Oral (Área de Prótese) na Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

Dedicatória

Aos meus queridos pais, **Regina e Misael**.

Por todo esforço e incentivo para minha formação acadêmica.
Minha gratidão apresenta proporções tão extensas que não pode ser expressa apenas em palavras.

Agradecimentos

A **Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP**, pelo acolhimento durante estes 13 anos.

Ao **Programa de Pós-graduação em Reabilitação Oral da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP**, pela contribuição à minha formação como mestre e doutora.

À **FAPESP**, pelas concessões da bolsa de doutorado e do auxílio regular à Pesquisa (Processos 2011/09416-0 e 2011/10358-4).

Aos Professores **Marcelo Ornaghi Orlandi, Sidney José de Lima Ribeiro, Edison Pecoraro e Peter Hammer** e por todo apoio durante a realização e análise dos dados referentes as análises MEV/EDS, Raman e XPS.

Aos Professores **Altair Antoninha Del Bel Cury e Wander Jose da Silva** pela colaboração para a padronização da etapa microbiológica.

A amiga **Syble Saska**, pelo auxílio durante a tabulação dos dados obtidos pela análise Raman.

Aos técnicos do Instituto de Química da UNESP **Tarek Fernandes e Silvia Sanganelli**, pelo auxílio na realização dos testes MEV e RMN.

As técnicas do Laboratório de Microbiologia Aplicada **Érica de Carvalho e Raissa Accarini** pela dedicação e auxílio durante a rotina de experimentos microbiológicos.

Aos meus colegas de turma, pelo incentivo.

Agradecimentos

Ao meu querido orientador **Prof. Carlos Vergani**, que tem compartilhado seu conhecimento e experiência comigo durante minha iniciação científica, mestrado e doutorado.

Tudo o que sei hoje, devo a você, Professor.

Muito obrigada por tudo.

“Algo só é impossível até que alguém
duvide e prove o contrário”

Albert Einstein

VIANA, PGS. Influência de diferentes métodos de esterilização de esmalte dental sobre sua morfologia, composição química, estrutura e formação de biofilmes *in vitro*. Araraquara, 2013. 153 f. Tese (Doutorado em Reabilitação Oral - Prótese) – Faculdade de Odontologia, Campus de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Resumo

O processo de esterilização deve preservar as propriedades do esmalte utilizado nas pesquisas *in vitro* e *in situ*. O objetivo deste estudo foi avaliar a influência dos métodos de esterilização Irradiação por micro-ondas - IM, Irradiação gamma - IG, Óxido de etileno – OE e Autoclave – AU sobre as propriedades do esmalte. O estudo foi realizado em duas fases. Na fase 1, 50 espécimes de esmalte bovino foram divididos em cinco grupos (n=10): IM, IG, OE, AU e controle (não esterilizado). Foram realizadas avaliações quanto à morfologia (Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV superficial e em secção transversal), composição química (Energia Dispersiva de raios-X – EDS e Espectroscopia Fotoeletrônica por raios-X - XPS) e estrutura (Raman e Ressonância Magnética Nuclear - RMN). Na fase 2, 360 espécimes de esmalte bovino foram divididos em quatro grupos (n=90): IM, IG, OE e AU. Biofilmes monoespécie (*Actinomyces naeslundii* e *Streptococcus sanguis*) e biofilmes mistos foram formados e avaliados, para cada grupo experimental, quanto ao número de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL; n=10), atividade metabólica (redução do 2 metoxi 4 nitro 5 sulfofenil 5 fenilalanina carbonil 2H tetrazolium hidróxido - XTT; n=10) e biomassa total (cristal violeta; n=10). A análise estatística dos dados foi realizada para as avaliações Raman, XPS, UFC/mL, XTT e cristal violeta com $\alpha=0,05$. Os resultados indicaram que o método IG não promoveu alterações sobre a morfologia, composição química e estrutura do esmalte. Os grupos IM e EO promoveram pequenas alterações na morfologia superficial, composição química e estrutura. O grupo AU resultou em severas alterações na morfologia superficial e em secção transversal, com pequena

influência sobre a composição química e estrutura do esmalte. Os biofilmes de *S. sanguis* não apresentaram diferenças significantes entre os grupos. Os biofilmes de *A. naeslundii* apresentaram valores maiores de UFC/mL e biomassa no grupo AU e a atividade metabólica foi maior no grupo IG. Pode ser concluído que os métodos de esterilização promovem alterações nas propriedades do esmalte e, dessa forma, a seleção do método de esterilização deve ser realizada de maneira criteriosa, considerando os efeitos causados às propriedades do esmalte.

Palavras chave: Esmalte dentário, Esterilização, Análise química, Biofilmes.

VIANA, PGS. Influence of different methods of dental enamel sterilization under morphology, chemical composition, structure and biofilms formation *in vitro*. Araraquara, 2013. 153 f. Tese (Doutorado em Reabilitação Oral - Prótese) – Faculdade de Odontologia, Campus de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho

Abstract

The sterilization process should preserve the enamel properties of specimens used for *in vitro* and *in situ* studies. The aim of this study was to evaluate the influence of sterilization methods Microwaving – MI, Gamma irradiation – GI, Ethylene oxide – EO and Steam autoclave SA on the enamel properties. This study was conducted into 2 phases. For phase 1, 50 specimens of bovine enamel were assigned into 5 groups (n=10): MI, GI, EO, SA and control (no sterilization), evaluated regarding morphology (Scanning Electron Microscopy – SEM superficial and cross-section), chemical composition (X-ray energy dispersive spectroscopy – EDS and X-ray photoelectron spectroscopy – XPS) and structure (Raman and Nuclear Magnetic Resonance – RMN). For phase 2, 360 bovine enamel specimens were assigned into 4 groups (n=90): MI, GI, EO and SA. For each group, biofilms were grown as monospécies (*Actinomyces naeslundii* and *Streptococcus sanguis*) and multispecies, evaluated regarding counting forming units (CFU/mL), metabolic activity (reduction of 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide - XTT) and biomass (violet crystal assay). Statistical evaluation was performed for data from XPS, Raman, CFU/mL, XTT assay and violet crystal assay. The results indicated that GI group produced no alterations on the morphology, chemical composition and structure of the enamel. MI and EO groups promoted slightly alterations on morphology, chemical composition and structure. The SA group caused severe morphological changes on surface and in depth and small alterations on chemical composition and structure. There were no differences among groups for *S. sanguis* biofilms. *A. naeslundii* biofilms showed higher values of CFU/mL and biomass for SA group and higher metabolic activity in GI group. It can be concluded that enamel properties could be influenced by the sterilization methods,

thus, the selection of the sterilization method must be based on the effects caused on enamel properties.

Keywords: Dental enamel, Sterilization, Chemical analysis, Biofilms.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	20
2.1	Métodos utilizados para esterilização de esmalte dental.....	20
2.2	Efeitos dos métodos de esterilização.....	32
2.3	Análises das propriedades do esmalte.....	36
2.4	Desenvolvimento de biofilmes.....	50
3	PROPOSIÇÃO.....	56
4	MATERIAIS E METODOLOGIA.....	57
4.1	Materiais.....	57
4.2	Instrumentos.....	59
4.3	Equipamentos.....	60
4.4	Fase 1: Caracterização morfológica, elementar e estrutural do esmalte dental submetido aos diferentes métodos de esterilização.....	61
4.4.1	Preparo dos espécimes para Fase 1.....	61
4.4.2	Análise estrutural do esmalte por meio de Raman.....	62
4.4.3	Análise da composição química elementar do esmalte por meio de espectroscopia fotoeletrônica por raios-X (XPS).....	65
4.4.4	Esterilização dos espécimes de esmalte.....	66
4.4.5	Análise morfológica da superfície do esmalte por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	68
4.4.6	Análise elementar do esmalte por meio de energia dispersiva de raios-X (EDS).....	70
4.4.7	Análise morfológica da secção transversal do esmalte por meio de MEV	70
4.4.8	Análise estrutural do esmalte por meio de ressonância magnética nuclear (RMN).....	71

4.5 Fase 2: Avaliação da influência dos métodos de esterilização sobre a formação do biofilme <i>in vitro</i>.....	72
4.5.1 Preparo dos espécimes de esmalte para a Fase 2.....	72
4.5.2 Aferição da rugosidade superficial.....	74
4.5.3 Reativação dos microrganismos.....	76
4.5.4 Curva de crescimento dos microrganismos.....	79
4.5.5 Coleta e preparação da saliva.....	83
4.5.6 Formação do biofilme <i>in vitro</i>	84
4.5.7 Avaliação dos microrganismos viáveis por meio de UFC/mL.....	86
4.5.8 Avaliação da atividade metabólica dos microrganismos por meio de ensaio de XTT.....	88
4.5.9 Avaliação da biomassa total dos biofilmes por meio de cristal violeta.....	89
4.6 Análise dos dados.....	90
5 RESULTADOS.....	92
5.1 Fase 1: Caracterização morfológica, elementar e estrutural do esmalte dental submetido aos diferentes métodos de esterilização.....	92
5.1.1 Raman.....	92
5.1.2 XPS	98
5.1.3 MEV superficial e em secção transversal.....	104
5.1.4 EDS.....	109
5.1.5 RMN.....	111
5.2 Fase 2: Avaliação da influência dos diferentes métodos de esterilização sobre a formação do biofilme <i>in vitro</i>.....	112
5.2.1 UFC/mL.....	112
5.2.2 XTT.....	113
5.2.3 Cristal Violeta.....	115

6	DISCUSSÃO.....	117
7	CONCLUSÃO.....	139
	REFERÊNCIAS.....	141
	Anexo A - Certificado do CONEP.....	152

1 INTRODUÇÃO

Desde meados do século XX, a utilização de espécimes de esmalte dental para a realização de estudos *in vitro* e *in situ* tem possibilitado o desenvolvimento e aprimoramento de produtos de uso odontológico tais como agentes clareadores, dentifrícios, soluções fluoretadas, entre outros. As pesquisas utilizando modelos de biofilmes *in vitro* desenvolvidos sobre espécimes de esmalte têm possibilitado a avaliação fisiológica e patológica da evolução dos biofilmes dentais ^{19,27,28} e, também, a avaliação da efetividade de novos agentes de controle de placa ^{12,40,69}, de maneira muito próxima do que acontece na cavidade oral ²⁸. O desenvolvimento do biofilme dental inicia-se com a formação da película salivar, que consiste na adsorção das proteínas salivares sobre a superfície do esmalte, seguida pela adesão de microrganismos denominados colonizadores iniciais, que desempenham um papel fundamental na adesão dos microrganismos subsequentes e formação do biofilme dental ⁴⁰.

Os espécimes de esmalte designados para os estudos são obtidos a partir de dentes extraídos, fonte potencial de microrganismos patogênicos, devendo ser esterilizados antes da sua utilização com o objetivo de prevenir a propagação de doenças entre acadêmicos, pesquisadores e voluntários ³⁵ e, ainda, promover a obtenção de espécimes livres de contaminação para a realização de estudos *in vitro*. Dentre os métodos de esterilização comprovadamente eficazes, destacam-se a irradiação gamma, o óxido de etileno e a autoclave. Entretanto, esses métodos apresentam algumas limitações quanto a sua utilização. Apesar de eficientes, a irradiação gamma e o óxido de etileno apresentam alto custo dos equipamentos e necessitam de funcionários especializados para a realização do procedimento de esterilização. Além disso, a ocorrência de escurecimento do esmalte tem sido relatada após a utilização da irradiação gamma ^{45,91} e o óxido de etileno teve sua efetividade questionada quando utilizado para a esterilização de dentes íntegros ⁸⁴. A esterilização por autoclave tem sido considerada mais acessível, no entanto, alguns estudos revelaram danos à estrutura dental após sua utilização, como alterações na coloração e na estrutura mineral dos dentes, o que poderia comprometer os resultados dos estudos ^{45, 91}.

A irradiação por micro-ondas é capaz de inativar diversos microrganismos, incluindo os indicadores de esterilização *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa*⁵². Esse método tem sido utilizado para a inativação de microrganismos patogênicos presentes em materiais destinados a experimentos microbiológicos⁶⁵, instrumentos utilizados em procedimentos médicos e odontológicos⁸⁹, próteses dentárias⁷¹ e, recentemente, em espécimes de esmalte dental⁷⁹. Em estudo anterior, a utilização da irradiação por micro-ondas (3 min a 650 W) resultou na completa desinfecção dos espécimes de esmalte bovino sem que ocorressem alterações na microdureza superficial, ou influência sobre os processos de desmineralização e de remineralização do esmalte. Este método apresenta uma série de vantagens em relação aos demais protocolos de esterilização, tais como fácil acesso e baixo custo⁷⁹. No entanto, as análises realizadas até o momento são consideradas medidas indiretas da composição do esmalte e, portanto, análises mais específicas devem ser realizadas com a finalidade de identificar e quantificar possíveis alterações na composição química do esmalte dental em decorrência do processo de esterilização, assim como a comparação deste método com os demais existentes.

Considerado o tecido mais mineralizado do corpo humano, o esmalte dental é constituído por 96% de material inorgânico, 3% de água e menos de 1% de material orgânico (proteínas não colágenas, tais como enamelinas e amelogeninas)^{21 67}. O esmalte dental tem sido considerado por diversos pesquisadores como uma apatita, que contém CO₃, Na e Mg como principais impurezas^{21,22,59}. A microestrutura do esmalte é constituída por cristais ordenados em forma de prismas, unidos por uma matriz formada por proteína e água. A superfície externa do esmalte apresenta-se mais mineralizada que a subsuperfície, podendo ser caracterizada por cristais de apatita dispostos paralelamente uns aos outros e perpendicularmente à superfície do esmalte¹⁶. Alterações morfológicas ocorridas na superfície externa do esmalte podem promover condições favoráveis ao acúmulo de bactérias e ao aumento no risco de desenvolvimento de lesões de cárie, uma vez que a estrutura original do esmalte foi alterada^{61,33}. Tendo em vista que as características físicas, estruturais, fisiológicas e funcionais dos tecidos duros são estritamente relacionadas à sua composição química e ultraestrutura⁸³, é provável que as alterações sofridas pelo esmalte dental em decorrência do procedimento de esterilização possam estar associadas às alterações na sua morfologia e/ou composição química,

possivelmente relacionadas a alterações na concentração e/ou na presença dos componentes, tais como cálcio, fósforo e de grupamentos tais como o fosfato e o carbonato, conforme relatos de Taube et al.⁷⁵, 2010.

De acordo com a literatura especializada, os primeiros relatos de estudos realizados para avaliar o efeito dos métodos de esterilização sobre as propriedades do esmalte consistiam em técnicas simples e sem critérios metodológicos controlados. Em 1990, Pantera et al.⁵⁴ sugeriram a utilização da esterilização dental por meio de autoclave (121°C por 40 min), uma vez que este método se apresentou efetivo microbiologicamente e não promoveu alterações nas características dos dentes humanos. Neste trabalho, a avaliação realizada pelos autores foi subjetiva, tendo sido a opinião dos alunos da Faculdade de Odontologia considerada no momento da avaliação da presença de fraturas, perda de restaurações ou influência sobre a realização dos procedimentos endodônticos em treinamentos pré-clínicos.

Atualmente, dentre as técnicas disponíveis para o estudo dos tecidos mineralizados, a análise por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) tem sido utilizada por diversos pesquisadores para avaliar as alterações estruturais ocorridas na superfície do esmalte, incluindo a sua exposição a agentes alcalinos^{75,25}, agentes clareadores⁸⁵, adesivos²⁹ e outros. Dessa forma, a MEV é considerada um método de análise qualitativo, quando utilizado para o estudo das características morfológicas da superfície dos tecidos dentais. Adicionalmente, a análise por meio de energia dispersiva de raios-X (EDS), utilizada em conjunto com a MEV, tem sido frequentemente empregada para avaliação da composição química do esmalte dental²⁶. EDS possibilita a análise da subsuperfície do esmalte, podendo fornecer informações sobre a composição química elementar a uma profundidade maior que 1 μm ⁶¹. No entanto, dependendo do equipamento utilizado, ambas as técnicas podem requerer que os espécimes sejam recobertos por uma camada de carbono ou ouro, fato que, muitas vezes, impossibilita a realização de estudos longitudinais. Além destas técnicas, a ressonância magnética nuclear (RMN) também tem sido utilizada na caracterização estrutural de tecidos mineralizados, apresentando elevada especificidade na avaliação estrutural e dinâmica de fosfatos orgânicos e inorgânicos⁷⁶. Porém, a RMN é um método destrutivo, requerendo a trituração do espécime para a realização da análise.

Dentre as técnicas de caracterização química que possibilitam a preservação do espécime, a análise por XPS consiste em um método de análise superficial altamente específico e que pode ser realizado diretamente sobre os espécimes de esmalte. XPS tem sido utilizada na caracterização quantitativa da composição química do esmalte ⁴⁴, assim como na avaliação das interações entre esmalte dental e adesivos ⁴⁸, agentes alcalinos ⁷⁵ e laser Er:YAG ⁴⁷. Também considerada uma técnica conservadora, a espectroscopia Raman pode ser realizada diretamente sobre o espécime, sendo capaz de realizar análises com elevada especificidade bioquímica, sem que haja necessidade de preparação destrutiva da superfície ³⁴. Essa técnica de análise por meio de luz detecta vibrações moleculares, fornecendo informações a respeito da composição química e da estrutura dos materiais analisados ⁵⁵, tendo sido utilizada na avaliação do esmalte dental em estudos envolvendo detecção de lesões causadas por erosão dental ²⁵, lesões iniciais de cárie ³⁴, danos causados por agentes clareadores ^{55,67}, interação do flúor com os tecidos dentais ²⁹ e efetividade de lasers no controle de cáries ¹⁷.

A composição química da superfície do esmalte tem sido citada como um fator contribuinte na variação das condições de formação da película salivar e, subsequentemente, na adesão dos microrganismos colonizadores iniciais do biofilme ³³. Dentre os microrganismos responsáveis pela colonização inicial da placa, o *Streptococcus sanguis* representa 45% daqueles encontrados até 4 h após a higienização oral ³⁷. O microrganismo *Actinomyces naeslundii* também é considerado um colonizador inicial e pode representar cerca de 30% do total de bactérias pioneiras na colonização do biofilme dental ¹⁹. Este microrganismo apresenta receptores com capacidade de ligação à película salivar e, ainda, um mecanismo de ligação específico com o *S. sanguis*, por meio do receptor 1 Gn ³⁷, desempenhando um papel importante nos estágios iniciais de formação do biofilme ¹⁹.

Dessa forma, além da avaliação detalhada das possíveis alterações químicas e morfológicas do esmalte dentário decorrentes do processo de esterilização, o seu efeito sobre a adesão desses microrganismos e formação do biofilme inicial deve ser avaliado visando identificar se os métodos de esterilização apresentam alguma influência ou interferência sobre este processo. Possíveis alterações do esmalte poderiam influenciar e/ou comprometer os resultados dos estudos *in vitro* e *in situ* que avaliam a formação e o desenvolvimento de biofilmes

orais sobre espécimes de esmalte. A realização desses estudos consiste na etapa que precede a realização de experimentos *in vivo* e, portanto, é desejável que os espécimes de esmalte utilizados não sofram alterações durante o processo de esterilização. Entretanto, de acordo com a literatura especializada, ainda não há relatos sobre a influência dos métodos de esterilização de esmalte dental sobre a formação do biofilme oral.

Dentre as análises realizadas para a avaliação de biofilmes, a técnica de quantificação de UFC/mL tem sido amplamente utilizada. Esta técnica requer uma metodologia simples e é capaz de fornecer informações a respeito da quantidade dos microrganismos viáveis presentes nos biofilmes. Recentemente, a utilização de métodos colorimétricos tem sido empregada na complementação das análises relacionadas aos biofilmes. Dentre estes métodos de avaliação, destacam-se o ensaio de redução do 2 metoxi 4 nitro 5 sulfofenil 5 fenilalanina carbonil 2H tetrazolium hidróxido (XTT) e o cristal violeta. A realização do ensaio de XTT possibilita a quantificação da atividade metabólica celular e, indiretamente, a viabilidade do biofilme ^{57,15}, enquanto a utilização do cristal violeta proporciona informações referentes à quantificação da biomassa total do biofilme ⁷⁷. Estas análises quantitativas podem ser utilizadas complementarmente, contribuindo com informações relevantes com relação ao efeito de diferentes métodos de esterilização de esmalte sobre a adesão e formação de biofilme oral.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Uma revisão da literatura abrangendo os trabalhos publicados utilizados para a discussão dos resultados obtidos pelo presente estudo, foram revisados e constam a seguir.

2.1 Métodos utilizados para esterilização de esmalte dental

Os efeitos causados pelos métodos de desinfecção e esterilização sobre a morfologia do esmalte e a sobre a capacidade de adesão resina-esmalte foram avaliados *in vitro* por Shaffer et al.⁶⁸ (1985). Vinte dentes humanos foram utilizados para a realização dos experimentos. As superfícies vestibulares foram polidas com lixas de granulação 240 e 600. Foram utilizados quatro grupos (n=5): I - imersão em glutaraldeído 2% durante 24 h sob temperatura de 23°C; II - imersão em hipoclorito de sódio sob temperatura de 23°C durante 24 h; III - autoclave durante 20 min a 127°C; IV - controle não esterilizado. As análises de morfologia do esmalte foram realizadas com a utilização de MEV e a adesão à resina foi avaliada por meio de testes resistência ao cisalhamento. Os testes estatísticos ANOVA e Tukey foram utilizados para a análise dos dados referentes ao teste de resistência ao cisalhamento. Os resultados obtidos não indicaram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos com relação a resistência ao cisalhamento. A análise por meio de MEV (aumento de 500×) não indicou diferenças significantes entre os grupos experimentais e o grupo controle, tendo sido observadas nos espécimes características de normalidade do esmalte. Os autores concluíram que os métodos avaliados não promoveram efeitos adversos à superfície do esmalte dental.

De acordo com Chandler⁹ (1990), apesar do óxido de etileno ser comumente utilizado como método de esterilização de esmalte humano e bovino em estudos *in situ*, esse gás possui alta toxicidade e pode se tornar explosivo quando misturado ao ar. Além disso, este processo de esterilização requer equipamentos especiais, treinamento profissional para a sua utilização, demanda muitas horas para ser realizado e raramente está disponível fora de grandes hospitais. Outro fator relevante apontado pelo autor está relacionado ao fato da redução significativa da disponibilidade de óxido de etileno num futuro próximo. Dessa forma, de acordo com

o autor, a utilização do óxido de etileno como método de esterilização não é recomendável e, para o desenvolvimento de pesquisas envolvendo espécimes dentais, outros métodos de esterilização deveriam ser utilizados. Com o objetivo de se determinar a viabilidade de métodos alternativos de esterilização de esmalte, esse autor analisou alterações ocorridas na morfologia superficial e na microdureza de amostras de esmalte bovino submetidas ao processo de esterilização por óxido de etileno, autoclave (132°C por 15 min) ou irradiação gamma (dose de 25 kGy por 28 h). Para a análise da morfologia superficial, três pares de amostras de esmalte com dimensões de 3 × 4 mm foram obtidas do mesmo incisivo bovino, polidas e divididas em grupos experimentais e controles. Uma amostra de cada grupo experimental foi submetida a um dos três tipos de esterilização, tendo sido, em seguida, preparadas para análise em microscópio eletrônico de varredura com aumento de 500×. Para a avaliação da microdureza, dezoito amostras de esmalte bovino de 3 × 4 mm foram polidas e divididas e três grupos (n=6): óxido de etileno, autoclave e irradiação gamma. Antes e após o processo de esterilização, cada amostra foi submetida ao teste de microdureza Knoop, realizando seis indentações na superfície do esmalte, sob carga de 50 gf. Os resultados obtidos por este estudo indicaram que os métodos de esterilização avaliados não produziram alterações significantes na morfologia superficial das amostras de esmalte bovino. A esterilização por meio de autoclave produziu uma diminuição significativa da microdureza superficial do esmalte bovino, enquanto nenhuma alteração foi observada nos grupos submetidos à esterilização por óxido de etileno e irradiação gamma. Portanto, o método de esterilização de amostras de esmalte por meio de irradiação gamma apresenta-se como o substituto mais apropriado para o óxido de etileno.

A utilização de dentes extraídos, de origem humana ou bovina, como fonte de substrato para a realização de estudos *in situ*, foi abordada por Mellberg ⁴⁵ (1992). De acordo com o autor, os estudos *in situ*, podem ser divididos em dois tipos: os que avaliam os fatores que afetam a formação das lesões de cárie ou a remineralização e aqueles que avaliam os efeitos dos tratamentos na remineralização ou prevenção da desmineralização. As pesquisas realizadas *in situ* estão sujeitas a um grande número de variáveis, sendo assim, a determinação do substrato a ser utilizado depende principalmente do objetivo de cada estudo. Os dentes humanos são considerados a fonte mais apropriada de substrato para a

realização de pesquisas *in situ* que envolvam ambos os processos de desmineralização e remineralização. No entanto, cada substrato apresenta vantagens e limitações. Portanto, fatores como a disponibilidade, necessidade diminuição dos fatores de variação e de padronização das amostras, técnicas analíticas utilizadas, reprodutibilidade dos resultados e, também, a experiência pessoal do pesquisador, devem ser considerados no momento da escolha entre dentes de origem humana ou bovina.

White e Hays ⁸⁴ (1995), relatam que os dentes humanos extraídos são considerados uma fonte potencial de microrganismos patogênicos. A vascularização, presente nos tecidos pulpares e perirradiculares dos dentes, torna possível a presença de vírus e muitos outros patógenos transmitidos pela via sanguínea. Dessa forma, os autores sugerem que os dentes extraídos destinados às pesquisas devam ser esterilizados antes da sua utilização. Para avaliar a efetividade do óxido de etileno na esterilização de dentes extraídos, os autores realizaram um estudo microbiológico, utilizando molares extraídos de origem humana. Para isso, uma cavidade era confeccionada na superfície oclusal de cada um dos dentes e, em seguida, uma perfuração em direção à câmara pulpar era realizada. Por meio desta perfuração, uma solução contendo endosporos de *Bacillus subtilis*, microrganismo indicador de esterilização, foi injetada no interior da polpa e, em seguida, a cavidade foi selada com material restaurador. Os dentes foram divididos em 3 grupos: I – tratamento com óxido de etileno a 30°C durante 250 min (n=22), II – tratamento com óxido de etileno a 63°C durante 130 min (n=10) e III – controle não esterilizado (n=10). Após o procedimento experimental, todos os dentes tiveram o tecido pulpar exposto com o auxílio de um instrumento de corte esterilizado e, em seguida, assepticamente transferidos para tubos de ensaio contendo 10 ml de caldo nutriente e incubados a 37°C durante 7 dias. Decorrido este período, a presença de crescimento microbiano, evidenciada pela turvação do meio, foi avaliada. Os meios de cultura que apresentaram crescimento foram semeados em placas contendo o meio TSB (Trypticase Soy Broth). A presença de endosporos viáveis de *B. subtilis* foi verificada pelo desenvolvimento de colônias de pigmentação vermelha. Os resultados obtidos por este estudo indicam que nenhum dos dois tratamentos com óxido de etileno foi capaz de esterilizar todos os dentes testados. Endosporos viáveis de *B. subtilis* foram encontrados em mais de 60% das amostras submetidas ao tratamento com óxido de etileno. Foi possível concluir que o óxido de etileno não

pode ser considerado um método efetivo de esterilização de dentes extraídos íntegros.

Um artigo de revisão de literatura realizada por Zero ⁹¹ (1995), teve o objetivo de avaliar os diferentes fatores que influenciam o desenvolvimento das pesquisas realizadas *in situ*. Foi realizada uma ampla abordagem dos estudos *in situ* realizados até aquele momento, que incluiu além das vantagens e desvantagens, aspectos relacionados aos tipos de estudos, tipos de substrato e técnicas de avaliação utilizadas e, ainda, considerações sobre a importância da validação de tais estudos. Os tipos de estudo *in situ* foram divididos em 3 categorias: os que posicionam os espécimes de esmalte em aparelhos removíveis, os que fixam os espécimes de esmalte aos dentes naturais dos pacientes e os estudos realizados com espécimes seccionados (fixos ou removíveis). Os fatores que exercem grande influência sobre os resultados de destes estudos estão relacionados aos parâmetros experimentais e sua dificuldade de padronização. A seleção dos pacientes deve considerar fatores demográficos como idade, gênero e etnia, estado geral de saúde, hábitos alimentares e características da saliva (fluxo e composição). O tipo de estudo *in situ* deve considerar os objetivos da pesquisa, maximizando a relevância clínica, minimizando os fatores de variação e mantendo um alto padrão ético. A definição do tipo de substrato dental (origem humana ou bovina), do método de esterilização e das técnicas de avaliação do substrato que serão utilizados, apresenta grande influência sobre os resultados. Dessa forma, o autor conclui que o aumento na padronização dos parâmetros experimentais é essencial para a manutenção do alto nível de relevância clínica destes estudos.

Diferentes métodos de esterilização de dentes extraídos foram abordados por DeWald ¹⁸ (1997), em um artigo de revisão, que abordou os efeitos causados por estes procedimentos aos dentes utilizados em pesquisas de materiais restauradores. Os artigos foram analisados, tiveram seus resultados comparados e descritos de acordo com o método de esterilização de dentes utilizado no estudo. O óxido de etileno não provocou alterações na permeabilidade dentinária ou na força de adesão dos materiais restauradores aos tecidos dentais, entretanto, foi considerado um método de esterilização ineficaz. A utilização da imersão em formalina apresentou resultados extremamente variados a respeito dos efeitos provocados à dentina utilizada em testes de adesão, além disso, não foi observada uma padronização do tempo de imersão necessário para esterilizar os dentes. A

esterilização por meio de autoclave não provocou alterações na força de adesão ou na permeabilidade da dentina. A irradiação gamma não promoveu alterações na estrutura dental, apesar disso, não foram encontrados estudos específicos de adesão dentinária envolvendo este método de esterilização. Dessa forma, os dentes utilizados em pesquisas que envolvam teste de adesão devem ser esterilizados por meio de autoclave.

Amaechi et al. ² (1998), desenvolveram um estudo com o objetivo de avaliar a efetividade de métodos de esterilização de espécimes de esmalte dental utilizados em testes de cariogenicidade intraorais, e seus efeitos sobre a desmineralização do esmalte. Coroas de 20 incisivos bovinos foram seccionadas verticalmente em cinco porções. Cada porção foi designada para um dos cinco grupos: I – controle – não esterilizado, II – irradiação gamma (25 kGy por 5 dias), III – autoclave (121°C por 15 min), IV – hipoclorito de sódio 12% (pH 12,5 por 24 h) e V – povidine de iodo 7,5% (pH 5,3 por 24 h). Após a esterilização, todos os espécimes foram imersos em caldo nutriente e incubados em condições de aerobiose a 37°C por 24 h. Em seguida, os meios foram diluídos, semeados em placas ágar sangue, incubados e submetidos a contagem de UFC/mL. Posteriormente, todos os espécimes foram imersos em solução desmineralizante (pH 4,5) para a produção de lesões de cárie. Os espécimes foram preparados, analisados em microscópio de luz polarizada e submetidos a microrradiografias transversais para a quantificação da perda mineral e profundidade das lesões. Os resultados obtidos indicaram que o crescimento microbiológico ocorreu apenas nas amostras do grupo controle, demonstrando a eficácia dos métodos de esterilização utilizados. A análise em microscópio de luz polarizada, com aumento de 450×, comprovou a presença de lesões de cárie nas amostras de todos os grupos. Alterações macroscópicas na superfície do esmalte foram observadas nos grupos povidine de iodo (lesões brancas), hipoclorito de sódio (clareamento) e irradiação gamma (escurecimento do esmalte). Apesar disso, nenhum dos grupos apresentou diferença estatisticamente significativa nos valores de perda mineral e profundidade de lesão quando comparados ao grupo controle. Os autores concluem que todos os métodos de esterilização avaliados são efetivos, no entanto, com base nos valores numéricos de perda mineral e profundidade de lesão, o esmalte utilizado em testes de cariogenicidade deve ser esterilizado por meio da irradiação gamma.

Diferentes métodos de esterilização foram avaliados por Amaechi et al.¹ (1999), quanto a sua influência sobre a estrutura dos espécimes de esmalte bovino com cárie artificial. As lesões de cárie foram induzidas em 40 incisivos bovinos, que foram distribuídos em quatro grupos (n=10), com os seguintes protocolos de esterilização: I – irradiação gamma (dose de 25 kGy por 5 dias), II – autoclave (121°C por 15 min), III – solução de hipoclorito de sódio 12% (24 h) e IV – solução de povidine de iodo 7,5% (durante 24 h). Após os procedimentos de esterilização, testes microbiológicos foram realizados para comprovar a eficácia dos métodos utilizados. Os espécimes dos grupos controles e experimentais foram, individualmente, colocados em tubos de ensaio contendo caldo nutriente BHI e incubados a 37°C durante 7 dias em condições de aerobiose e anaerobiose. Após este período, o crescimento de microrganismos foi avaliado pela presença ou ausência de turvação nos meios de cultura. Os meios de cultura que apresentaram turvação foram diluídos, semeados em placas de ágar sangue e novamente incubados. A presença de microrganismos viáveis foi verificada por meio do crescimento de colônias nas placas semeadas. Posteriormente, os espécimes dos grupos controles e esterilizados foram analisados em microscópio de luz polarizada e submetidos à microrradiografias transversais, para quantificação da perda mineral e da profundidade das lesões. Os resultados obtidos demonstraram que o crescimento microbiológico ocorreu apenas nas amostras dos grupos controle, comprovando a eficácia dos métodos de esterilização utilizados. A análise realizada em microscópio de luz polarizada, com aumento de 450×, constatou a presença de lesões de cárie em todas as amostras e não revelou alterações na morfologia superficial das lesões das amostras esterilizadas em relação àquelas dos grupos controles. No entanto, os espécimes do grupo esterilizado por meio de autoclave apresentaram aumento significativo nos valores de perda mineral e profundidade da lesão. O grupo esterilizado por hipoclorito de sódio apresentou aumento significativo da perda mineral e clareamento das amostras e das lesões. A esterilização por meio de irradiação gamma alterou a coloração dos espécimes de esmalte e das lesões para a cor creme. Embora não tenha sido significativo, foi observado um aumento na perda mineral dos espécimes do grupo esterilizado com povidine de iodo em relação ao grupo controle. Considerando a quantidade de efeitos adversos causados pelos demais métodos, a irradiação gamma mostrou-se o método mais aceitável de esterilização para espécimes de esmalte utilizados em testes de cariogenicidade.

Dando continuidade a esse estudo, Amaechi et al.³ também em 1999, avaliaram a capacidade da irradiação gamma de esterilizar espécimes de esmalte bovino sem causar danos estruturais. Incisivos bovinos foram utilizados para a obtenção de 160 espécimes de esmalte, divididos em 8 grupos (n=20), sendo um controle - não irradiado e sete grupos experimentais, submetidos a diferentes doses de irradiação gamma: 2248, 2856, 3264, 3672, 4080, 4488 ou 4896 Gy, respectivamente. Diferentes doses de irradiação gamma foram obtidas pela variação no tempo de exposição dos espécimes. Após a irradiação, os grupos controle e experimentais tiveram seus espécimes de esmalte imersos, individualmente, em tubos de ensaio contendo caldo nutriente e incubados a 37°C por 7 dias em condições de aerobiose e anaerobiose. O crescimento microbiológico foi avaliado pela presença ou ausência de turvação nos meios. Na presença de turvação, os meios foram diluídos, semeados em placas ágar sangue, incubados e submetidos à contagem de UFC/mL. Em seguida, lesões de cárie foram produzidas em cada espécime e a perda mineral foi quantificada por meio de microrradiografias transversais. Os resultados indicam que não ocorreu diferença estatisticamente significativa entre os grupos com relação aos valores de perda mineral, no entanto, a irradiação gamma aplicada em doses superiores a 4080 Gy promoveu alteração da coloração do esmalte para cor creme. Além disso, os testes microbiológicos demonstraram que não ocorreu esterilização nos grupos irradiados com doses inferiores a 4080 Gy. Desse modo, dentre as doses de irradiação gamma avaliadas, apenas a de 4080 Gy foi capaz de esterilizar os espécimes sem causar danos à integridade estrutural do esmalte bovino.

A realização de estudos *in situ* para o desenvolvimento de pesquisas de cariogenicidade foi abordada por Clasen e Ogaard⁷² (1999). Neste artigo de revisão, foram utilizados estudos de desmineralização *in situ* publicados até o início 1999, com o objetivo de avaliar como os resultados das pesquisas podem ser influenciados pelo método de esterilização e pelo tipo substrato dental utilizado. As técnicas de avaliação das alterações no conteúdo mineral das amostras de esmalte foram utilizadas para a avaliação. A microrradiografia transversal é considerada padrão ouro para a análise da desmineralização, devido à maior precisão na determinação do conteúdo mineral, porém requer destruição controlada do espécime para a realização da análise. Dessa forma, técnicas alternativas como a microdureza superficial em secção longitudinal também tem sido utilizadas. A utilização de

esmalte proveniente de dentes bovinos foi considerada vantajosa e de boa reprodutibilidade. Dentre os métodos de esterilização, a utilização do óxido de etileno não foi recomendada devido à sua toxicidade e aos relatos contestando sua eficácia. A esterilização em autoclave foi considerada eficaz, porém, pode causar danos à estrutura dental. Dessa forma, a irradiação gamma foi considerada o método de esterilização de escolha para a realização de estudos envolvendo desafios cariogênicos.

Toro et al.⁸⁶ (2000), considerando a importância da esterilização de espécimes de esmalte utilizados nas pesquisas *in situ*, realizou um estudo para avaliar a influência dos métodos de esterilização sobre os espécimes de esmalte com lesões de cárie submetidos à ciclagem de pH acrescida de flúor. Os espécimes de esmalte foram esterilizados por meio de autoclave ou exposição ao óxido de etileno, e tiveram seu comportamento comparado aos espécimes imersos em solução desinfetante a base de álcool. Os espécimes de esmalte foram obtidos a partir de dentes humanos, submetidos ao processo de indução de lesões de cárie por meio de imersão em solução desmineralizante. Em seguida, os espécimes foram divididos em 3 grupos (n=24): I – esterilização por meio de autoclave, II – esterilização por meio de óxido de etileno e III – desinfecção por meio de imersão em solução de etanol 70% (10 min). Após este procedimento, todos os espécimes foram submetidos à ciclagem de pH com adição de flúor. Posteriormente, o flúor presente nos espécimes de esmalte foi quantificado por meio de biópsia e foram realizadas microrradiografias transversais para a análise do conteúdo mineral e profundidade das lesões. Os resultados obtidos indicam que a absorção de flúor foi estatisticamente diferente nos 3 grupos. Os dados obtidos pelas microrradiografias demonstram que os espécimes do grupo esterilizado em autoclave apresentaram alterações no desenvolvimento das lesões de cárie. Deste modo, considerando que a imersão em solução de formalina ou etanol 70% promovem apenas desinfecção, e que a utilização de autoclave ocasiona alterações no comportamento do esmalte, foi recomendado que a esterilização de espécimes de esmalte para estudos *in situ* seja realizada por meio de óxido de etileno.

A efetividade de diferentes métodos de desinfecção/esterilização dental foram avaliados por Dominici et al.²⁰ (2001). Cento e dez molares hígidos humanos foram selecionados para a realização do estudo e armazenados em solução salina tamponada. Os dentes foram submetidos a um processo de abertura

coronária e tiveram o tecido pulpar removido. Esporos de *B. stearothermophilus*, microrganismo considerado resistente a altas temperaturas, foram utilizados para verificar a efetividade dos métodos de esterilização testados. Os dentes foram inoculados com uma alíquota contendo o microrganismo, selados com material restaurador e incubados por 20 h em tubos de ensaio contendo solução salina estéril. Os dentes foram, então, divididos em onze grupos (n=10), Sete grupos foram submetidos à desinfecção por imersão em solução durante uma semana: I – solução salina estéril (controle), II – NaOCl 5,25%, III - NaOCl 2,6%, IV - NaOCl 1%, V – formalina 10%, VI - glutaraldeído 2% e VII – amônia quaternária 0,28%. Os demais grupos foram submetidos a: VIII – formalina 10 % (imersão por 2 dias), IX - formalina 10 % (imersão por 4 dias), X – autoclave (115,5°C por 20 min) e XI – autoclave (115,5°C por 40 min). Após o processo de desinfecção/esterilização os dentes foram, assepticamente, seccionados e transferidos individualmente para tubos de ensaio contendo meio de cultura. A presença de crescimento de microrganismos (turvação) foi verificada após 48 h. Os resultados obtidos demonstraram que apenas os procedimentos por meio de autoclave (40 min) ou imersão em formalina 10% (1 semana) foram efetivos na inibição do crescimento microbiano em 100% dos espécimes avaliados. De acordo com a análise estatística, estes dois métodos mostraram-se significativamente melhores que os demais métodos de esterilização dental avaliados.

Recomendações para a prevenção e controle da propagação de doenças infecciosas, a que são submetidos os profissionais da área de saúde em ambiente odontológico, foram feitas pelo Centers for Disease Control and Prevention (CDC) ²⁰ (2003). Os dentes extraídos que contenham restaurações de amálgama e que forem destinados a finalidades educacionais ou de pesquisas, podem ser desinfetados por meio da imersão em soluções químicas germicidas, no entanto, o potencial de infecção é apenas reduzido por meio deste procedimento. Dessa maneira, dentes que não contenham restaurações de amálgama devem ser esterilizados, tendo sido sugerida a utilização de autoclave com ciclo de 40 min, procedimento considerado efetivo na inativação dos microrganismos patogênicos, porém, que promove alterações estruturais nos tecidos dentais.

Rodrigues et al. ⁶⁰ (2004), avaliaram a influência do método de esterilização por irradiação gamma sobre a microdureza e resistência à desmineralização do esmalte dental. Trinta molares de origem humana foram

seccionados longitudinalmente e as metades foram divididas, igualmente, em dois grupos: I - controle – não irradiado e II - irradiação gamma (25 kGy por 14 h e 49 min a 27°C). Após a irradiação, as porções foram novamente seccionadas, e os grupos subdivididos em espécimes polidos (controle e irradiado) e não polidos (controle e irradiado). O teste de microdureza superficial Knoop foi realizado nos espécimes polidos dos grupos controle e irradiado, por meio de 5 indentações (25 gf por 5 s). Em seguida, para avaliar a resistência à desmineralização, todos os espécimes foram submetidos à ciclagem de pH e a perda mineral foi calculada por meio dos valores de microdureza longitudinal, nas profundidades de 10, 30, 50, 70, 90, 110, 200 e 300 µm. Os resultados demonstram que a irradiação gamma produziu alteração na coloração do esmalte em todos os espécimes esterilizados. No entanto, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes nos valores de microdureza superficial e perda mineral, quando os espécimes esterilizados foram comparados com aqueles dos grupos controle. A perda mineral foi significativamente maior nos espécimes polidos, tendo esse efeito ocorrido independentemente da esterilização. Dessa forma, foi concluído que a esterilização de espécimes de esmalte dental por meio da irradiação gamma, na dose de 25 kGy, não produz alterações na microdureza superficial e resistência à desmineralização do esmalte.

No ano de 2005, Kumar et al.³⁹, realizaram um estudo para avaliar a efetividade de diferentes métodos de esterilização dental. Sessenta dentes de origem humana foram divididos em seis grupos (n=10) e submetidos aos seguintes tratamentos: I – formalina 10% (por 7 dias), II – peróxido de hidrogênio 3% (por 7 dias), III – hipoclorito de sódio 2,6% (por 7 dias), IV – água em ebulição (100°C por 20 min), V – autoclave (121°C por 30 min) e VI – solução salina por 7 dias (controle). Em seguida, os dentes foram imersos, individualmente, em caldo nutriente e incubados a 37°C por 48 h. Após este período, o crescimento de microrganismos foi verificado pela presença ou ausência de turvação nos meios de cultura. Os meios de cultura que não apresentaram turvação foram considerados estéreis. Os resultados demonstraram que apenas os tratamentos com formalina 10% por 7 dias e autoclave 121°C por 30 min foram efetivos para a esterilização dos dentes. A utilização de água em ebulição ou peróxido de hidrogênio 3% promoveu desinfecção dos dentes. Todos os dentes tratados com hipoclorito de sódio 2,6% apresentaram crescimento microbiano, assim como os dentes do grupo controle. Os autores concluíram que a desinfecção/esterilização dos dentes extraídos que não contenham restaurações de

amálgama deve ser realizada por meio de autoclave, e que os dentes que contenham amálgama devem ser esterilizados por meio de formalina.

Diferentes métodos comumente utilizados na desinfecção/esterilização de dentes extraídos foram avaliados por Lolayekar et al.⁴³ no ano de 2007. Oitenta dentes hígidos de origem humana foram selecionados, armazenados em água destilada e divididos em oito grupos (n=10): I – formalina 10%, II – peróxido de hidrogênio 3%, III – NaOCl 5,25%, IV – glutaraldeído 2%, V – timol 0,1%, VI – água em ebulição (20 min), VII – autoclave (121°C por 30 min) e VIII – solução salina (controle). Após o processo de desinfecção/esterilização, os dentes foram, individualmente, transferidos para tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura TSB e incubados a 37°C por 48 h. Após o período de incubação, o desenvolvimento de microrganismos foi avaliado pela presença de turvação nos meios de cultura, sendo a ausência de turvação considerada indicadora da efetividade dos métodos de desinfecção ou esterilização dental avaliados. Os resultados obtidos constataram que o desenvolvimento de microrganismos foi observado em todos os tubos referentes ao grupo controle e ao grupo submetido à imersão em solução de timol (0,1% por 7 dias). A utilização dos métodos de imersão em glutaraldeído (2% por 7 dias), água em ebulição (20 min) e peróxido de hidrogênio (3% por 7 dias), promoveram desinfecção das amostras. A eficiência na esterilização de 100% das amostras avaliadas foi obtida apenas nos grupos referentes aos métodos autoclave (121°C por 30 min), hipoclorito de sódio (5,25% por 7 dias) e formalina (10% por 7 dias). Com base nos resultados observados, a escolha do método de esterilização dental deve ser criteriosa e levar em consideração além da sua efetividade, as desvantagens relacionadas à utilização de cada método.

Thomas et al.⁷⁸ (2007), avaliaram a influência do método de esterilização por óxido de etileno na resistência à desmineralização de espécimes de dentina e esmalte. Para isso, molares e pré-molares de origem humana foram utilizados para a obtenção de 32 espécimes de esmalte e 32 espécimes de dentina, com dimensões de 3,2 × 3,2 × 1,5 mm. Para cada tecido, 4 blocos de resina contendo 8 espécimes dentais foram confeccionados, de maneira que apenas uma face de cada espécime ficasse exposta. Dezesesseis espécimes de cada tecido foram esterilizados com óxido de etileno e outros dezesesseis espécimes foram reservados como grupo controle (sem esterilização). Para análise da influência da esterilização

sobre a perda mineral e a profundidade de lesão, os espécimes foram submetidos à desmineralização por 2 semanas, tendo sido, em seguida, analisados por meio de microrradiografias transversais. Os resultados obtidos demonstram que a esterilização por meio de óxido de etileno não alterou a resistência à desmineralização da dentina. Entretanto, a profundidade das lesões de esmalte foi significativamente diminuída nas amostras do grupo submetido à esterilização por meio de óxido de etileno. Apesar disso, os autores consideraram esse efeito irrelevante para a realização de estudos *in situ* que envolvam desafios cariogênicos.

Com o objetivo de avaliar os efeitos da esterilização por meio de irradiação gamma sobre as propriedades nano-mecânicas da dentina e do esmalte, foi realizado um estudo por Brauer et al.⁷ (2008). Dezoito terceiros molares de origem humana foram distribuídos em 3 grupos (n=6): I – controle não irradiado, II – irradiação gamma (7 kGy por 40 h) e III – irradiação gamma (35 kGy por 200 h). Após a irradiação, as coroas dos dentes foram seccionadas oclusalmente, polidas e submetidas a quatro sequências de 6 nanoindentações (2 na face vestibular e 2 na face lingual), sob carga de 400 μ N em dentina e 2000 μ N em esmalte. O módulo de elasticidade e a dureza de cada tecido foram calculados a partir dos valores obtidos pelas nanoindentações. Os resultados obtidos para esmalte e dentina demonstraram que não ocorreu diferença estatisticamente significativa entre os grupos, tanto em relação ao módulo de elasticidade quanto em relação à dureza. Dessa forma, a esterilização de dentes por meio da irradiação gamma não provoca alterações nas propriedades nano-mecânicas do esmalte e da dentina.

Viana et al.⁷⁹ (2010), realizaram um estudo onde a eficácia da irradiação por micro-ondas na desinfecção do esmalte dental foi avaliada, assim como seu efeito sobre a microdureza superficial (SMH) e microdureza em secção transversal (TMH) do esmalte hígido, desmineralizado e remineralizado. Quarenta espécimes de esmalte bovino foram distribuídos em dois grupos (n = 20): controle (não irradiado) e micro-ondas. Os espécimes foram imersos em água e irradiados (650 W durante 3 min.) Os espécimes foram imersos em meio TSB e incubadas a 37°C durante 7 dias sob condições de aerobiose e anaerobiose. Foi realizada avaliação da efetividade por meio de contagem de UFC/mL. Para isso, foram realizadas diluições seriadas e plaqueamento em placas de ágar sangue, que foram incubadas em condições de aerobiose e anaerobiose. Outros 20 espécimes de esmalte (4 × 4 mm) foram incluídos em resina acrílica, polidos e seccionados em

duas metades: um dos fragmentos foi reservado como controle, enquanto o outro foi irradiado por meio de micro-ondas. SMH e TMH do esmalte hígido foram analisadas para ambos os grupos. A perda mineral do esmalte também foi indiretamente avaliada por meio do cálculo do DeltaKI. A TMH foi, ainda, avaliada após ciclos de desmineralização e remineralização. Os dados foram analisados estatisticamente pelo teste t de Student pareado ($\alpha = 0,05$). Não foi observado desenvolvimento de microrganismos nas placas referentes aos espécimes irradiados por meio de micro-ondas, no entanto, uma quantidade elevada de microrganismos foi observada nos espécimes do grupo controle. Não foram observadas diferenças significativas nas avaliações de SMH, TMH e DeltaKI entre os grupos de controle e de micro-ondas. Os autores concluíram que a irradiação por micro-ondas durante 3 min a 650 W foi eficaz para a completa desinfecção dos espécimes de esmalte bovino, sem afetar a SMH e a TMH do esmalte hígido, desmineralizado e remineralizado.

2.2 Efeitos dos métodos de esterilização

O efeito da umidade no processo de esterilização por óxido de etileno foi avaliado por Gilbert et al.²⁴ (1964). As células bacterianas desidratadas em níveis considerados ponto crítico não reagem de maneira uniforme à esterilização por óxido de etileno. A porcentagem de células resistentes ao efeito letal de óxido de etileno após a dessecação é frequentemente muito pequena, com valores que variam de 0,1 a 0,001%. No entanto, 5% de células resistentes foram observadas quando os microrganismos foram secos e, posteriormente, imersos em caldo. A presença de matéria orgânica, aumentou a porcentagem de células que se tornam resistentes ao óxido de etileno após a desidratação. O fenômeno é produzido pela exposição das células ao vácuo ou a uma atmosfera quimicamente desidratada. Apesar disso, esta resistência não consiste em uma mudança permanente, porque as células resistentes podem tornar-se rapidamente suscetíveis se forem umedecidos com água. Por outro lado, a simples exposição a uma alta umidade relativa (UR), ou seja, condições de 75 a 98%, após dessecação requer 6 e 4 dias, respectivamente, para ultrapassar esta resistência. Estudos que avaliaram as condições de umidade mostraram que há menos água em células bacterianas que foram dissecadas e, em seguida, equilibradas com valores elevados UR

sucessivamente até 100% de umidade relativa, do que em células que não foram dessecadas, mas foram secas naturalmente até serem equilibradas com os mesmos valores UR.

Os efeitos dose dependentes da inalação de óxido de etileno sobre a espermatogênese foi avaliada em ratos por Mori et al. ⁴⁹ (1991). Foram utilizados ratos wistar machos, que foram expostos ao óxido de etileno (EO), em concentrações de 50, 100 ou 250 ppm, durante 6 h por dia, cinco dias por semana, durante 13 semanas. A influência da relação dose efeito referente a inalação de EO sobre a espermatogênese foi avaliado. Os parâmetros utilizados foram o peso dos testículos e do epidídimo, alterações histopatológicas, alterações de atividade do X lactato desidrogenase (LDH X) no testículo, contagens de espermatozoides e anomalias na cabeça dos espermatozoides e no epidídimo. A concentração de 250 ppm promoveu uma diminuição no peso do epidídimo, pequenas degenerações em túbulos seminíferos, diminuição da contagem de espermatozoides e aumento do número de espermatozoides com cabeça de anormal na cauda do epidídimo. Estas alterações não foram observadas em doses mais baixas. Foi realizada a classificação do tipo de dano observado na cabeças dos espermatozoides, tendo sido classificados em tipos imaturos e tipos teratic. Foi observado que o número de cabeças imaturas aumentou apenas em 250 ppm. Por outro lado, na comparação realizada com o grupo de controle, o tipo teratic apresentou aumento quando as doses de 50 e 100 ppm de óxido de etileno foram utilizadas. Assim, a inalação subcrônica de EO em baixas concentrações afeta a espermatogênese em ratos.

Em 1992, Korystov ³⁸ realizou um trabalho onde alguns estudos sobre a contribuição dos efeitos diretos e indiretos da radiação ionizante no processo de morte celular foram discutidos. A contribuição de efeitos indiretos sobre a ocorrência de danos celulares normalmente é avaliada por meio de componentes exógenos secos ou congelados, visando interceptar radicais de água. No entanto, de acordo com o autor, a quantificação da contribuição dos efeitos diretos e indiretos da radiação sobre a indução de inativação celular, causados por série de métodos, ainda deve ser estabelecida. Os autor descreve um estudo em que os efeitos diretos da irradiação, avaliados por meio de diferentes métodos, desempenham um papel importante no processo de morte celular, podendo ser considerados tão importantes quanto os efeitos indiretos. Além deste trabalho, os autor comenta outro estudo, no qual o aumento da sensibilidade a radiação foi observado em células secas. Para

explicar estes resultados foi proposto que a mudança na radiosensibilidade poderia estar associada não somente a desidratação, mas também a outros efeitos adversos. A presença destes efeitos tem sido considerada como de menor importância quando comparados aos efeitos indiretos. O autor concluiu que não foi possível fazer uma estimativa qualitativa dos efeitos diretos e indiretos da radiação, devido as discrepâncias observada nos dados obtidos pelos estudos avaliados. Para realizar uma avaliação qualitativa, os autor sugeriu que os estudos devem ser planejados levando em consideração a necessidade de uma seleção preliminar de métodos e condições experimentais, buscando minimizar a variabilidade dos resultados, fato não observado nos estudos avaliados.

O efeito da irradiação por meio de micro-ondas na esterilização de instrumentais cirúrgicos contaminados com *C. albicans* foi avaliado por Rosaspina et al.⁶² (1994). *C. albicans* foi utilizada na contaminação das amostras (50 lâminas de bisturi em aço inoxidável e 25 lamínulas de microscopia). Em seguida, foram imersas em recipiente de vidro contendo 0,4 cm de esferas de vidro e água destilada. Esses recipientes foram irradiados a 600 W por 1, 3, 5, ou 6 min. As amostras do grupo controle foram preparadas similarmente às irradiadas, sendo esterilizadas em estufa por 2 h a 140°C ou em autoclave por 20 min a 121°C. Amostras adicionais foram imersas em banho de água fervente durante os mesmos tempos determinados para as exposições às micro-ondas. Além disso, algumas foram preparadas para análise em MEV. As lâminas de bisturi e de microscopia foram colocadas em contato com placas de Petri contendo ágar tryptic soy e incubadas a 37°C por 48 h. Os resultados demonstraram esterilização das amostras após 2 min de irradiação por micro-ondas. A análise em MEV revelou que alterações causadas pelas micro-ondas para o microrganismo estudado foram proporcionais ao tempo de exposição testado. Quando amostras contaminadas foram colocadas em banho de água fervente por 9 min, foi verificada inativação microbiana, embora não tenham sido observadas modificações na morfologia celular dos microrganismos. Foi sugerido que as micro-ondas produziram efeito letal inicial sobre os microrganismos sem provocar alterações em sua morfologia celular. A desintegração celular foi observada em tempo de exposição prolongado. Como as alterações morfológicas obtidas após a exposição às micro-ondas foram completamente diferentes daquelas verificadas após o tratamento em banho de água, os autores concluíram que, além de um efeito proporcionado pelo aumento de temperatura, as micro-ondas também

exerceriam um efeito mais complexo no corpo celular dos microrganismos. Esse efeito, segundo os autores, ainda precisa ser avaliado.

Atmaca et al.⁵ (1996), avaliaram o efeito da irradiação por micro-ondas e da aplicação de calor convencional na reprodução de bactérias. Cepas de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa* e *Pseudomonas acidovorans* foram cultivadas em suspensão, e o número de UFC/mL de cada espécie foi determinado e utilizado como controle. Uma alíquota de 1 mL de cada suspensão bacteriana foi irradiada por micro-ondas a 550 W por 5, 6, 7, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25 e 30 s. Em seguida, cada suspensão foi diluída e cultivada em placas a 37°C por 24 h e os valores de UFC/mL foram calculados. A temperatura da suspensão bacteriana foi determinada por meio de um termômetro digital antes e após a irradiação. O experimento foi realizado cinco vezes para cada espécie bacteriana e para cada tempo de exposição. Também foram realizados experimentos com aplicação de calor convencional durante 16, 20, 25 e 30 s, tempos em que a contagem de bactéria foi significativamente reduzida. Suspensões de 5 mL de cada espécie bacteriana também foram irradiadas durante 14, 16, 18, 20, 25 e 30 s. Os resultados demonstraram que a redução na contagem de bactérias após a irradiação por micro-ondas foi estatisticamente significante em relação ao controle. A diminuição na contagem de bactérias expostas ao calor convencional foi significativa em relação às amostras irradiadas por micro-ondas. Porém, diferentemente ao observado com as amostras irradiadas, a aplicação de calor convencional por 30 s resultou em sobrevivência bacteriana, de modo que tempos adicionais de 1 e 2 min de aplicação de calor convencional também foram avaliados. O aumento do volume das suspensões exacerbou o efeito destrutivo das micro-ondas, uma vez que, após a irradiação, os valores de UFC/mL das suspensões de 5 mL foram significativamente inferiores que a das suspensões de 1 mL. Os autores concluíram que o efeito da irradiação por micro-ondas na inativação de bactérias é diferente do efeito térmico e que o conteúdo de líquido no meio desempenha uma função importante na absorção da energia originada pela irradiação por micro-ondas.

2.3 Análises das propriedades do esmalte

A variação na composição do esmalte dental foi avaliada por Robinson et al.⁵⁹ (1971), por meio do seccionamento de espécimes de esmalte polidos. Técnicas de micro-amostragem e micro-analíticas foram utilizadas para determinar a distribuição de cálcio, fósforo e de proteínas em secções individuais de esmalte. Os valores absolutos de cálcio, fósforo e de proteínas observados foram variáveis, porém consistentes, apresentando índices de 30 a 40% de cálcio, 13 a 23% de fósforo, e 0,002 a 0,015 moles de amino ácidos/100 µg de esmalte. Os valores médios de cálcio (37,5%), fósforo (17,5%) e da razão Ca/P (2,1), coincidiram com os valores citados na literatura. O volume de tecido ocupado pelos minerais e o significado dos padrões de distribuição, assim como a composição estão diretamente envolvidos no processo de formação da cárie em esmalte.

Weatherell et al.⁸² (1974), realizaram um trabalho no qual vários estudos envolvendo análises de composição química do esmalte humano foram discutidos. O objetivo foi reunir um conjunto de informações a respeito das variações existentes na composição química dos dentes humanos. Dentre os tópicos abordados, os padrões de distribuição dos componentes nos tecidos dentais mostrou que, o conteúdo mineral do esmalte e a concentração de componentes, apresentam diferenças quando a superfície do esmalte é comparada ao esmalte proveniente das porções mais internas, próximo a junção esmalte-dentina. As densidades de cálcio, fosfato e a concentração de flúor diminuem, enquanto as concentrações de magnésio carbonato e cloro aumentam da superfície para o interior do esmalte. Também foi discutido a estabilidade do padrão químico do esmalte após sua formação, de maneira que, as alterações observadas neste tecido podem ser atribuídas a fatores externos, como desgaste, cárie e ação de agentes químicos externos. Outros tópicos como a concentração de flúor na superfície do esmalte, alterações químicas ocorridas devido à presença pontos de desmineralização no esmalte (lesões esbranquiçadas) e, ainda, o processo envolvido na remineralização do esmalte cariado também foram abordados.

A variação de temperatura em alta resolução do fosfato de cálcio foi avaliada com a utilização de RMN por Rothwell et al.⁶³ (1980). As técnicas, RMN-MAS (rotação em torno do ângulo mágico) ³¹P e aprimoramento de prótons, foram

utilizadas para caracterizar os seguintes compostos: hidroxiapatita, $\text{Ca}_{10}(\text{OH})_2(\text{PO}_4)_6$ e suas formas não estequiométricas $\text{Ca}_{10}\text{F}_2(\text{PO}_4)_6$; $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; CaHPO_4 ; $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$; $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ e, esmalte dental (utilizado como exemplo de tecido mineralizado). Os desvios químicos do ^{31}P isotrópico apresentaram uma tendência de deslocamento, indicando protonação do fosfato. O deslocamento químico anisotrópico foi pequeno nos grupos PO_4^{-3} , porém, significativamente maior para os grupos HPO_4^{-2} e $\text{H}_2\text{PO}_4^{-}$, onde o modo axial assimétrico dos tensores de deslocamento de largura 100 a 130 ppm foram observados. Para o $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, um aumento largura do pico resultou na mudança da anisotropia dos grupos HPO_4^{-2} em -165°C , sugerindo que componentes atômicos ou moleculares foram parcialmente resfriados. Sob temperatura ambiente, os espectros das amostras sintéticas de hidroxiapatita não estequiométrica apresentaram de Ca/P reduzidos com valor de 1,33, que se assemelham aos da hidroxiapatita estequiométrica (Ca/P = 1,67). Por serem não estequiométricas, estas amostras apresentam compostos adicionais, com proporções Ca/P inferiores a 1,6. Um sistema envolvendo disponibilidade de Ca^{2+} , em uma estrutura de hidroxiapatita com uma perda concomitante de íons OH e, da adição de prótons, parece mais consistente com os resultados obtidos por NMR. Estes prótons adicionais não aparentam ser grupos HPO_4^{-2} . Espectros obtidos sob temperatura de 180°C forneceram evidências dos deslocamentos relacionados ao fosfato protonado na estrutura da hidroxiapatita.

No estudo de Nelson e Featherstone⁵¹, realizado em 1982, diversas apatitas sintéticas carbonadas foram avaliadas por meio de IR, Raman, difração de raios-X (DRX) e análises químicas, comparando hidroxiapatita estequiométrica e esmalte dental. As apatitas sintéticas foram preparadas por precipitação aquosa e por reação em estado sólido, sob elevadas temperaturas. Foi descrito um método para a determinação dos tipos de carbonato na apatita, utilizando cromatografia gasosa. Este estudo demonstrou que o carbonato pode existir em dois locais distintos cristalograficamente na estrutura cristalina de apatita. Este resultado consiste em um mecanismo de substituição de carbonato por fosfato, em que quatro grupos carbonato substituem três grupos fosfato. Íons do tipo sódio e hidroxila foram relacionados ao processo de substituição com carbonato na estrutura de apatita. As proporções de sódio/carbonato e cálcio/fósforo observadas confirmaram este

mecanismo. Substituições deste tipo podem explicar o modo predominante de substituição por carbonato ocorrido nas apatitas biológicas.

Em 1988, Belton et al. ⁶, realizaram um estudo em que a técnica de RMN ³¹P de estado sólido foi utilizada na avaliação de fosfatos de cálcio inorgânicos sintéticos. RMN ³¹P de estado sólido foi utilizada para examinar um conjunto de amostras sintéticas de fosfato de cálcio. Uma amostra específica, de componentes múltiplos, apresentou um comportamento distinto, com espectro indicado alterações com o tempo. Um dos componentes foi identificado como sendo de monetita. A capacidade para distinguir entre as unidades de fosfato protonadas e não-protonadas provou ser efetiva na interpretação de espectros para este tipo de amostra. A largura das linhas tem sido considerada uma característica do grau de cristalinidade da amostra em fosfatos de cálcio amorfo (ACP). A maturação do ACP, juntamente com os efeitos na cristalinidade promovidos na ACP pela introdução de carbonato foram monitorizados por RMN.

Em 1990, Ruse et al. ⁶⁴, desenvolveram um estudo onde as análises, XPS e de espectroscopia de íons e massa secundária (SIMS), foram realizadas em espécimes de esmalte com diferentes procedimentos de obtenção: hígidos e não polidos, hígidos e polidos e amostras trituradas, provenientes da face vestibular de incisivos bovinos jovens. Estes espécimes foram expostos a quatro diferentes tratamentos: (1) imersão em 35 % de H₂O₂ por 60 min, (2) imersão em 37% de H₃PO₄ durante 60 s, (3) imersão em 35% de H₂O₂ por 60 min, em água destilada durante 2 min e em 37% de H₃PO₄ durante 60 s, (4) imersão em 37% de H₃PO₄ durante 60 s, em água destilada durante 2 min e em 35% de H₂O₂ durante 60 min. Espécimes de esmalte não tratados e hidroxiapatita sintéticas foram utilizados como controle para todos os tratamentos avaliados. As análises indicaram que a exposição a 35% de H₂O₂ por si só, apesar de aumentar o conteúdo de nitrogênio, não produziu nenhuma outra alteração significativa na composição elementar de todas as superfícies de esmalte avaliadas. A exposição a 37% de H₃PO₄, no entanto, produziu uma redução acentuada nas concentrações de cálcio e fósforo e um aumento nas concentrações de carbono e nitrogênio, apenas em espécimes hígidos e não polidos, apresentando, também, uma diminuição na concentração de carbono nas amostras polidas. Estes resultados sugerem que a diminuição na força de adesiva de resina relatada para o esmalte tratado com 35% de H₂O₂ não é causada por uma alteração na composição elementar das superfícies de esmalte.

Os resultados também indicaram que, uma camada rica em componentes orgânicos, não afetada pelo condicionamento ácido, pode estar presente na superfície dos espécimes hígidos e não polidos dos incisivos bovinos jovens. Esta camada pode ser removida pelo processo de polimento ou pela trituração do espécime. A presença desta camada deve ser considerada quando dentes bovinos jovens forem utilizados em estudos para a avaliação da adesividade de resinas.

Featherstone et al.²² (1993) realizaram um estudo onde as apatitas contendo Na, Mg, e de CO₃, similares aos minerais do esmalte dental, foram sintetizados por precipitação a partir de soluções aquosas. Os padrões de DRX mostraram apenas reflexões de apatita, que foram ligeiramente mais amplas do que as do esmalte. As imagens de raios-X de Guinier mostraram reflexões difusas, a partir das quais não foi possível determinar parâmetros de rede. O espectro de absorção infravermelho (IR) das amostras sintéticas foi praticamente idêntico ao do esmalte dentário. No entanto, após o aquecimento das amostras durante 30 min, sob temperatura de 300 e 600°C, nenhum pico de absorção foi encontrado no espectro em 2.340 cm⁻¹, assim como no espectro de IR referente ao esmalte dental após o aquecimento.

Em 1997, Wentrup-Byrne et al.⁸³ realizaram um estudo utilizando a técnica de mapeamento microscópico por Raman, para examinar a distribuição de componentes minerais e orgânicos na secção transversal de um dente humano. A distribuição relativa dos íons de carbonato e fosfato, bem como os componentes da matriz orgânica, foram traçadas utilizando mapas de grupos funcionais. A distribuição dos componentes orgânicos foi examinada utilizando a banda de estiramento C-H entre 2.880 a 2.700 cm⁻¹. As distribuições de fosfato e carbonato foram determinadas utilizando as respectivas vibrações simétricas de alongamento, ν_s (PO) em 961 cm⁻¹ e ν_s (CO) em 1.070 cm⁻¹. Mapas referentes a junção esmalte-dentina, de elevada resolução (10 μ m), mostraram que a quantidade de fosfato é menor nesta região. Uma série de espectros a 2 cm⁻¹, foram utilizados para o ajuste da curva da banda de ν_s (CO), visando determinar a concentração de íons carbonato tipo B na hidroxiapatita. Esta análise revelou que a concentração de carbonato parece ser maior nas proximidades da junção esmalte-dentina quando comparada à superfície externa do esmalte. Os resultados revelam que a realização da deconvolução da banda envelope do ν_s (CO) e ν_{as} (PO) de alongamento assimétrico do fosfato, é mais complicada do que havia sido relatado por outros estudos. A

vantagem mapeamento Raman do grupo funcional é que, além de identificar os componentes químicos, esta análise possibilita a obtenção de informações valiosas sobre a microestrutura, incluindo a distribuição dos componentes em toda a superfície, e, em particular, na interface esmalte-dentina. A preparação dos espécimes é mínima, sem necessidade de aplicação de agentes químicos, possibilitando a obtenção de informação diretamente relacionadas às propriedades físicas e a função biológica de tais tecidos.

De acordo com Tsuda e Arends⁸⁷ (1997), a técnica de espectroscopia de Raman permite a obtenção de espectros vibracionais de minerais, por meio da análise da luz difusa (IR e de extremo-IR), provocada pela excitação laser monocromática. O método possui várias vantagens sobre a absorção de IR, incluindo a preparação simples das amostras, análise simples dos espectros e resposta linear à concentração de minerais. Nos sistemas de micro Raman, as amostras são posicionados sob um microscópio óptico, e podem ser avaliadas com uma resolução lateral de aproximadamente 1 mm. Neste artigo foram revisados as aplicações de microespectroscopia Raman com transformada de Fourier (FT Raman) e espectroscopia Raman próximo ao IR (FTIR) para o estudo dos tecidos duros dentais e do cálculo dental. Uma atenção especial foi dada aos componentes minerais do esmalte, dentina, cálculo dental, e fluoreto de cálcio formados no esmalte. Os resultados da utilização de micro Raman, equipado laser Ar, mostrou que o CaF_2 formado no esmalte após o tratamento APF é detectável e pode ser diferenciado do CaF_2 puro. Por meio desta técnica, a orientação dos cristalitos do esmalte também pode ser determinada. Um espectrômetro Raman com transformada de Fourier e laser diodo de Nd: YAG (1.06 mm) podem ser utilizados para obter sinais de Raman livres de fluorescência em materiais biológicos e, para a identificação de componentes minerais presentes no cálculo dental.

Penel et al.⁵⁶ (1998), realizaram um estudo dos modos vibracionais PO_4 e CO_3 em apatitas sintéticas e biológicas por meio de micro Raman. Os modos vibracionais, referentes ao carbonato e ao fosfato, de diferentes apatitas sintéticas carbonadas e apatitas biológicas, foram comparadas com os da hidroxiapatita, avaliadas por micro Raman. A banda ν_1 do fosfato em 960 cm^{-1} apresentou um discreto deslocamento, devido à substituição do carbonato em ambos os pontos A e B. O espectro da apatita carbonada exibiu duas bandas $\text{PO}_4^3 \nu_1$ em 947 e 957 cm^{-1} . Não foram observadas alterações significativas nas regiões referentes aos modos ν_2

e ν_4 do fosfato em todas as amostras carbonadas. A região correspondente ao PO_4^{3-} ν_3 aparentou ser mais afetada pela carbonatação, tendo sido duas bandas principais observadas, tal como no espectro referente a hidroxiapatita, porém, de baixa intensidade. Os espectros de fosfato de todas as apatita biológicas foram consistentes com o tipo A e B de apatita carbonada. No espectro do esmalte, foram observadas duas bandas em 3.513 e 3.573 cm^{-1} , possivelmente devido a dois diferentes ambientes de hidroxila. Duas bandas distintas foram identificados, devido ao modo de ν_1 do carbonato, dependendo do local da substituição de carbonato (A ou B), em 1.107 e 1.070 cm^{-1} , respectivamente. Os resultados, comparados com os dados de infravermelhos já relatados, sugerem que mesmo níveis baixos de substituição do carbonato de podem induzir a modificações do espectro da hidroxiapatita. O aumento no número de substituições, no entanto, não proporciona qualquer outra alteração. O espectro da dentina e do osso mostraram uma forte semelhança ao nível micrométrico. Este estudo demonstrou, por meio de Raman, a existência de fosfato ácido em tecidos biológicos de composição mineral. Os conteúdos de HPO_4^{2-} e CO_3^{2-} aumentaram do esmalte para a dentina e, da dentina para o tecido ósseo. No entanto, esses dois fenômenos não parecem estar relacionados.

Ainda em 1997, Sonju Clasen e Ruyter⁷³ realizaram um estudo onde, a determinação quantitativa do tipo A e B de carbonato em esmalte humano, decíduo e permanente, foi avaliada por meio de FTIR. Tem sido demonstrado que a progressão da cárie parece ser mais rápida nos dentes decíduos do que nos permanentes. Vários fatores influenciam a progressão da cárie, podendo ser considerados as variações na composição química dos dois tipos de esmalte. O íon carbonato é conhecido por ocupar duas posições diferentes na estrutura hidroxiapatita do esmalte, a hidroxila de posição (A) e o fosfato de posição (B). O carbonato apresenta importância química diferente para cada posição ocupada. Neste estudo, foi realizada a determinação quantitativa do carbonato nas duas posições (tipo A e tipo B), no esmalte proveniente dos dentes decíduos e permanentes, por meio de FTIR. As curvas de calibração, realizadas com hidroxiapatitas sintéticas carbonadas nas duas posições, foram utilizadas para determinar a quantidade de carbonatos de tipo A e do tipo B, em ambos os tipos de esmalte. O esmalte decíduo apresentou muito mais carbonato do tipo A do que o esmalte permanente. O teor de carbonato total (soma dos tipos A e B) também foi

significativamente mais elevado nos dentes decíduos quando comparados ao esmalte permanente. Análise por meio de TG realizada nas amostras de esmalte, confirmou as determinações de carbonato quantitativas obtidas por FTIR. A diferença no teor de carbonato entre esmalte decíduo e permanente pode ser um dos fatores que atuam contribuindo para a rápida progressão da cárie em dentes decíduos.

Robinson et al.⁵⁸ (2000) estudaram as alterações químicas envolvidas no processo de destruição esmalte pela cárie. Os autores consideraram este processo complexo, sendo atribuído a uma série de fatores. Primeiramente, a hidroxiapatita substituída, principal componente do esmalte dental, pode se comportar de uma maneira muito complexa, durante a dissolução do esmalte. Este fato se deve não só a sua capacidade de aceitar íons dos substituintes, mas também, pela grande variedade de espécies de fosfato de cálcio que podem constituir a fase dissolução. Além disso, a composição (grau de substituição) e as alterações ao longo do esmalte devido ao ataque do processo de cárie tem sido observadas da superfície para o interior. Tanto a superfície, quanto as zonas positivamente birrefringentes da lesão, ilustram claramente que a destruição por cárie não é um processo simples. A dissolução seletiva de minerais solúveis ocorre e existe a probabilidade de reprecipitação. O papel do flúor neste momento é crucial, na medida em que ele não somente protege o esmalte em si, mas também, a sua presença na solução, indica que espécies fluoretadas insolúveis podem se formar muito facilmente, incentivando redeposição. De acordo com os autores, outros estudos devem ser realizados para definir o papel dos materiais orgânicos, no entanto, existe a possibilidade real de ocorrência de ambas, inibição de reparação e facilitação da redeposição. A presença de flúor em lesões profundas parece constituir uma perspectiva de melhora da reparação. A elucidação do papel dos componentes orgânicos também pode esclarecer supostos mecanismos de estimulação e reparação ou de proteção do conteúdo mineral do esmalte.

Panda et al.⁵³ (2003), utilizaram as técnicas FTIR, DRX, SEM e RMN de estado sólido para avaliar carbonato-hidroxiapatita constituídas por nanopartículas sintetizados pela técnica de gel hidróxido. Hidroxiapatitas nanocristalinas (AH), $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, foram sintetizadas por meio de uma técnica de conversão de precipitados utilizando gel hidróxido sob temperaturas mais baixas, como 80°C. A cristalização da HA em estrutura hexagonal (grupo espacial: $\text{P6}_3/\text{m}$),

foi realizada com parâmetros estruturais de tamanho de cristalito de cerca de 17 nm para amostras aquecidas a 80°C. As micrografias obtidas mostraram cristais hexagonais, com partículas de dimensões médias de aproximadamente 50 × 20 nm nas amostras aquecidas a 80°C. A análise da estrutura por DRX, FTIR, ¹H e ³¹P RMN-MAS indicaram a existência de uma desordem estrutural na superfície das partículas. Aparentemente, pontes de hidrogênio não se formaram devido à falta de parâmetros de ligação adequados ou, ainda, de formas muito fraca ligação dipolar. A desordem estrutural foi atribuída às interações químicas entre os grupos fosfato, com adsorção de água na superfície, ou de grupos hidroxila na superfície das nanopartículas.

A caracterização espectroscópica de superfícies de esmalte irradiadas com o laser Er: YAG laser foi avaliada por Mine et al.⁴⁷ (2006). O objetivo deste estudo foi investigar o efeito da irradiação por laser sobre a superfície do esmalte. Superfícies polidas de esmalte bovino foram irradiadas com o laser Er: YAG e avaliadas por meio de XPS. Na superfície de esmalte referente ao grupo controle, a análise possibilitou a detecção dos picos principais correspondentes aos componentes carbono (1s C) e nitrogênio (N 1s), bem como cálcio (Ca 2s, Ca 2p, Ca 3s, Ca 3p), fósforo (P 2s, P 2p) e oxigênio (O 1s). Após a irradiação, a análise XPS revelou que a intensidade do pico C 1s foi ligeiramente diminuída, enquanto a da N 1s foi diminuída, porém, abaixo do limite de detecção. A avaliação dos espectros de alta resolução do C 1s correspondentes a superfície dos espécimes irradiados pelo laser Er: YAG, mostraram que os componentes C-O/C-N, C=O/-CON=, -COO-, e CO₃⁻², atribuídos à composição específica esmalte e, também, a contaminação usual por carbono, apresentaram-se relativamente reduzidos. As energias de ligação do Ca 2p e do P 2p e a razão Ca/P referentes ao esmalte irradiado, foram consideradas diferentes do esmalte do grupo controle (não irradiado). Foi também demonstrado que o laser Er: YAG promoveu alterações de superfície compatíveis a efeitos de ablação dos componentes inorgânicos da apatita do esmalte dental.

Liu e Hsu⁴² (2007), realizaram um estudo para avaliar os efeitos do laser sobre a composição química do esmalte, utilizando FT-Raman. Foram preparadas 12 janelas (1 × 1 mm), em seis incisivos decíduos livres de cárie. A análise FT-Raman foi realizada antes e depois do tratamento com laser Er: YAG (5,1 J/cm², 2 Hz, durante 5s). Visando avaliar a significância estatística dos efeitos do laser, os picos referentes ao fosfato ν₁, carbonatos dos tipos A e B e, ainda,

componentes orgânicos foram analisados estatisticamente por meio do teste t de Student pareado. A intensidade normalizada do carbonato tipo B diminuiu significativamente de 0,117 para 0,106 ($P = 0,029$), ao passo que a intensidade normalizada de carbonato do tipo A permaneceu inalterada ($P = 0,467$). Com relação aos componentes orgânicos, a intensidade padronizada dos picos diminuiu significativamente em 2.940 cm^{-1} e nas faixas de $1200\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$, apresentando valores de $P = 0,005$ e $P < 0,001$, respectivamente. A cristalinidade do esmalte, avaliada pela largura de banda de fosfato ν_1 , não sofreu alteração após o tratamento com laser ($P = 0,477$). O tratamento com laser pode proporcionar efeito preventivo na formação de cárie sobre o esmalte, por meio da redução de carbonato e modificação de matérias orgânicas. Os autores concluíram que o tratamento com laser pode proporcionar efeito preventivo no esmalte frente ao desenvolvimento de cárie, por meio da redução de carbonato e da modificação de componentes orgânicos.

Por meio de um estudo realizado em 2007, Antonakos et al.⁴, utilizaram micro-Raman e espectroscopia de infravermelho (IR) para o estudo de hidroxiapatita sintética carbonada do tipo B (CHAp), fluorapatita carbonada natural (CFap) e hidroxiapatita substituída por silício (SiHAp). Verificou-se que enquanto a substituição de carbonato do tipo B predomina nas apatitas carbonadas (CAps), a substituição do tipo A também está presente. A substituição envolvendo carbonato do tipo B causa um alargamento do PO ν_1 (modo de alongamento), que tem sido associado a uma desorganização atômica e redução na simetria local em CAps provenientes do C (6 h) e do C (3 h). Por meio de IR, foi observado um deslocamento de aproximadamente 15 cm^{-1} no PO₄ ν_3 (modo de alongamento), indicando descarbonação do CFap. Essa mudança, foi atribuída ao aumento dos comprimentos de ligação do PO, no plano espelho, quando o carbonato deixa a estrutura apatita. Os resultados obtidos confirmam o mecanismo de substituição proposto pelos autores. As razões referentes as intensidades das bandas CO₃ ν_2 e PO₄ ν_1 (IR), correspondentes as amostras com diversos conteúdos de carbonato, possibilitou a medida do grau de carbonação das CAps.

Gerth et al.²³ (2007), realizaram um estudo com o objetivo de desenvolver um modelo de estrutura molecular de dentes humanos após a exposição ao flúor. Este estudo utilizou como métodos XPS, RMN-MAS e Raman, para avaliar hidroxiapatita sintética em pó (HAp), amostras de esmalte humano em

pó e espécimes de esmalte humano tratado *in vitro* com fluoreto de amina. Os resultados apresentaram a caracterização estrutural completa dos produtos de fluoretação. Uma composição de três camadas contendo hidróxido de cálcio, fluoreto de cálcio e um tipo de apatita foram identificadas. A camada superficial de CaF_2 parece ter atuado como um reservatório flúor, incluindo uma camada de Ca(OH)_2 com efeito antimicrobiano. Ca(OH)_2 é um agente terapêutico bem conhecido. No entanto, até agora não haviam sido realizadas descrições da sua atuação como um produto da reação após a aplicação tópica de flúor. Abaixo da camada de Ca(OH)_2 , apatitas resistentes a ácidos (FAp), foram detectadas e atingiram diretamente os espécimes de HAp. A composição de três camadas foi identificada e considerada uma ferramenta para a compressão da influência da aplicação de fluoreto nos mecanismos patogênicos da cárie dental. Cada componente, neste modelo de estrutura recentemente sugerido, tem uma função específica, que esclarece como a fluoretação tópica do esmalte reduz a cárie dental e influencia os seus mecanismos patogênicos.

Tseng et al.⁷⁶ (2007), realizaram a caracterização por NMR das unidades de fosfato existentes em dentina de rato. Espécimes de dentina foram obtidos a partir de incisivos de ratos do tipo wistar, de diferentes idades. Uma série de técnicas físicas foram empregadas na caracterização dos espécimes, com particular destaque para a RMN em estado sólido ^{31}P . A estrutura da dentina de rato apresentou cristalitos de apatita envolvidos por uma matriz amorfa. Os autores relataram que, 19% dos cristais de apatita apresentavam grupos hidroxila, distribuídos próximo à superfície dos cristais. A região interna dos cristalitos apresentou deficiência em grupos hidroxila. De acordo com a idade dos ratos, várias alterações na composição química foram observadas na dentina: (i) o teor de água e a quantidade de fósforo diminuíram na matriz amorfa, (ii) a quantidade de espécies de fósforo nos cristais de apatita foi mantida e (iii) a perda de espécies de fósforo foi acompanhada por uma perda de cálcio com teor similar.

A composição química da superfície do esmalte dental humano foi avaliada por meio de XPS pelos autores Lou et al.⁴⁴ (2008). A composição química da superfície do esmalte dental tem sido postulada como um fator contribuinte para a variação da força de adesão dos brackets aos dentes e, por conseguinte, a probabilidade de falha no suporte durante o tratamento ortodôntico. Este estudo investigou, de maneira sistemática, a composição química das superfícies de

adesão de 98 de pré-molares humanos por meio de XPS, visando avaliar as diferenças de composição existentes entre os primeiros pré-molares direito e esquerdo. Os principais elementos detectados, em todas as amostras, foram cálcio, fósforo, oxigênio, nitrogênio e carbono. A composição da superfície foi considerada altamente variável entre as amostras e vários elementos foram considerados altamente correlacionados. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa na composição química dos primeiros molares superiores direito e esquerdo ($P > 0,05$). Os autores concluíram que o conhecimento da composição química da superfície do esmalte pode facilitar a realização de estudos futuros que utilizam estas informações para avaliar a adesividade ao esmalte dental.

Em 2009, De Sant'anna et al.¹⁷, realizaram um estudo onde, por meio da utilização de FT-Raman, foram avaliadas as mudanças na composição química do esmalte, induzidas pela terapia com laser diodo infravermelho de baixo nível e um creme indutor de absorção de luz superficial, avaliados antes e após o desafio cariogênico. Para a realização deste estudo, vinte e quatro molares decíduos livres de cárie, extraídos ou esfoliados, foram divididos em seis grupos: grupo controle (sem tratamento, $n = 8$); tratamento com laser infravermelho 810 nm a 100 mW/cm² durante 90 s (L, $n = 8$); irradiação com laser diodo infravermelho (810 nm a 100 mW/cm² por 90 s) e creme indutor (IVL, $n = 8$); creme indutor (IV, $n = 8$); irradiação com laser diodo infravermelho (810 nm a 100 mW/cm² por 90 s) e agente indutor IVLF fluorado ($n = 8$) e do agente indutor fluorado (IVF, $n = 8$). As amostras foram analisadas através de espectroscopia FT-Raman, antes e após a ciclagem de pH (desafio cariogênico). Os resultados indicaram uma redução significativa induzida pelo laser e, possível modificação do teor orgânico da matriz do esmalte tratada com o laser diodo de baixo nível (o L, IVL, e grupos IVFL). Os autores concluíram que a técnica FT-Raman pode ser utilizada para a detecção de alterações de composição e estruturais, observadas nas fases minerais e nas fases orgânicas do esmalte tratado com laser e utilizado em desafios cariogênicos.

Em 2010, Cheng et al.¹¹, avaliaram o efeito de compostos químicos de *Galla chinensis* sobre a remineralização do esmalte. Foram utilizados espécimes de esmalte bovino, sobre os quais foram formadas de lesões iniciais *in vitro*. Os espécimes contendo as lesões foram submetidos a um processo de ciclagem de pH, durante 12 dias. Cada ciclo diário incluiu aplicações com duração de 4 × 1 min, utilizando um dos quatro tratamentos: Grupo A: 1.000 ppm F (NaF, controle

positivo); Grupo B: água deionizada (DDW, controle negativo) e Grupo C: 4.000 ppm de extrato aquoso bruto de *G. chinensis* (GCE), Grupo D: 4000 ppm de ácido gálico. Os espécimes de esmalte foram analisados por MEV, EDS e DRX. Os resultados indicaram que a morfologia da superfície do esmalte diferiu em cada grupo. A composição mineral foi considerada semelhante a da hidroxiapatita, porém, as dimensões dos cristalitos de esmalte, em diferentes grupos, foram significativamente distintas. Além disso, as proporções de Ca/P também foram consideradas significativamente menores no grupo CGE. Os autores concluíram que o GCE pode afetar a concentração de íons minerais da camada superficial e, em seguida, modificar a remineralização da cárie dental inicial, apresentando um mecanismo que parece ser diferente entre GCE e ácido gálico.

A caracterização morfológica e química do esmalte dental exposto a agentes alcalinos foi avaliada por Taube et al.⁷⁵ (2010). Neste estudo, as alterações morfológicas e químicas do esmalte dos dentes expostos aos agentes alcalinos, com ou sem agentes surfactantes, foram avaliados. Além disso, os efeitos químicos da presença placa e de película (camada orgânica) na superfície também foram investigados. O estudo foi realizado utilizando várias técnicas: FTIR, XPS, DRX e MEV. Por meio da análise XPS foi observado que, a exposição a soluções alcalinas, resultou numa remoção maciça de carbono presente na superfície do dente. Com base nos resultados da análise FTIR, não foram observadas reações de substituição entre fosfato, carbonato e íons hidroxila na apatita do esmalte. Por meio da avaliação por MEV, degradação e perda de substância foram observadas na superfície do esmalte referente as amostras expostas. A análise por meio de DRX indicou que não foram encontradas alterações na cristalinidade da apatita do esmalte entre as amostras. Os resultados deste estudo indicaram que a exposição a soluções alcalinas resulta em uma degradação da superfície do esmalte, que difere muito da erosão ácida. A erosão ou a substituição química nos cristais de apatita não pôde ser diferenciada. Perda significativa de carbono orgânico foi observada na superfície do esmalte em todas as amostras expostas. A degradação da camada orgânica protetora, na superfície do esmalte, pode aumentar profundamente os riscos de desenvolvimento de cárie e erosão dental a partir de alimentos e bebidas ácidas.

Rodríguez-Vilchis et al.⁶¹ (2011), avaliaram por meio de microscopia de força atômica (AFM), MEV e EDS, as alterações morfológicas e estruturais

ocorridas no esmalte dental humano após irradiação com laser Er: YAG. Um estudo, havia demonstrado que irradiação por meio de laser Er: YAG, não promoveu aumento na resistência do esmalte desafio ácido e, ainda, produziu alterações morfológicas indesejáveis a superfície do esmalte, tais como crateras e fissuras. Cinquenta e duas amostras de esmalte humano foram distribuídas em quatro grupos ($n = 13$): I - controle (sem irradiação por laser), II, III e IV foram irradiados com o laser de Er: YAG 100 mJ ($12,7 \text{ J/cm}^2$), com 100 mJ ($7,5 \text{ J/cm}^2$), e 150 mJ (11 J/cm^2) respectivamente, a 10 Hz, com utilização de jato de água. As alterações morfológicas foram observadas por AFM e SEM. Por meio de EDS, as porcentagens referentes aos componentes cálcio, fósforo, oxigênio e cloro foram determinadas (% em peso), nas crateras resultantes e na sua periferia. Testes estatísticos de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis foram realizados ($P \leq 0,05$) para distinguir diferenças significativas entre os grupos. As imagens AFM mostraram fissuras com profundidades entre 250 nm e 750 nm para os Grupos II e IV, respectivamente, tendo sido as larguras das fendas de $5,37 \mu\text{m}$ e $2,58 \mu\text{m}$. O interior das fendas apresentou uma superfície áspera. As micrografias revelaram alterações morfológicas. A análise EDS detectou diferenças significativas nos teores de Ca, P e Cl na cratera e na sua periferia. A análise por meio de AFM mostrou trincas com formato triangular. As micrografias de MEV mostraram que a presença de crateras foi evidente, tendo sido observadas em todas as amostras irradiadas. Não foi possível estabelecer um padrão químico característico nas crateras.

A correlação do teor de carbonato na microestrutura do esmalte, (química e cristalina) e as propriedades mecânicas, foram avaliadas por meio de análises de mapeamento linear por micro Raman e nanoindentação, por Xu et al.⁸⁸ (2012). Foi realizado um mapeamento desde a superfície exterior do esmalte até o interior, próximo a junção esmalte-dentina, nas regiões cervical, cúspide lingual e cúspide bucal. A intensidade do pico carbonato em 1.070 cm^{-1} aumentou progressivamente, do exterior para o interior esmalte. Além disso, a largura do pico de fosfato, medido por meio do cálculo largura total a meia altura (FWHM) do pico em 960 cm^{-1} , também aumentou, passando de $\sim 9 \text{ cm}^{-1}$ no esmalte exterior para $\sim 13 \text{ cm}^{-1}$ no esmalte adjacente a junção esmalte-dentina. Esta alteração indicou uma diminuição no grau de cristalinidade da hidroxiapatita do exterior para o interior do esmalte. Apesar disso, o módulo de Young diminuiu de 119 ± 12 para $80 \pm 19 \text{ GPa}$ entre a superfície do esmalte exterior e a do interior, com uma concomitante

diminuição da dureza do esmalte, de $5,9 \pm 1,4$ para $3,5 \pm 1,3$ GPa. Também foram observadas correlações significativas entre teor de carbonato e a cristalinidade, associadas as propriedades mecânicas. Como o conteúdo de carbonato aumentou, houve uma diminuição associada na cristalinidade, tendo sido estas alterações correlacionadas com a diminuição da resistência e da dureza. Coletivamente, estes resultados sugeriram que o conteúdo de carbonato do esmalte e a mudança associada na estrutura do cristal da hidroxiapatita, ou seja, do grau de cristalinidade, podem acarretar em efeito direto sobre as propriedades mecânicas do esmalte. A combinação de micro Raman e nanoindentação provou ser uma abordagem eficaz para avaliar a microestrutura do esmalte e suas propriedades associadas.

A microestrutura do esmalte de incisivos bovinos foi avaliada por Wang et al.⁸¹ (2012). De acordo com o autor, dentes bovinos têm sido considerados um excelente substituto para dentes humanos utilizados em pesquisas na área de Odontologia. O objetivo do estudo foi avaliar a microestrutura do esmalte de dentes bovinos, analisando os arranjos de prismáticos e interprismáticos e, detalhando suas relações espaciais. Oito incisivos bovinos foram utilizados para a obtenção de 77 espécimes, com as mesmas dimensões no sentido longitudinal, seccionados no sentido paralelo à junção esmalte-dentina. Todas as superfícies seccionadas foram tratadas 1 M HCl por 10 s, visando expor os prismas e interprismas, antes da observação por MEV. Os prismas de esmalte paralelos foram localizados em todo o esmalte exterior, na região cervical e na região incisal dos incisivos bovinos. O esmalte interno da porção vestibular e o cíngulo lingual apresentaram bandas de Hunter-Schreger, com as características de cruzamento entre os grupos, planos prismáticos e interprismáticos. Foi observado que as estruturas interprismáticas aparentaram ser mais espessas no esmalte interno do que no exterior de esmalte.

Spizzirri et al.⁷⁴ (2012), realizaram um estudo comparativo, para a determinar o conteúdo de carbonato em dentes humanos, usando espectroscopia Raman. A determinação do conteúdo de carbonato presente nas apatitas dentais, tais como esmalte e dentina, tem sido considerada importante para o estudo da dinâmica de cárie dental e defeitos do desenvolvimento destes tecidos. Tradicionalmente, estas determinações eram realizadas por digestão ácida, seguida por aferição da liberação do gás dióxido de carbono. Considerada uma alternativa frente a este método, a espectroscopia Raman foi utilizada para a determinação de carbonato em apatitas sintéticas carbonadas, com pelo menos quatro métodos

analíticas publicadas até agora. No entanto, esses métodos não foram aplicados a apatitas biológicas. O objetivo deste estudo comparativo foi testar a adequação destes quatro métodos na determinação do tipo B de carbonato no esmalte e na dentina humanos. Também foi apresentado um método para a determinação do teor de carbonato do tipo A em esmalte, utilizando a técnica de Raman. Os espectros de Raman foram obtidos a partir de 10 espécimes de esmalte e dentina, analisados com cada um dos quatro métodos, utilizando ajuste único ou ajuste múltiplo da banda $\text{PO}_4^{-3} \nu_1$. Cada um dos métodos resultou em uma determinação diferente para o teor de carbonato, quando os mesmos dados de foram utilizados. A determinação da concentração de carbonato de tipo B, por meio do método FWHM da banda $\text{PO}_4^{-3} \nu_1$, foi considerada como sendo a que apresenta maior concordância com (i) os resultados (utilizando o método de digestão com ácido) de dentes selecionados a partir da mesma amostra da população e (ii) dos valores previamente relatados para ambos esmalte e dentina. A utilização de um modelo de ajuste múltiplo das bandas espectrais proporciona maior precisão de determinação (particularmente no caso da dentina).

2.4 Desenvolvimento de biofilmes

Os mecanismos de desprendimento de biofilme em um leito líquido fluidizado foram avaliados por Chang et al. ¹⁰ (1991). O processo envolvendo a fluidificação do leito oferece vantagens aos biofilmes aderidos sem a ocorrência de obstrução dos poros. No entanto, a taxa de desagregação do biofilme, devido ao atrito e a hidrodinâmica partícula-a-partícula, é pouco compreendida no caso dos biofilmes formados em leito fluidificado. Neste trabalho, um leito fluidificado foi realizado em duas fases do biofilme, operando sob um carregamento superficial constante (0,09 mg de carbono orgânico total/cm² por dia), e com uma altura de leito (H), velocidade de fluidos (U), e concentração de partículas de suporte medida em C(p). Medidas diretas foram realizadas para o coeficiente específico da taxa de perda do biofilme (b(s)) e o acúmulo total de biofilme (X(f)L(f)). Um modelo hidrodinâmico permitiu a determinação independente da densidade de biofilme (X(F)), da espessura do biofilme (L(f)), do stress de cisalhamento líquido (tau), e do número de Reynolds (Re). A análise dos resultados de regressão múltipla mostrou

que o aumento do atrito das partículas para partículas, foi proporcional ao $C(p)$. O aumento da turbulência, descrito por Re , fez com que os biofilmes passassem de mais densos para mais finos. O coeficiente de taxa de desagregação específica ($b(s)$) aumentou à medida foi observado o aumento do $C(p)$. Praticamente os 6 valores são maiores do que o previsto pelo modelo anterior, derivado de biofilmes desenvolvidos sobre superfícies lisas e não fluidificadas. Portanto, a turbulência e o atrito do leito de fluidização parecem ser mecanismos de desprendimento de biofilmes dominantes.

Uma revisão da literatura, abordando o tema adesão de microrganismos durante a formação do biofilme dental, foi realizada por Kolenbrander et al.³⁶ (1993). Os autores relataram que a relação entre a coagregação e o surgimento de determinadas bactérias no biofilme dental já havia sido parcialmente esclarecido. A adesão dos microrganismos denominados colonizadores tardios à película adquirida, quando ocorre, é considerada do tipo inespecífica. Tem sido descrito que os colonizadores tardios coagregam, principalmente, com *Fusobactérias*, e esta coagregação é mediada por colonizadores iniciais. Os colonizadores iniciais, por sua vez, apresentam propriedades diferentes, de maneira que, muitos aderem diretamente a película e exibem extensas coagregações inter e intragenéricas. Todos os colonizadores iniciais coagregam com *Streptococcus* e/ou *Actinomyces*, que juntos consistem em mais de 90% dos microrganismos viáveis no início da formação do placa. O autor conclui que mais estudos precisam ser realizados para esclarecer a atuação das adesinas no processo de coagregação.

Em 1997, a utilização de enxaguatórios bucais para o desprendimento de bactérias aderidas ao biofilme formado o esmalte dental *in vitro* foi avaliado por Landa et al.⁴⁰. Tem sido descrito que, a maneira como o biofilme se desenvolve protege os microrganismos contra ataques ambientais, tais como agentes antimicrobianos ou a ação de detergentes. A adesão da biofilme dental ao esmalte ocorre por meio da adesão da colonizadores iniciais. Se esta adesão é interrompida, a toda o biofilme dental se desprende. Experimentos de perfusão realizados em câmara de fluxo indicaram que a utilização dos enxaguatórios (Corsodyl e Scope) não promoveu o desprendimento de bactérias aderidas a película formada no esmalte, enquanto a utilização de enxaguatório Plax ou de seus componentes detergentes, estimulou o desprendimento de várias espécies bacterianas aderidas a

película do esmalte. Após experimentos de perfusão em câmara de fluxo, realizados com os enxaguatórios, foi observado um ligeiro desprendimento adicional de bactérias aderidas na interface de passagem de líquido e ar. Após a perfusão com o enxaguatório Plax, no entanto, um número significativo de bactérias aderidas tiveram o seu desprendimento estimulado na interface líquido e ar, indicando que Plax promoveu enfraquecimento da força de adesão. A capacidade do enxaguatório Plax, ou de seus componentes detergentes, de remover a placa bacteriana nem sempre foi evidenciada a partir de experimentos *in vivo*, tendo sido os relatos sobre a sua eficácia clínica inconsistentes. Os autores sugerem que, provavelmente, os agentes antimicrobianos ou detergentes são incapazes de penetrar na placa e alcançar as bactérias aderidas ao biofilme.

A influência das proteases de *Enterococcus faecalis* e da proteína de colágeno de ligação (Ace), na adesão à dentina, foram abordadas no estudo de Hubble et al.³¹ (2003). *Enterococcus faecalis* tem sido considerado como um patógeno que persiste em canais radiculares medicados. Neste estudo, foi avaliada a hipótese de que as proteases de *E. faecalis*, serina e gelatinase, e a proteína de ligação ao colágeno (Ace) podem contribuir para a adesão deste microrganismo ao canal radicular. MEV foi utilizada para examinar a ligação da dentina a quatro cepas de *E. faecalis*: OG1RF, tipo selvagem e, mutantes de três derivados OG1RF, TX5128, TX5243 e TX5256 deficientes em serina e gelatinase, serina, e Ace, respectivamente. Para cada cepa de microrganismo, 20 espécimes correspondentes a metades de raiz foram expostos a 3×10^9 e a 5×10^9 células/mL durante 6 h. As análises das bactérias aderidas foram realizadas em 50 campos para cada espécime de raiz. A análise estatística revelou que a adesão de OG1RF foi significativamente maior do que as cepas mutantes ($P < 0,001$), enquanto as diferenças significativas não foram detectados entre os mutantes da protease. Os dados indicam que a protease serina auxilia na adesão de *E. faecalis* à dentina, enquanto o papel da gelatinase não pôde ser esclarecido.

Hosoya et al.³⁰ (2003), realizaram um estudo *in vitro* com a finalidade de avaliar a influência do clareamento dental sobre a aderência de *Streptococcus mutans* ao esmalte. Foram utilizados terceiros molares (n=70), que tiveram a parte coronal cortada pela metade. As porções foram designadas ao grupos experimentais e controles. Os grupos experimentais foram submetidos aos seguintes tratamentos: (A) esmalte submetido ao clareamento por 1, 3 ou 5 vezes com ou sem

condicionamento, (B) condicionamento sem clareamento. (C) controle. Todas as amostras referentes ao grupo controle foram mantidas intactas em solução salina fisiológica. Foi realizada a aferição da rugosidade superficial do esmalte (Ra), nos 35 pares de amostras. O microrganismo *S. mutans* foi inoculado em meio de cultura TSB contendo 3% de glicose, incubado durante 72 h antes da adição dos outros 35 pares de amostras. Por meio de MEV, o número de colônias de *S. mutans* foi quantificado e analisado estatisticamente. Quando comparados aos controles, o esmalte clareado apresentou aumento no número de colônias de *S. mutans*. A realização de tratamentos de clareamento consecutivos aumentou a adesão bacteriana. Os valores mais elevados de quantificação de colônias foram encontrados nos grupos referentes a todos os tratamentos de clareamento ($p < 0,01$). Comparados aos controles, os grupos avaliados apresentaram aumento nos valores de rugosidade após o condicionamento. No entanto, não foi encontrada correlação linear entre o número de colônias de *S. mutans* e os valores de rugosidade. Os autores concluíram que tanto a rugosidade superficial quanto a adesão de *S. mutans* podem ter seus valores aumentados após o clareamento,

A modulação por guanosina cíclico-di-monofosfato em estruturas da superfície celular de bactérias foi avaliada por Jenal³² (2004). De acordo com este estudo, o nucleotídeo cíclico de (c-diGMP) foi reconhecido nos anos 1980 como um composto de sinalização parece estar envolvido no controle da condensação dos radicais de glicose em polímeros de celulose. Dados mais recentes de várias espécies bacterianas sugeriram que a c-diGMP pode ter uma função geral como mensageira secundária na modulação do crescimento bacteriano em superfícies. Este mecanismo poderia incluir a regulação de componentes de adesão celular e atuar na preparação das células para a ocorrência de interações célula-célula e de interações do tipo célula-superfície.

Em 2004, Katsikogianni e Missirlis³³ realizaram um trabalho onde estudos a respeito dos mecanismos de adesão bacteriana sobre superfícies de biomateriais, fatores que afetam a adesão, técnicas utilizadas para estimar interações bacterianas e os modelos desenvolvidos para avaliar a aderência, foram discutidos. De acordo com os autores, o processo de adesão bacteriana inclui uma fase de interação físico-química inicial e uma fase tardia, que consiste em interações moleculares e celulares. Tem sido considerada processo complexo, influenciado por muitos fatores, incluindo as propriedades bacterianas, as características da

superfície dos materiais, os fatores ambientais, tais como a presença de proteínas do soro e as condições de fluxo associadas. Foram descritas duas categorias relevantes de técnicas tem sido empregadas para avaliar as interações bacterianas. A primeira consiste nas que utilizam fluido atuando contra as bactérias aderidas, nesta técnica a porcentagem de bactérias que se desprendem pode ser contabilizada. A segunda técnica envolve a manipulação de bactérias em várias configurações, por meio da aplicação de força e, mais especificamente, proporcionando um embasamento para a análise teórica das interações envolvendo receptores. As teorias de Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO), da abordagem termodinâmica e da teoria DLVO estendida também foram revisadas.

Os efeitos provocados pela utilização de materiais adesivos no revestimento de superfícies de dentina radicular e sua influencia sobre a adesão de biofilmes foram avaliados, em 2008, por Daneshmehr et al.¹³. O emprego de materiais adesivos no selamento de superfícies radiculares expostas tem sido considerado uma abordagem promissora no controle da cárie de dentina radicular. O objetivo do estudo foi avaliar os efeitos do revestimento da superfície com adesivos sobre a inibição da adesão de biofilmes de *Streptococcus mutans*. Dentina radicular, proveniente de dentes bovinos, foi seccionada, polida com lixas de carbureto de silício de granulação 600 e utilizada para a obtenção dos espécimes. Três adesivos, Hybrid Bond (HB), Reactmer Bond (RB) ou Agite One (SO) foram utilizados, individualmente, no revestimento das superfícies de dentina, seguindo as instruções dos fabricantes. A superfície de dentina sem recobrimento serviu como controle. A rugosidade superficial das superfícies dentina revestidas e não revestidas foi avaliada por meio de medições em microscópio a laser. Biofilmes *in vitro* de *S. mutans* foram desenvolvidos na superfície de cada espécime, durante 20 h. Foi realizada a quantificação de microrganismos e de glucanos insolúveis em água presentes no biofilme. Os dados foram analisados estatisticamente utilizando-se ANOVA e de Tukey ($P < 0,05$). Todos os grupos correspondentes as superfícies revestidas apresentaram susceptibilidade significativamente menor quanto a adesão do biofilme, quando comparados a dentina radicular não revestida ($P < 0,05$). Entre os grupos revestidos, SO apresentou menor suscetibilidade ao desenvolvimento do biofilme. Os três materiais adesivos avaliados podem ser considerados efetivos para o revestimento de superfície radicular. O adesivo com liberação de flúor, SO, demonstrou grande potencial para resistir a formação do biofilme.

A bioadesão inicial a materiais dentários foi avaliada por Müller et al.⁵⁰ (2010). A adsorção de albumina do soro bovino (BSA) sobre superfícies de esmalte dental e de materiais dentários, foi investigada por espectroscopia de força de varredura. Este método atua fornecendo forças de adesão, que podem ser medidas em função do tempo de contato entre a proteína e a superfície, levando em consideração pH, habilidade e ponto isoelétrico da superfície. Os materiais cerâmicos e compósitos avaliados apresentaram índices semelhantes aos da aderência sobre o esmalte dental. Um forte aderência foi encontrada nas superfícies mais hidrofóbicas, isto é, o ouro, o titânio, o poli metacrilato de metila (PMMA), e poli tetrafluoroetileno (PTFE). Em superfícies hidrofílicas, a adesão foi influenciada principalmente pelas forças eletrostáticas entre a camada de proteínas e a superfície. No entanto, a alteração conformacional da BSA com valores de pH superiores a 8, foi considerada um fator importante. Na superfície altamente hidrofóbica de PTFE, a estrutura da interface espacial entre PTFE e a água desempenharam um papel importante na regulação da adesão de BSA.

As metodologias e os modelos de pesquisa utilizados em estudos de erosão foram discutidos no artigo de Shellis et al.⁷⁰ (2011). Este artigo resume os pontos de destaque discutidos no Seminário de Metodologia em Pesquisa Erosão em Zurique, realizado no de 2010. O objetivo deste trabalho foi oferecer orientação para o desenvolvimento e aplicação de ambos modelos *in vitro* e *in situ*, utilizados em pesquisa de erosão dental. As perspectivas para os ensaios clínicos também foram discutidas. Todos os modelos de pesquisa de erosão exigem uma série de opções sobre as condições experimentais, desenho do estudo e técnicas de medição e, esses aspectos gerais, foram discutidos em primeiro lugar. Entre os modelos *in vitro* (de exposição única ou múltipla), os modelos simples podem ser utilizados para a avaliação de produtos quanto ao seu potencial erosivo. Os modelos mais elaborados de ciclagem de pH podem ser utilizados para simular a erosão *in vivo*. Contudo, os modelos *in vitro* fornecem informação limitada sobre a erosão intraoral. Por meio da utilização de modelos *in situ*, é possível avaliar o efeito de desafios erosivos em condições intraorais, sendo atualmente, considerados o método de escolha para a realização de avaliações em curto prazo, envolvendo produtos de baixo potencial erosivo ou produtos terapêuticos destinados a prevenção. Os autores concluem que, no futuro, os ensaios clínicos irão permitir

avaliações de longo prazo. Possíveis metodologias para tais ensaios foram discutidas.

3 PROPOSIÇÃO

O presente estudo tem como objetivos avaliar o efeito de diferentes métodos de esterilização de esmalte bovino sobre:

1. A morfologia do esmalte, avaliada por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV), realizadas na superfície e em secção transversal;
2. A composição química elementar do esmalte, avaliada por meio de espectroscopia fotoeletrônica por raios-X (XPS) e por meio de energia dispersiva de raios-X (EDS);
3. A estrutura do esmalte, avaliada por meio de espectroscopia Raman e por meio de ressonância magnética nuclear (RMN);
4. A viabilidade dos biofilmes de *S. sanguis*, *A. naeslundii* e biofilme misto, avaliado por meio de UFC/mL;
5. A atividade metabólica dos biofilmes de *S. sanguis*, *A. naeslundii* e biofilme misto, avaliado por meio de ;
6. A formação de biomassa total dos biofilmes de *S. sanguis*, *A. naeslundii* e biofilme misto, avaliado por meio de cristal violeta.

4 MATERIAIS E METODOLOGIA

Os materiais e a metodologia utilizados para o desenvolvimento deste estudo foram descritos a seguir.

4.1 Materiais

- ✓ Água destilada;
- ✓ Água Mili Q;
- ✓ Acetona a 0,4 mM (Qhemis);
- ✓ Álcool Metílico Anidro (J T BAKER);
- ✓ Acriflavina neutra (Sigma);
- ✓ Alça de Drigalski estéril descartável (Biosystems);
- ✓ Alça descartável para inoculação de microrganismos (Redplast);
- ✓ Cloreto de sódio (Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda.);
- ✓ Cristal violeta (Merck KGaA);
- ✓ Cultura de *Actinomyces naeslundii* ATCC 51655 (ATCC);
- ✓ Cultura de *Streptococcus sanguis* IAL 1832 (Instituto Adolfo Lutz);
- ✓ Cubetas para espectrofotômetro (Biosystems);
- ✓ Dentes bovinos (Frigorifico Friburdogue - Bariri – SP);
- ✓ Envelopes para esterilização (amcor);
- ✓ Filtro com membrana 0,22 µm para seringa (TPP);
- ✓ Fluoreto de sódio (Vetec);
- ✓ Frasco coletor universal translúcido estéril 80 mL (Prolab);
- ✓ Fucsina básica (Sigma-Aldrich);
- ✓ Lixas d'água carbureto de silício nas granulações 400, 1200, 2500 e 4000 (Buehler);
- ✓ Meio de cultura Blood Agar Base (Oxoid Ltda.);
- ✓ Meio de cultura Mitis Salivarius Agar (Difco);
- ✓ Meio de Trypticase Soy Agar TSA (Acumedia);
- ✓ Meio Trypticase Soy Broth TSB (Acumedia);
- ✓ Menadiona (Sigma);
- ✓ Microtubos graduados (Eppendorff);

- ✓ Pedra Pomes em pó Herjos (Vigodent);
- ✓ Placa de cultura com 24 poços estéril (TPP);
- ✓ Placa de cultura com 96 poços estéril (TPP);
- ✓ Placas de Petri descartáveis (TPP);
- ✓ Ponteiras descartáveis para micropipeta (Axygen);
- ✓ Pipetas sorológicas descartáveis estéreis 25 mL (Biosystems);
- ✓ Sachês para geração de ambiente de CO₂ GASPAK EZ (BD);
- ✓ Sangue desfibrinado de carneiro (Silvio Bertinatto da Cunha - ME);
- ✓ Seringas descartáveis estéreis 10 mL (BD);
- ✓ Sistema de filtração a vácuo 250 mL com membrana 0,22 µm (TPP);
- ✓ Sódio cloreto P. A. A. C. S. (CAQ - Casa da química Ind. e Com. Ltda.);
- ✓ Solução de salina fosfatada tamponada - PBS;
- ✓ Telutito de Potássio (Sigma);
- ✓ Tubos Falcon de 50 mL (Corning);
- ✓ XTT (Sigma).

4.2 Instrumentos

- ✓ Béquer graduado 10 mL, 500 mL, 1 L (Vidrolabor);
- ✓ Cureta Mc Call - nº 13-14 (Golgran);
- ✓ Disco flexível diamantado dupla face (KG Sorensen);
- ✓ Disco Diamantado para eixos de 1/2" - diâmetro 76 mm (Buehler);
- ✓ Erlenmeyer graduado 2 L (Vidrolabor);
- ✓ Escova de cerdas pretas para torno de bancada;
- ✓ Jarra Anaeróbica Acrílica Gaz Pack EZ (BD);
- ✓ Limas endodônticas tipo Hedströen - nº 50 (Maillefer);
- ✓ Micropipetas Discovery 20-200 µL, 100-1000 µL, 5 mL, 10 mL (HTL);
- ✓ Pinça anatômica - 16 mm (Golgran);
- ✓ Pinça clínica (Golgran);
- ✓ Pipetador automático Swiftpet (HTL);
- ✓ Ponta maxicut para peça reta (Edenta);
- ✓ Provetas graduadas 50 mL, 250 mL, 1 L e 2 L (Satelit).

4.3 Equipamentos

- ✓ Agitador de tubos do tipo vórtex (Vision);
- ✓ Aparelho de cortes seriados Isomet 1.000 (Buehler);
- ✓ Autoclave vertical AV 60 (Phoenix);
- ✓ Peça reta de baixa rotação (Kavo);
- ✓ Balança de precisão BG 400 (Gehaka);
- ✓ Balança analítica AW220 (Shimadzu);
- ✓ Bomba a vácuo 089-CAL (Fanem);
- ✓ Banho maria (Nova Ética);
- ✓ Câmara de anaerobiose Whitley MG 500 (DW Scientific);
- ✓ Câmara de óxido de etileno (Ferlex);
- ✓ Centrífuga para microtubos (Fanem);
- ✓ Centrífuga para tubos 5810 R (Eppendorf);
- ✓ Contador de colônias - CP 600 Plus (Phoenix);
- ✓ Dessecador a vácuo 554 (Biosystems);
- ✓ Detector EDS Dry (Thermo Scientific NORAN SYSTEM 7);
- ✓ Espectrofotômetro SP-220 (Biospectro);
- ✓ Espectrofotômetro ELISA (Thermo Plate);
- ✓ Espectrômetro comercial XPS (UNI-SPECS UHV);
- ✓ Espectrômetro Micro Raman LabRAM - HR-800 (Jobin Yvon Horiba);
- ✓ Espectrômetro RMN Varian Unity (INOVA);
- ✓ Estufa bacteriológica TE-392/2 (Tecnal);
- ✓ Estufa bacteriológica de CO₂ (LaboVen);
- ✓ Estufa para secagem (Tecnal);
- ✓ Evaporador Sputter coater SCD050 (BAL-TEC);
- ✓ Freezer -80°C (Revco);
- ✓ Incubadora de bancada com agitação orbital TE 420 (Tecnal);
- ✓ Irradiador Cobalto 60 220N (Gammacell);
- ✓ Micro-ondas de dupla emissão de ondas - Sensor Crisp 38 (Brastemp);
- ✓ Microscópio eletrônico de varredura FEG JSM-7500F (Jeol);
- ✓ pHmetro portátil - PG-1400 (Gehaka);
- ✓ Politriz Metaserv (Buehler);

- ✓ Refrigerador (Bosh);
- ✓ Rugosímetro Mitutoyo SJ 400 (Mitutoyo Corporation);
- ✓ Sistema de purificação de água ultra pura (Mega Purity);
- ✓ Torno de bancada (Bethil);
- ✓ Ultrassom - Ultrasonic 1440 Plus (Odontobrás).

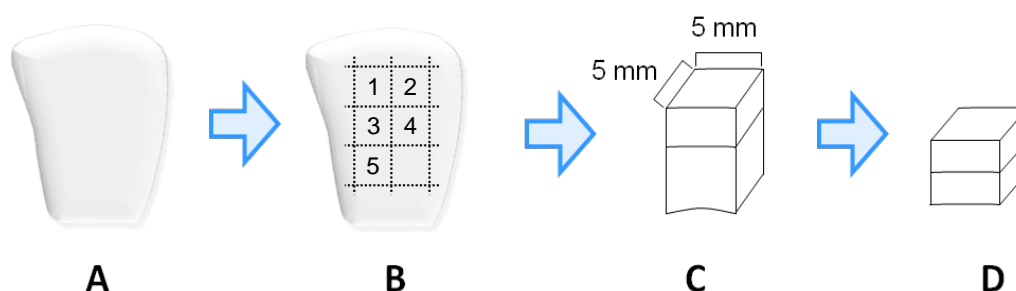
4.4 Fase 1: Caracterização morfológica, elementar e estrutural do esmalte dental submetido aos diferentes métodos de esterilização

Os procedimentos utilizados para a realização dos experimentos relacionados à Fase 1 foram descritos a seguir.

4.4.1 Preparo dos dentes

Foram selecionados 10 dentes incisivos bovinos, tendo como critério de escolha a qualidade aparente do esmalte, incluindo ausência de trincas e hipoplasias. Os dentes foram limpos com curetas do tipo Mc Call, o tecido pulpar foi removido com limas endodônticas do tipo Hedström e as raízes removidas com o auxílio de disco diamantado flexível montado em peça reta sob baixa rotação. Em seguida, as coroas passaram por um processo final de limpeza e polimento, em torno de bancada equipado com escova de cerdas pretas e mistura de pedra pomes e água. As coroas dentais foram, então, utilizadas para a obtenção de espécimes de esmalte, nas dimensões de 5 × 5 mm. Cada coroa dental foi submetida ao seccionamento em sua porção central com o auxílio de um aparelho de cortes seriados Isomet 1000, equipado com dois discos diamantados de 1/2", espaçados 5 mm um do outro, de maneira que seis fragmentos dentais medindo 5 mm × 5 mm de superfície de esmalte fossem obtidos. O tecido dentinário de cada espécime foi planificado por meio de polimento em politriz Metaserv, sob velocidade de 100 rpm, com a utilização de lixas de carbureto de silício na granulação 600. O procedimento de obtenção dos espécimes está ilustrado na Figura 1.

Figura 1 – Desenho esquemático ilustrando a obtenção dos espécimes utilizados na Fase 1: A Coroa dental. B Seccionamento. C Fragmentos dentais com dimensões de 5 × 5 mm de superfície de esmalte. D Espécimes de esmalte com dimensões de 5 × 5 mm de superfície de esmalte.



Os espécimes foram imersos em água destilada e submetidos a banho ultrassônico durante 15 min. Em seguida, foram imersos em frascos contendo água destilada (pH 7,0) e armazenados sob refrigeração a 5°C, até a sua utilização. A manipulação dos dentes bovinos foi realizada com o pesquisador devidamente paramentado, com jaleco, luvas, gorro, máscara e óculos de proteção, visando reduzir o risco de contaminação.

Para a realização desta fase do experimento, cinco espécimes de esmalte provenientes de cada coroa foram selecionados e distribuídos em cinco grupos, (n=10), de acordo com o delineamento experimental descrito na Figura 2.

4.4.2 Análise estrutural do esmalte por meio de espectroscopia Raman

A análise Raman foi realizada com o auxílio do espectrômetro Micro Raman (Figura 3). Foram utilizados 10 espécimes de esmalte em cada grupo e as avaliações foram realizadas em duas etapas: I – pré-esterilização (controle) e II – pós-esterilização. Os espécimes foram secos em temperatura ambiente, armazenados, individualmente, em microtubos e reservados. Previamente à realização das análises, o equipamento foi calibrado com um padrão de silício, com obtenção de um pico de referência em $520,8 \text{ cm}^{-1}$ ²⁵.

Figura 2 – Delineamento experimental da Fase 1: A Obtenção dos espécimes. B Distribuição dos espécimes nos Grupos. C Análise Raman pré-esterilização (grupo controle; n=10) e análise XPS pré-esterilização (grupo controle; n=4). D Processo de esterilização. E Análise Raman pós-esterilização (n=10) e análise XPS pós-esterilização (n=4). F Avaliação MEV superficial (n=10), EDS (n=10) e MEV em secção transversal (n=3) dos espécimes referentes aos grupos controle e experimentais (IM, IG, OE e AU). G Avaliação por meio de RMN (grupos IM, IG, OE e AU e controle; n=1).

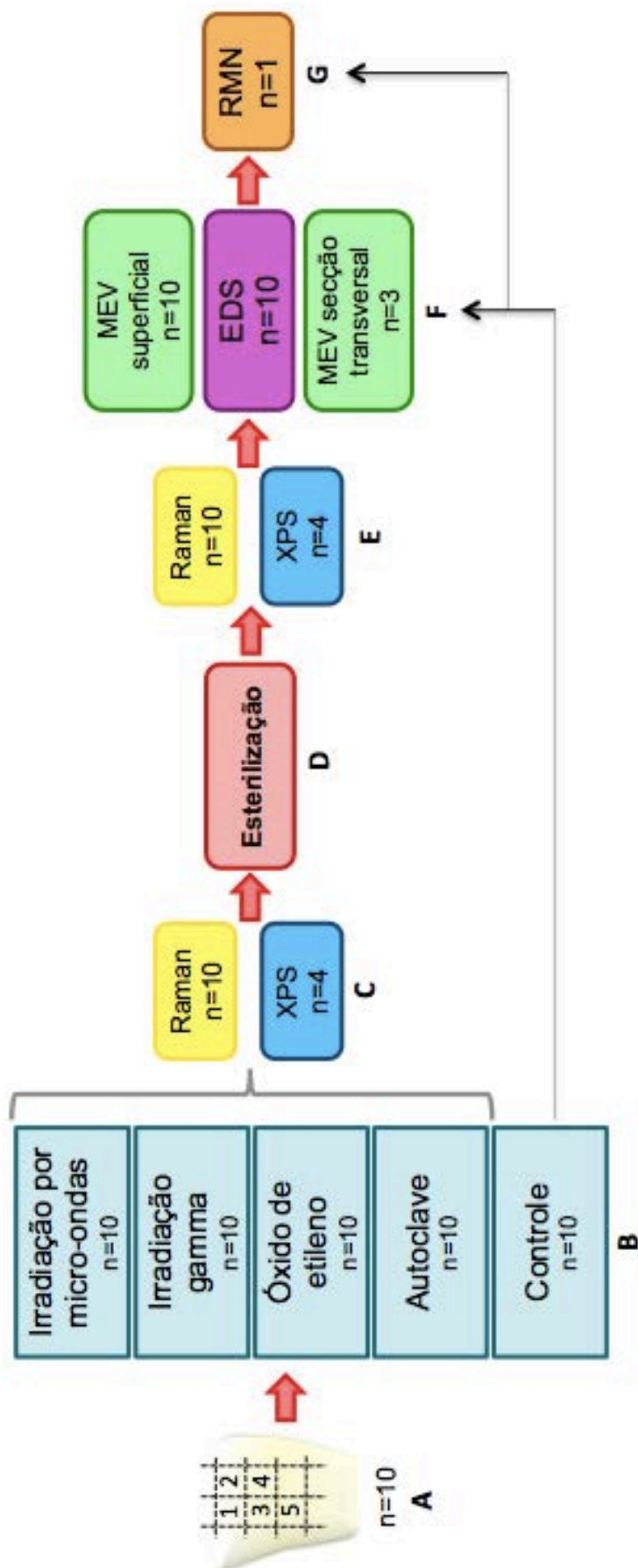


Figura 3 – Espectrômetro utilizado nas análises Raman.



No momento da análise Raman, os espécimes foram posicionados, individualmente, no espectrômetro Micro Raman, equipado com laser HeNe. A força de incidência utilizada foi de 50 mW, com diâmetro de 400 μm e aumento de 50 \times . Os espectros localizados entre 100 e 1300 cm^{-1} foram utilizados na avaliação dos componentes inorgânicos. A região central de cada espécime foi selecionada para a análise. Os espécimes foram submetidos à uma exposição de 50 s⁸, num total de três espectros. A média dos três espectros foi considerada para a análise dos dados

A análise Raman de compostos padrões para carbonato e fosfato também foi realizada. Dessa forma, os compostos carbonato de cálcio Ca_2CO_3 e fosfato de sódio dibásico Na_2HPO_4 foram selecionados para esta análise. Uma alíquota de pó de cada um destes componentes foi cuidadosamente compactada sobre uma lamina de vidro e submetida à avaliação Raman. Conforme os experimentos realizados nos espécimes de esmalte, o mesmo equipamento e parâmetros foram utilizados.

Os gráficos referentes aos espectros foram utilizados para a realização do cálculo das áreas dos picos correspondentes componentes identificados, por meio do programa ORIGIN 7.5. As áreas dos picos foram calculadas por meio de equações do tipo Lorentz e Gauss⁸, e os resultados foram expressos em $\text{au} \cdot \text{cm}^{-1}$. Para uma adequada comparação entre os espécimes, o cálculo das razões correspondentes a cada componente identificado / pico referência também foi realizado para cada espécime.

4.4.3 Análise da composição química elementar do esmalte por meio de espectroscopia fotoeletrônica por raios-X (XPS)

Para esta análise, quatro espécimes de esmalte foram utilizados em cada grupo e as avaliações foram realizadas em duas etapas: I – pré-esterilização (controle) e II – pós-esterilização. As análises XPS foram realizadas utilizando um espectrômetro XPS (Figura 4) operando a 250 W com radiação Mg K α (1253,6 eV).

A área analisada foi de 5 × 5 mm para cada espécime, tendo sido avaliados sob condições de ultra alto vácuo de 10⁻⁷ Pa. Foram obtidos espectros totais (energia de passagem de 45 eV) e espectros de alta resolução referentes a todos os elementos detectados, usando energia de passagem de 10 eV. A composição da camada superficial (<5 nm) foi determinada pelas proporções das áreas relativas de picos elásticos, corrigidas pelos fatores de sensibilidade dos elementos correspondentes. A análise estrutural (estados químicos do elemento) foi realizada por meio da deconvolução das intensidades espectrais utilizando uma função do tipo Voigtiana ⁷⁵. Para a análise XPS, a identificação dos estados químicos dos elementos foi realizada por meio da deconvolução dos picos observados nos espectros obtidos. Os elementos foram quantificados por meio das áreas dos picos dos espectros de alta resolução e os dados foram obtidos na forma de % concentração atômica (at.%).

Figura 4 – Espectrômetro utilizado nas análises XPS.



4.4.4 Esterilização dos espécimes de esmalte

Os espécimes referentes a cada um dos quatro grupos experimentais (n=10) foram esterilizados. Os espécimes do grupo IM foram colocados, individualmente, em béqueres contendo 200 mL de água destilada estéril. Em seguida, cada béquer foi posicionado no prato giratório do forno de micro-ondas convencional (Figura 5) e irradiado durante 3 min a 650 W, com 70% de potência ⁷⁹.

Figura 5 – Aparelho utilizado para a irradiação por micro-ondas .



Cada espécime do grupo IG foi posicionado dentro de um envelope próprio para a realização do procedimento de esterilização. Cada envelope foi identificado e enviado para esterilização por meio de irradiação gamma pelo Centro de Tecnologia das Radiações - CTR do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN, situado em São Paulo – SP. Os envelopes foram posicionados no irradiador (Figura 6).

Figura 6 – Irradiador utilizado para a esterilização por irradiação gamma.



O procedimento de esterilização foi realizado sob temperatura de 27°C e a fonte de energia utilizada foi Cobalto-60, na dose de 1,75 Gy/h, durante 16 h e 8 min, totalizando 25 kGy².

Os espécimes do grupo OE foram embalados individualmente em envelopes apropriados para a realização do procedimento de esterilização, identificados e enviados para a realização da esterilização por óxido de etileno pela empresa ACECIL Central de Esterilização Comércio e Indústria Ltda., situada em Campinas – SP. Os espécimes embalados foram submetidos ao processo de esterilização por óxido de etileno (Figura 7).

Figura 7 – Equipamento utilizado para esterilização por meio de óxido de etileno.



Fonte: <http://www.acecil.com.br/infraestrutura.htm>

A proporção dos gases utilizada foi de 30% EtO e 70 % CO₂, utilizando vácuo inicial de 400 a 450 mm/hg, com tempo de espera de 10 a 20 min, fase de carga de 10 a 20 min até que a pressão atingisse 0,5 kg/cm². O tempo de exposição foi de 3,5 h, sob temperatura de 45 a 55°C, durante 30 min e concentração de EtO de 600mg/L. Decorrido este período, os espécimes foram submetidos ao processo de purificação por meio de 3 lavagens com nitrogênio⁸⁴.

Os espécimes do grupo AU foram, individualmente, acondicionados em envelopes próprios para a realização do procedimento de esterilização, identificados e posicionados na autoclave (Figura 8). Os espécimes foram submetidos ao ciclo de

aquecimento até atingirem a temperatura de 121°C sob pressão de 15 lbs. As condições de temperatura e pressão foram mantidas durante os 30 min referentes ao processo de esterilização. Em seguida, a temperatura e a pressão foram gradualmente reduzidas até que a temperatura ambiente fosse atingida⁶⁵.

Os espécimes referentes ao grupo controle foram secos em temperatura ambiente, armazenados individualmente em microtubos e reservados até o momento de sua utilização. Após os procedimentos de esterilização dos espécimes, as análises Raman e XPS pós-esterilização foram realizadas, com a mesma metodologia descrita anteriormente.

Figura 8 – Autoclave utilizada no procedimento de esterilização.

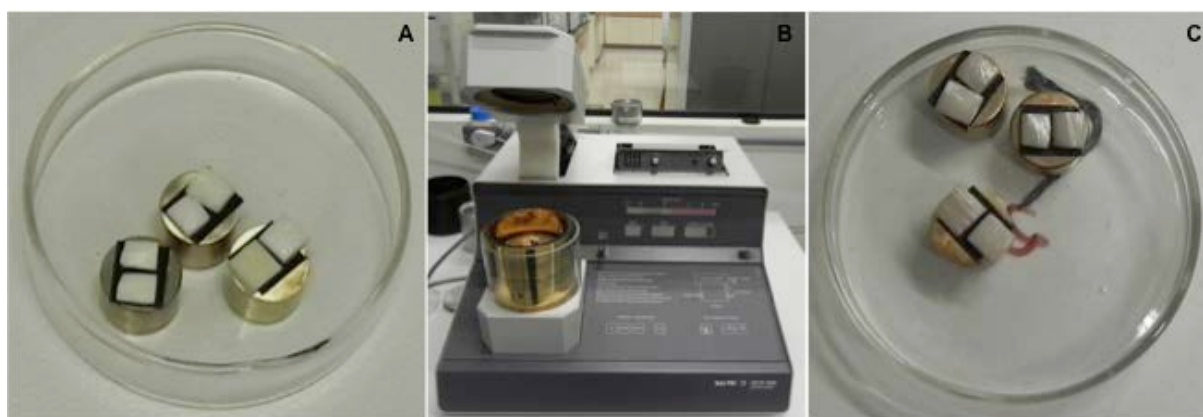


4.4.5 Análise morfológica da superfície do esmalte por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Após a esterilização e realização das análises Raman e XPS, todos os espécimes de cada grupo foram avaliados quanto a sua morfologia superficial por meio de MEV. Os espécimes foram fixados em suportes metálicos por meio de fita dupla face de carbono e, então, submetidos ao preparo para análise em MEV. Este processo consistiu na secagem dos espécimes em dessecador a vácuo durante 24 h sob temperatura de 25°C. Em seguida, os espécimes foram recobertos por uma camada de carbono com espessura de 10 nm por meio de um evaporador (Figura 9)

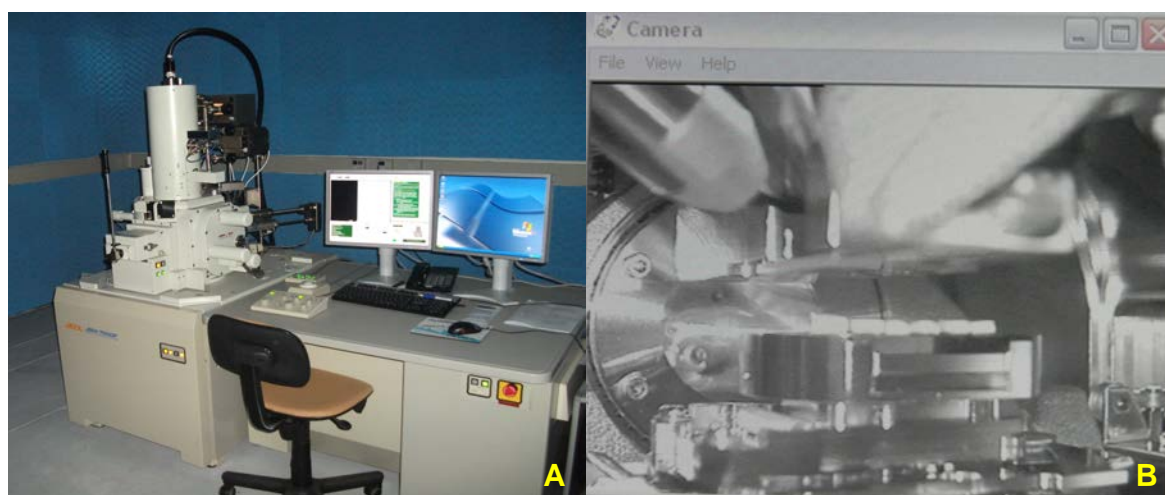
equipado com gás argônio. Os parâmetros utilizados foram tensão de corrente de 3 Kv, corrente de 15 μ A e tempo de exposição de 80 s.

Figura 9 – Preparo dos espécimes para a realização de MEV: A Espécimes fixados nos suportes metálicos. B Posicionamento dos suportes metálicos no aparelho evaporador. C Espécimes recobertos por Carbono.



O microscópio utilizado para as análises foi o MEV-FEG (Figura 10), sob vácuo de $9,6 \cdot 10^{-5}$ e aceleração de voltagem de 2 kV. Toda a superfície dos espécimes foi avaliada e as regiões representativas de cada amostra foram fotografadas nos aumentos de 1.000 \times , 5.000 \times , 10.000 \times , 20.000 \times , 50.000 \times e 100.000 \times , de maneira que, para cada espécime avaliado, duas imagens de regiões distintas fossem obtidas para cada um dos aumentos selecionados.

Figura 10 – A Microscópio utilizado nas análises MEV e EDS. B Posicionamento dos espécimes na câmara de vácuo do microscópio.



4.4.6 Análise elementar do esmalte por meio de energia dispersiva de raios-X (EDS)

Após a realização da obtenção das imagens por MEV na superfície, os espécimes foram utilizados para a avaliação EDS. O equipamento utilizado foi o detector EDS Thermo, modelo Dry, equipado com o programa NORAN SYSTEM 6, acoplado ao MEV FEG. Os parâmetros selecionados incluíram aumento de 200×, aceleração de voltagem de 12 kV e tempo de exposição de 3 min. Os espécimes 1 a 10 de cada um dos grupos avaliados foram submetidos a análise por EDS. Para cada espécime avaliado, espectros foram obtidos em duas regiões diferentes foram realizadas para cada espécime.

4.4.7 Análise morfológica da secção transversal do esmalte por meio de MEV

Três espécimes referentes a cada grupo experimental (IM, IG, OE e AU) e três espécimes referentes ao grupo controle, provenientes do mesmo dente, foram selecionados para a realização de MEV em secção transversal. Para a realização desta análise, os espécimes foram congelados em nitrogênio líquido e, em seguida, com auxílio de pinça anatômica, foram fraturados em secção transversal. Os espécimes foram, então, fixados nos suportes metálicos por meio de fita dupla face de carbono (elemento condutor), de maneira que a superfície fraturada ficasse voltada para o meio externo e, em seguida, foram submetidos ao procedimento para recobrimento com uma camada de carbono, conforme descrito anteriormente. Após o recobrimento, os espécimes foram analisados no microscópio MEV-FEG, sob vácuo de $9,6 \cdot 10^{-5}$ e aceleração de voltagem de 2 kV. Toda a região de fratura foi avaliada e imagens representativas de cada amostra foram obtidas nos aumentos de 30×, 500×, 2000× e 10.000×, de maneira que, para cada espécime avaliado, duas imagens de regiões distintas foram obtidas para cada um dos aumentos selecionados.

4.4.8 Análise estrutural do esmalte por meio de ressonância magnética nuclear (RMN)

Após a realização das análises MEV e EDS, três espécimes referentes a cada grupo experimental e três espécimes referentes ao grupo controle, provenientes do mesmo dente, foram selecionados para a realização da análise estrutural por meio de RMN. O tecido dentinário remanescente foi removido de cada espécime, por meio de ponta maxicut montada em peça reta, sob baixa rotação e irrigação com água destilada, de maneira que o espécime obtido apresentasse apenas esmalte dentário. Em seguida, para possibilitar a realização desta análise, com o auxílio de um almofariz e pistilo, cada espécime de esmalte foi triturado, transferido e compactado no suporte de espécimes do equipamento de RMN.

Figura 11 – Espectrômetro utilizado para a realização da análise de RMN.



Todas as medidas foram realizadas em temperatura ambiente no espectrômetro RMN de 500 MHz (11,7T) (Figura 11). As medidas de alta resolução MAS (rotação em torno do ângulo mágico) do ^{31}P foram realizadas em 202,09 MHz. Para a realização das medidas, foi utilizada uma sonda de 4 mm MAS, com rotação de 14 kHz. Os dados do ^{31}P foram coletados com um simples pulso de excitação

($\pi/2$) de 2,4 μ s e com tempo de relaxação de 90 s. Todas as amostras foram referenciadas a partir da solução de H₃PO₄ 85%.

4.5 Fase 2: Avaliação da influência dos diferentes métodos de esterilização sobre a formação do biofilme *in vitro*

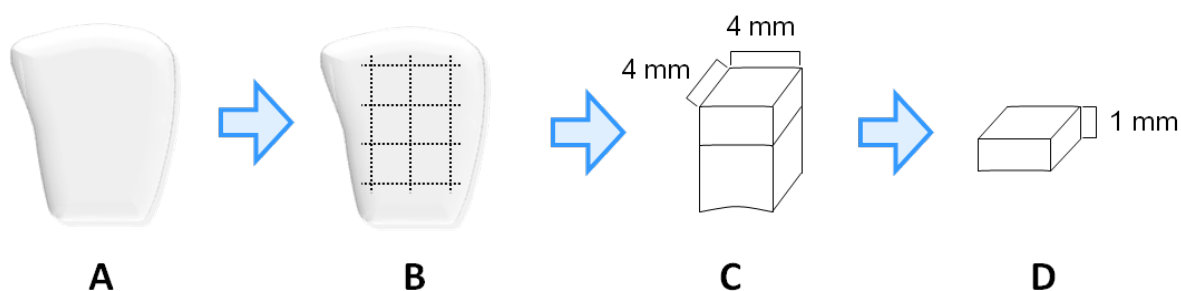
Os procedimentos utilizados para a realização dos experimentos relacionados à Fase 2 foram descritos a seguir.

4.5.1 Preparo dos espécimes de esmalte para a Fase 2

Foram selecionados 150 dentes incisivos bovinos, tendo como critério de escolha a qualidade aparente do esmalte, incluindo ausência de trincas e hipoplasias. Os dentes foram limpos com curetas do tipo Mc Call, o tecido pulpar foi removido com limas endodônticas do tipo Hedström e as raízes removidas com o auxílio de disco diamantado flexível montado em peça reta sob baixa rotação. Em seguida, as coroas passaram por um processo final de limpeza e polimento, em torno de bancada equipado com escova de cerdas pretas e mistura de pedra pomes e água.

As coroas de dente bovino previamente preparadas foram utilizadas para a obtenção de 360 espécimes de esmalte bovino, nas dimensões de 4 × 4 × 1 mm (Figura 12A-D).

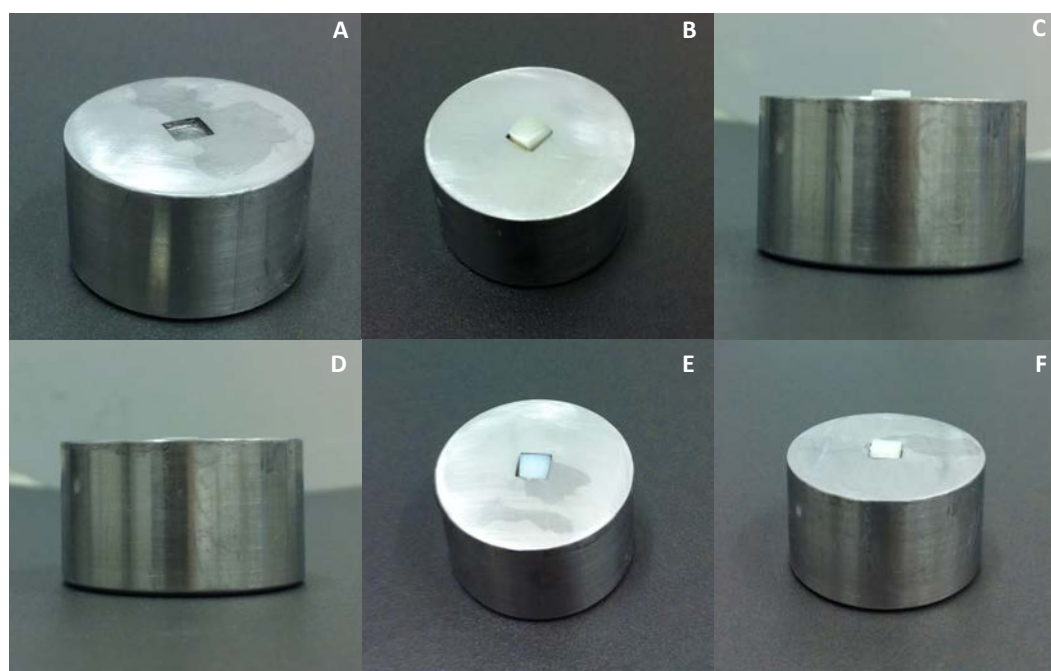
Figura 12 – Desenho esquemático ilustrando a obtenção dos espécimes utilizados na Fase 2: A Coroa dental. B Seccionamento. C Fragmentos dentais com dimensões de 4 × 4 mm. D Espécime de esmalte obtido ao final da sequência de polimento.



A obtenção destes espécimes foi realizada com o auxílio do aparelho de cortes seriados Isomet 1000, equipado com dois discos diamantados, espaçados 4 mm um do outro. Cada coroa dental foi submetida ao seccionamento em sua porção central para a obtenção de seis fragmentos dentais medindo 4 mm de altura por 4 mm de largura. A face vestibular foi planificada e o tecido dentinário de cada espécime foi removido por meio de polimento em politriz com a utilização de lixas de granulação 600 sob velocidade de 100 rpm.

A padronização da espessura em 1 mm foi realizada com o auxílio de uma matriz metálica desenvolvida especialmente para este estudo (Figura 13A).

Figura 13 – A Matriz metálica. B Posicionamento do fragmento de esmalte na matriz. C Aspecto do espécime após polimento inicial. D,E,F Aspecto do espécime após a finalização da sequência de polimento.



Os espécimes foram posicionados, individualmente, no nicho existente na matriz (Figura 13B), com dimensões de 4 mm de altura \times 4 mm de largura \times 1 mm de espessura e, com o auxílio da politriz sob velocidade de 100 rpm, foram submetidos aos procedimentos de polimento com lixas de carbureto de silício de granulação 600 e 1200 até que os espécimes de esmalte apresentassem espessura próxima ao nível da matriz, ou seja, \sim 1 mm (Figura 13C). Ainda utilizando a politriz sob velocidade de 100 rpm, os espécimes de esmalte foram polidos com lixas de granulação 2500 durante 30 s e lixa de granulação 4000 durante 1 minuto. Após a

finalização do processo de polimento (Figuras 13 D-F), os espécimes foram imersos em água destilada e submetidos à lavagem em ultrassom durante 15 min e, posteriormente, armazenados em água destilada (pH 7,0) sob refrigeração de 5°C, até a sua utilização.

4.5.2 Aferição da rugosidade superficial

A aferição da rugosidade superficial dos espécimes de esmalte foi realizada com o objetivo de distribuir os espécimes de maneira homogênea entre os grupos, de acordo com os valores médios de rugosidade superficial, obtidos previamente à realização dos procedimentos de esterilização. Para a realização das medidas, foi utilizado um rugosímetro (Figura 14), com precisão de leitura de 0,01 μm , comprimento de leitura de 2,4 mm, velocidade da ponta ativa de 0,5 mm/s e raio da ponta ativa de 5 μm ⁴¹.

Figura 14 – A - Rugosímetro utilizado para as medidas de rugosidade.

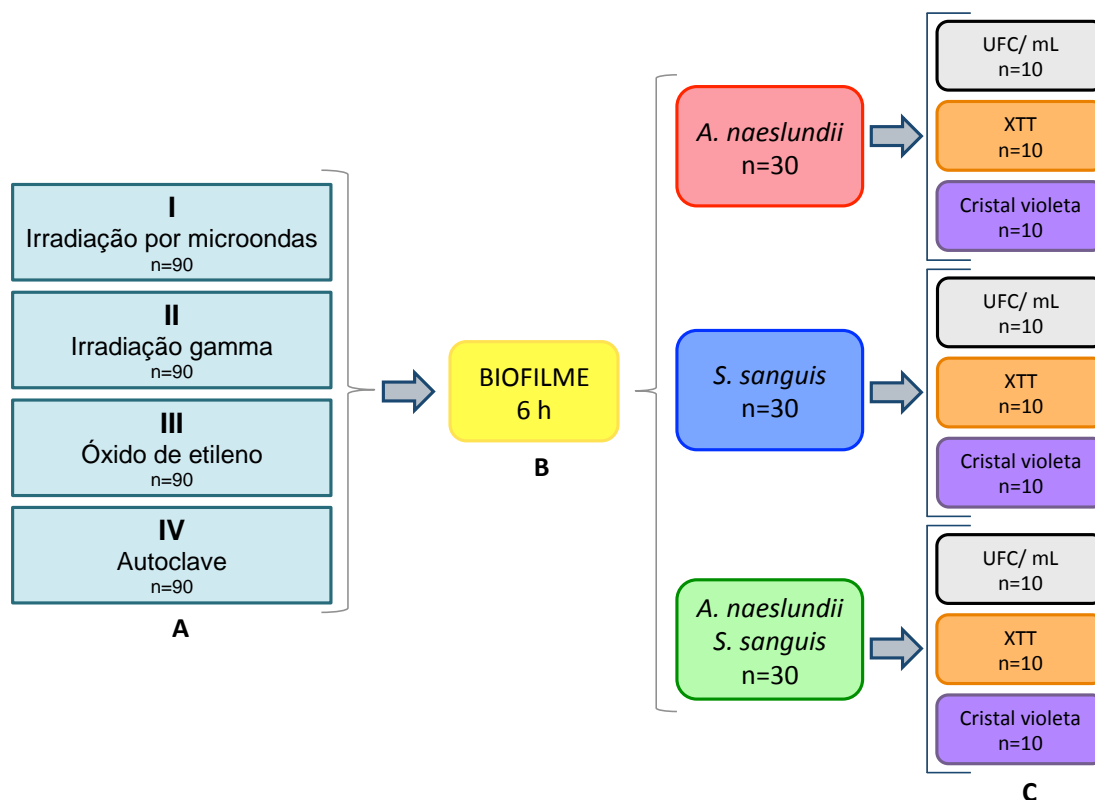


O equipamento foi calibrado previamente à realização das medidas. Os espécimes foram secos à temperatura ambiente, posicionados no suporte de

espécimes do equipamento e, em seguida, cada face do espécime (vestibular e lingual) foi submetida a duas leituras de rugosidade perpendiculares entes si. A médias destes valores (dois para a face vestibular e dois para a face lingual) foi considerada como valor final da rugosidade de cada espécime R_a (μm). Todas as leituras foram realizadas pelo mesmo operador.

No momento da aferição da rugosidade, os espécimes de esmalte que apresentaram valor final de rugosidade entre 0,05 e 0,08 μm foram selecionados. Os espécimes foram distribuídos nos respectivos grupos por meio de estratificação, onde, as médias dos valores de rugosidade final obtidas para cada grupo foram equivalentes, com valores de 0,075 μm . Em seguida, os espécimes foram esterilizados por meio do respectivo método, conforme descrição ilustrada na Figura 15.

Figura 15 – Delineamento experimental da Fase 2: A - Distribuição dos grupos experimentais. B - Formação do biofilme inicial: monoespécie e misto. C - Avaliações: UFC/mL, Ensaio de XTT e Cristal violeta.



4.5.3 Reativação dos microrganismos

Para a realização deste estudo, as cepas selecionadas foram *A. naeslundii* (ATCC 51655) e *S. sanguis* (IAL 1832). Os biofilmes formados sobre os espécimes de esmalte foram do tipo monoespécie (*S. sanguis* ou *A. naeslundii*) e misto (*S. sanguis* + *A. naeslundii*). O microrganismo *S. sanguis* foi adquirido junto ao banco de cepas do Instituto Adolfo Lutz, situado em São Paulo - SP. O microrganismo *A. naeslundii* foi cedido gentilmente pela Profa. Dra. Altair Antoninha Del Bel Cury da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, UNICAMP.

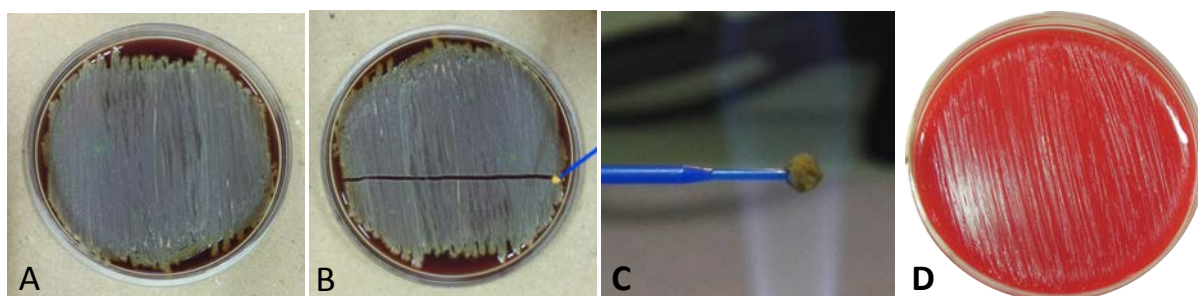
A cultura referente ao microrganismo *S. sanguis* encontrava-se liofilizada. A ampola contendo o microrganismo foi aberta, 1 mL de meio BHI foi adicionado e a solução foi homogeneizada com auxílio de uma micropipeta. Em seguida, uma alíquota de 100 µL foi aspirada e adicionada a um tubo falcon contendo 10 mL de meio BHI. O tubo contendo o meio de cultura e o microrganismo foi homogeneizado em agitador do tipo vórtex por um minuto e, em seguida, incubado a 37°C durante 24 h em estufa com 5% CO₂.

Decorrido o período de incubação, o tubo contendo a cultura de *S. sanguis* foi homogeneizado em agitador do tipo vórtex e uma alíquota de 100 µL foi removida e, em seguida, adicionada sobre uma placa de petri contendo o meio ágar sangue. Com auxílio de uma alça de Drigalski, a alíquota foi distribuída sobre toda extensão do meio de cultura e, em seguida, a placa foi incubada por 48 h nas mesmas condições descritas anteriormente. Após o período de incubação, a placa contendo o microrganismo foi utilizada para o procedimento de cultivo em nova placa contendo o meio ágar sangue.

Para isso, uma alça de inoculação com extremidade do tipo circular, referente a 1 µL, foi deslizada sobre a cultura do microrganismo semeado na placa de petri, por meio de movimentos suaves no sentido horizontal, promovendo a remoção de parte das colônias. Esta alíquota, referente a aproximadamente 1 µL, foi adicionada sobre uma placa de petri contendo o meio de cultura ágar sangue. Em seguida, com o auxílio da mesma alça, a alíquota foi cuidadosamente espalhada por toda a extensão do meio de cultura (Figura 16). A placa foi, então, incubada por 48 h a 37°C em estufa com 5% CO₂.

A cultura referente ao microrganismo *A. naeslundii* estava armazenada em meio skin milk. O microtubo contendo a cultura em meio skin milk foi removido das condições de refrigeração -80°C e reservado até atingir a temperatura ambiente. Em seguida, os mesmos procedimentos realizados para o microrganismo *S. sanguis* foram realizados para o *A. naeslundii*, conforme descrito anteriormente.

Figura 16 – Procedimento de cultivo do microrganismo em nova placa de cultura. A – Placa de cultivo obtida após 48 h de incubação. B – Obtenção da alíquota de 1 µL. C – Alíquota de 1 µL utilizada para cultivo em nova placa. Placa contendo o meio ágar sangue após o espalhamento da alíquota do microrganismo.



Decorrido o período de incubação, as placas referentes as culturas de *S. sanguis* e *A. naeslundii* foram utilizadas para o preparo de culturas de estoque destinadas ao armazenamento sob refrigeração de -80°C no banco de cepas do Laboratório de Microbiologia Aplicada da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP.

Para o preparo das culturas de estoque, uma alíquota de aproximadamente 1 µL foi obtida para cada microrganismo por meio de uma alça de inoculação com extremidade circular de 1 µL, conforme descrito anteriormente. A alíquota referente a cada microrganismo foi, individualmente, acrescentada a um tubo contendo 10 mL de meio BHI. Os tubos contendo os meios de cultura e as alíquotas referentes a cada microrganismo foram homogeneizados em agitador orbital do tipo vórtex por 1 minuto. Os tubos foram, posicionados em uma jarra de anaerobiose e um sachê gerador de ambiente com 5% de CO₂ foi acrescentado a jarra, que foi fechada e, em seguida, incubada sob agitação orbital de 75 rpm a 37°C durante 24 h.

Após o período de incubação, as culturas referentes a cada microrganismo foram submetidas ao procedimento de lavagem de células. Para isso,

os tubos contendo as culturas foram homogeneizados em agitador do tipo vórtex por 15 s e centrifugados a 4.000 rpm durante 5 min. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e 10 mL de PBS foram adicionados a cada tubo. Os tubos contendo os microrganismos foram homogeneizados em agitador do tipo vórtex e novamente centrifugados a 4.000 rpm durante 5 min.

Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e 10 mL do meio skin milk foram adicionado ao tubo correspondente ao *A. naeslundii*, enquanto 10 mL de BHI foram adicionado ao tubo correspondente ao *S. sanguis*. Os tubos contendo os microrganismos e os respectivos meios de cultura foram homogeneizados em agitador do tipo vórtex durante 1 minuto e alíquotas de 500 µL foram adicionadas a microtubos devidamente identificados. Finalmente, alíquotas de 200 µL de glicerol foram adicionados a cada cultura presente nos microtubos, que por sua vez, foram homogeneizados em agitador do tipo vórtex durante 1 min. Os tubos foram, então, ordenadamente posicionados em uma caixa de específica para microtubos que foi, em seguida, armazenada no freezer -80°C.

Considerando que durante a realização de experimentos envolvendo cultivo de biofilmes mistos, as condições de incubação devem ser favoráveis ao desenvolvimento de ambos microrganismos, foi realizada a avaliação das condições ideais de incubação para o desenvolvimento do *A. naeslundii* e do *S. sanguis*. Dessa maneira, as condições de incubação em estufa com 5% CO₂ e em câmara de anaerobiose com 85% N₂, 10% H₂ e 5% CO₂ foram avaliadas.

Para possibilitar esta avaliação, foi realizada a reativação dos microrganismos provenientes das culturas de estoque previamente congeladas a -80°C. As culturas de estoque referentes ao *A. naeslundii* e ao *S. sanguis* foram removidas das condições de refrigeração e reservadas até atingirem temperatura ambiente. Em seguida, os microtubos contendo as culturas de estoque foram homogeneizados em agitador do tipo vórtex durante 1 min e uma alíquota de 100 µL de cada cultura foi, individualmente, adicionada a placas contendo o meio ágar sangue. Com auxílio de uma alça de inoculação, cada alíquota foi distribuída sobre toda extensão do meio de cultura, tendo sido este procedimento realizado em duplicata. As placas correspondentes a cada microrganismo foram incubadas por 48 h a 37°C em estufa com 5% CO₂ e em câmara de anaerobiose.

Visando reestabelecer o metabolismo dos microrganismos, ao final do período de incubação, realizou-se o cultivo em novas placas contendo o meio ágar

sangue. Foi utilizada uma alça de inoculação com extremidade do tipo circular, referente a 1 μL , que foi deslizada sobre a cultura previamente incubada, por meio de movimentos suaves no sentido horizontal, de maneira que parte das colônias fosse removida. Esta alíquota, referente a aproximadamente 1 μL , foi adicionada sobre uma nova placa contendo o meio de cultura ágar sangue.

Em seguida, com o auxílio da mesma alça, a alíquota foi cuidadosamente espalhada por toda a extensão do meio de cultura. As novas placas correspondentes às culturas previamente incubadas em estufa com 5% de CO_2 foram novamente incubadas nas mesmas condições por 48 h. O mesmo procedimento foi realizado para as placas correspondentes as culturas previamente incubadas em câmara de anaerobiose.

Decorrido o período de incubação, uma avaliação visual foi realizada nas placas provenientes das duas condições de incubação, com o objetivo de identificar possíveis diferenças com relação ao crescimento dos microrganismos. Por meio desta avaliação visual, foi possível constatar que não haviam diferenças em relação ao crescimento do microrganismo *A. naeslundii*, cujas placas apresentaram colônias semelhantes em quantidade e tamanho. No entanto, o crescimento do microrganismo *S. sanguis* foi expressivamente menor nas condições proporcionadas pela câmara de anaerobiose, apresentando colônias menores e em menor desenvolvimento na placa quando comparadas àquelas placas incubadas em estufa com 5% CO_2 . Dessa forma, a incubação em estufa com 5% de CO_2 foi selecionada como condição de incubação em todos os experimentos envolvendo o cultivo de biofilmes.

4.5.4 Curva de crescimento dos microrganismos

Com o objetivo de estabelecer o tempo ideal de incubação overnight de cada microrganismo no momento da obtenção do inóculo para formação do biofilme, foi realizado um experimento para a obtenção da curva de crescimento de cada microrganismo.

Para a realização deste experimento, foram utilizadas as placas contendo as culturas dos microrganismos *A. naeslundii* e *S. sanguis* previamente utilizadas na avaliação da condição de incubação, descrita anteriormente. As placas

contendo as culturas correspondentes a cada microrganismo, previamente incubadas por 48 h a 37°C em estufa com 5% CO₂, foram utilizadas para a obtenção de uma alíquota correspondente a aproximadamente 1 µL, obtida por meio de alça de inoculação, conforme descrito anteriormente. Estas alíquotas foram, individual e delicadamente, distribuídas sobre o meio de cultura, ocupando toda a extensão da placa. As placas correspondentes a cada um dos microrganismos foram incubadas por 48 h a 37°C em estufa com 5% CO₂.

Após o período de incubação, as placas contendo as culturas foram utilizadas para a obtenção de alíquotas de aproximadamente 4 µL referentes a cada microrganismo. Para isso foi utilizada uma alça de inoculação com extremidade circular correspondente a 1 µL. A alça foi posicionada na porção referente ao maior diâmetro da placa e, em seguida, suavemente deslizada sobre a cultura do microrganismo, em linha reta, de maneira que atingisse de extremidade a outra da placa. Esta alíquota, correspondente a aproximadamente 1 µL, foi adicionada a um tubo falcon contendo 40 mL de meio TSB.

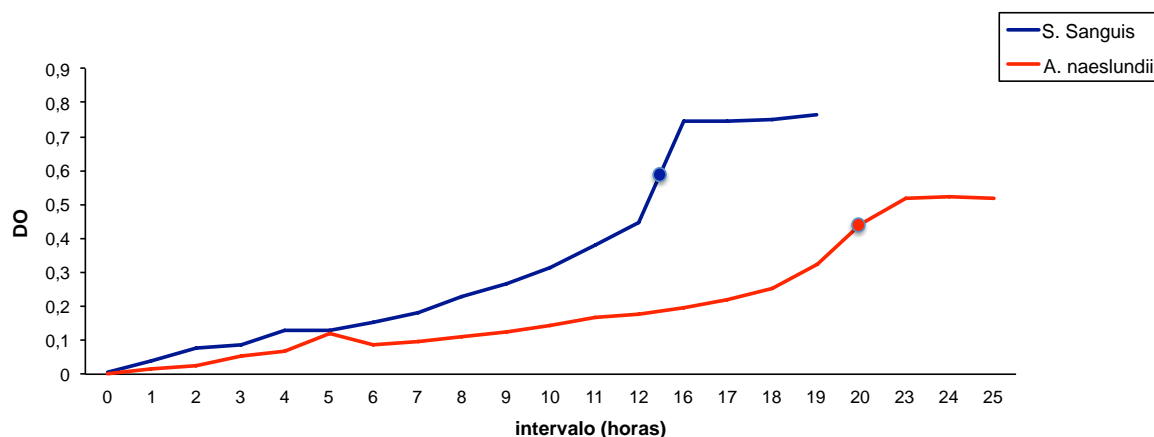
Esta sequência foi realizada quatro vezes, de maneira que, ao final, fosse obtido um tubo com 40 mL de meio TSB e 4 µL da cultura correspondente ao microrganismo. O procedimento foi realizado em triplicata, para os dois microrganismos. Os tubos contendo as alíquotas correspondentes às culturas dos microrganismos em meio TSB foram homogeneizados em agitador do tipo vórtex durante 1 min e incubados por 48 h, a 37°C em estufa com 5% CO₂.

Decorrido o período de incubação, os tubos contendo as culturas referentes aos microrganismos avaliados foram homogeneizados em agitador do tipo vórtex durante 1 minuto e, em seguida, 2 mL referentes a cada uma das cultura foram adicionados a novos tubos contendo 30 mL de meio TSB. Neste momento, o meio de cultura contendo cada microrganismo foi homogeneizado em agitador do tipo vórtex durante 1 min e uma alíquota de 3 mL foi acrescentada a uma cubeta e utilizada para leitura da densidade ótica (DO) em espectrofotômetro com filtro de 600 nm (tempo 0). Os tubos contendo as culturas foram incubados nas mesmas condições descritas anteriormente e novas leituras de DO foram realizadas em espectrofotômetro com filtro de 600 nm, aproximadamente a cada hora decorrida do tempo de incubação. Os valores de DO foram observados até que a multiplicação dos microrganismos não apresentasse mais aumento nos valores de DO (platô).

A importância deste experimento consistiu na determinação do tempo ideal de incubação dos microrganismos no momento da obtenção do inóculo. O tempo selecionado correspondeu ao momento que precede o platô, no qual a multiplicação celular encontra-se extremamente ativa, caracterizando a fase de crescimento exponencial.

Os dados obtidos por este experimento indicaram que o período de incubação ideal para o *S. sanguis* foi de 14 h e para o *A. naeslundii* foi de 20 h (Figura 17).

Figura 17 – Curva de crescimento obtida para os microrganismos *S. sanguis* e *A. naeslundii*.



Após a determinação das condições e do tempo de incubação, foi realizado um experimento para estimar o número de microrganismos viáveis presentes nos inóculos de *S. sanguis* e *A. naeslundii*. As culturas dos microrganismos semeadas em placas com o meio ágar sangue, previamente incubadas por 48 h a 37°C em estufa com 5% de CO₂, foram utilizadas para a obtenção de novas culturas em placas ágar sangue, por meio de alíquotas de 1 µL, conforme descrito acima.

Após o período de incubação, alíquotas de aproximadamente 4 µL, referentes ao cultivo de cada um dos microrganismos, foram obtidas e adicionadas, conforme descrito anteriormente, a um tubo falcon contendo 40 mL de meio TSB. Os tubos contendo as alíquotas dos microrganismos e o meio TSB foram homogeneizados em agitador do tipo vórtex durante 1 min e incubados por 48 h a 37°C em estufa com 5% CO₂.

Decorrido o período de incubação, cada cultura proveniente dos microrganismos foi homogeneizada em agitador do tipo vórtex durante 1 minuto. Alíquotas de 2 mL referentes a cada cultura foram obtidas e adicionadas a novos tubos contendo 30 mL de meio TSB, que por sua vez, foram homogeneizados em agitador do tipo vórtex durante 1 min. O tubo correspondente à cultura do microrganismo *A. naeslundii* foi incubado por 20 h a 37°C em estufa com CO₂ 5% e o tubo correspondente à cultura do *S. sanguis* foi incubado, nas mesmas condições, durante 14 h.

Decorrido o período de incubação, as culturas em TSB foram homogeneizadas em agitador do tipo vórtex durante 1 minuto e centrifugadas por 5 min a 4.000 rpm. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e 10 mL de PBS estéril foi adicionada ao tubo contendo o pellet referente a cada microrganismo. Os tubos foram homogeneizados em agitador do tipo vórtex durante 1 min e novamente centrifugados por 5 min a 4.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e 10 mL de PBS estéril foram adicionados, homogeneizados em agitador do tipo vórtex durante 1 minuto e um novo ciclo de centrifugação foi realizado por 5 min a 4.000 rpm.

Em seguida, 30 mL de TSB foram adicionados a cada pellet, homogeneizados em agitador do tipo vórtex durante 1 min e, em seguida, uma alíquota de 3 mL foi adicionada a uma cubeta, realizando, em seguida, a leitura de DO em espectrofotômetro com filtro de 600 nm. As leituras de DO a 600 nm corresponderam a 1,5 para o *S. sanguis* e 2,0 para o *A. naeslundii*. Posteriormente, os tubos contendo as culturas foram novamente homogeneizados em agitador do tipo vórtex durante 1 min e uma alíquota de 100 µL foi obtida desta cultura e acrescentada a um microtubo contendo 900 µL de PBS estéril (diluição 10⁻¹). Este microtubo foi homogeneizado em agitador do tipo vórtex durante 1 min e 100 µL da solução resultante foram obtidos e acrescentados a um novo microtubo contendo 900 µL de PBS estéril (diluição 10⁻²). Este procedimento foi repetido outras duas vezes, para a obtenção das diluições 10⁻³ e 10⁻⁴.

Após a realização das diluições seriadas, os microtubos referentes as diluições 10⁻⁴ a 10⁻¹ foram homogeneizados em agitador do tipo vórtex durante 1 minuto e utilizados para a obtenção de alíquotas de 25 µL provenientes de cada microtubo. Uma placa contendo o meio ágar sangue, devidamente delimitada em quadrantes, foi utilizada para o plaqueamento, de maneira que as alíquotas

correspondentes a cada diluição foram posicionadas sobre cada um dos quadrantes. Com auxílio de uma alça de inoculação, as alíquotas foram delicadamente distribuídas em seus quadrantes e, em seguida, a placa foi incubada em estufa com CO₂ 5% a 37°C por 48 h. Os plaqueamentos foram realizados em duplicata.

Após o período de incubação, foi realizada a contagem de colônias. As placas foram posicionadas no contador de colônias e a quantificação foi realizada visualmente, contabilizando o número de colônias presentes em cada quadrante. Para o cálculo das UFC/mL, somente os valores entre 30 e 300 colônias foram considerados, tendo sido escolhido o número de colônias referente à diluição selecionada como representativa do desenvolvimento dos microrganismos. Após a obtenção desse valor em cada duplicata, o número de UFC/mL foi calculado. Para esse cálculo, foi utilizada a fórmula a seguir:

$$\text{UFC/mL} = \frac{\text{Número de colônias} \times 10^n}{q}$$

Onde: n = valor absoluto da diluição (1, 2, 3, ou 4); q = quantidade (mL) pipetada. A média aritmética dos valores de UFC/mL obtidos a partir das duplicatas foram tabulados e transformados em Log₁₀.

O experimento foi realizado 3 vezes e a média dos resultados obtidos por estes experimentos foi considerada como valor final de UFC/mL dos inóculos.

4.5.5 Coleta e preparação da saliva

A saliva selecionada para a realização dos experimentos de biofilme foi a saliva total humana e não estimulada. Foi solicitada avaliação do protocolo de pesquisa pelo CONEP, que emitiu o certificado de autorização nº 64896 em 30/07/2012 (Anexo A).

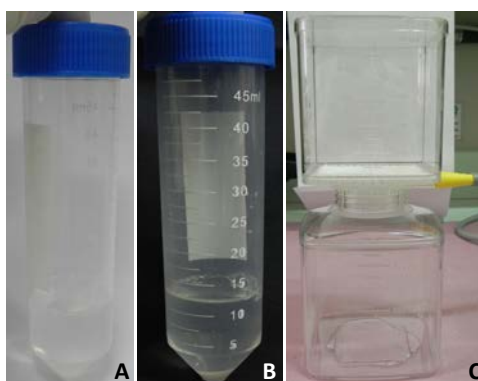
O doador selecionado, gênero feminino, 32 anos, estava ciente das condições da pesquisa, apresentava-se saudável e não fez uso de antibióticos durante a realização dos experimentos e nos 6 meses que precederam a realização da pesquisa. Dessa maneira, saliva não estimulada foi coletada de um único doador,

às 6:00 h, no dia da realização de cada experimento envolvendo a formação de biofilme.

Com o auxílio de um tubo falcon estéril posicionado em um frasco com gelo, o doador coletou a saliva pela manhã, em jejum e antes de escovar os dentes por um período de 30 min. A alíquota de saliva foi centrifugada por 30 min a 10.000 rpm sob temperatura de 4°C. Decorrida a centrifugação, a saliva foi filtrada em membrana de 0,22 µm e utilizada imediatamente ⁸⁰ (Figura 18). Duas alíquota de 100 µL referentes à saliva filtrada foram plaqueadas em meio ágar sangue e incubadas em condições de aerobiose e anaerobiose a 37°C durante 48 h para verificar a ausência de contaminação.

Uma alíquota de saliva filtrada foi utilizada para aferição do pH por meio de um pHmetro portátil, cujos valores obtidos variaram de 6,9 a 7,0 em todos os experimentos realizados.

Figura 18 – A – Alíquota de saliva obtida pelo doador. B – Alíquota de saliva após centrifugação. C – Filtragem do sobrenadante da saliva.



4.5.6 Formação do biofilme *in vitro*

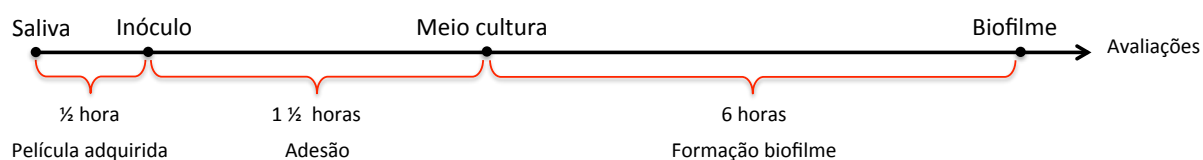
Conforme delineamento experimental descrito na Figura 15, as culturas de biofilme *in vitro* foram realizadas para os 4 grupos experimentais, de maneira que, em cada grupo experimental, foram realizadas culturas monoespécie de *A. naeslundii* (n=30) e de *S. sanguis* (n=30) e, ainda, cultura mista dos dois microrganismos (n=30). Os inóculos padronizados referentes a cada microrganismo foram obtidos conforme descrito no item anterior.

Utilizando uma pinça estéril, cada espécime de esmalte esterilizado foi, individualmente, inserido em um dos 24 poços da placa de cultura e, em seguida, com auxílio de micropipeta, 300 μL de saliva fresca filtrada foram acrescentados a cada poço. As placas foram, então, incubadas em agitador orbital a 75 rpm (37°C) durante 30 min para formação da película adquirida de saliva ³⁶.

Após 30 min, com o auxílio de uma micropipeta, a saliva foi aspirada de cada poço e descartada, em seguida, 500 μL do inóculo padronizado referente a cada microrganismo foi dispensado, cuidadosamente, sobre cada espécimes de esmalte. Para o caso das culturas monoespécie, inóculos contendo *A. naeslundii* ou *S. sanguis* foram dispensados. No caso das culturas mistas, 500 μL referentes ao inóculo de cada microrganismo foram, cuidadosamente, dispensados sobre cada espécime. As placas foram posicionadas em jarras de anaerobiose e um sache gerador de ambiente com 5% de CO_2 foi acrescentado a jarra, que foi fechada e, em seguida, incubada sob agitação orbital de 75 rpm a 37°C durante 90 min, tempo este correspondente à fase de adesão dos microrganismos à superfície do espécime ⁹⁰.

Decorrida a fase de adesão dos microrganismos, com o auxílio de uma micropipeta, o inóculo foi aspirado de cada poço e descartado e, em seguida, os espécimes foram submetidos, cuidadosamente, a duas lavagens com 500 μL solução PBS estéril para a remoção de microrganismos não-aderidos ou fracamente aderidos ⁹⁰. Finalmente, alíquotas de 500 μL do meio de cultura TSB foram, então, adicionadas cuidadosamente sobre cada espécime e as placas foram novamente incubadas, nas mesmas condições descritas anteriormente, durante 6 h, para promover a fase de formação inicial do biofilme ¹² (Figura 19).

Figura 19 – Esquema ilustrando a sequência realizada para cultivo dos biofilmes.

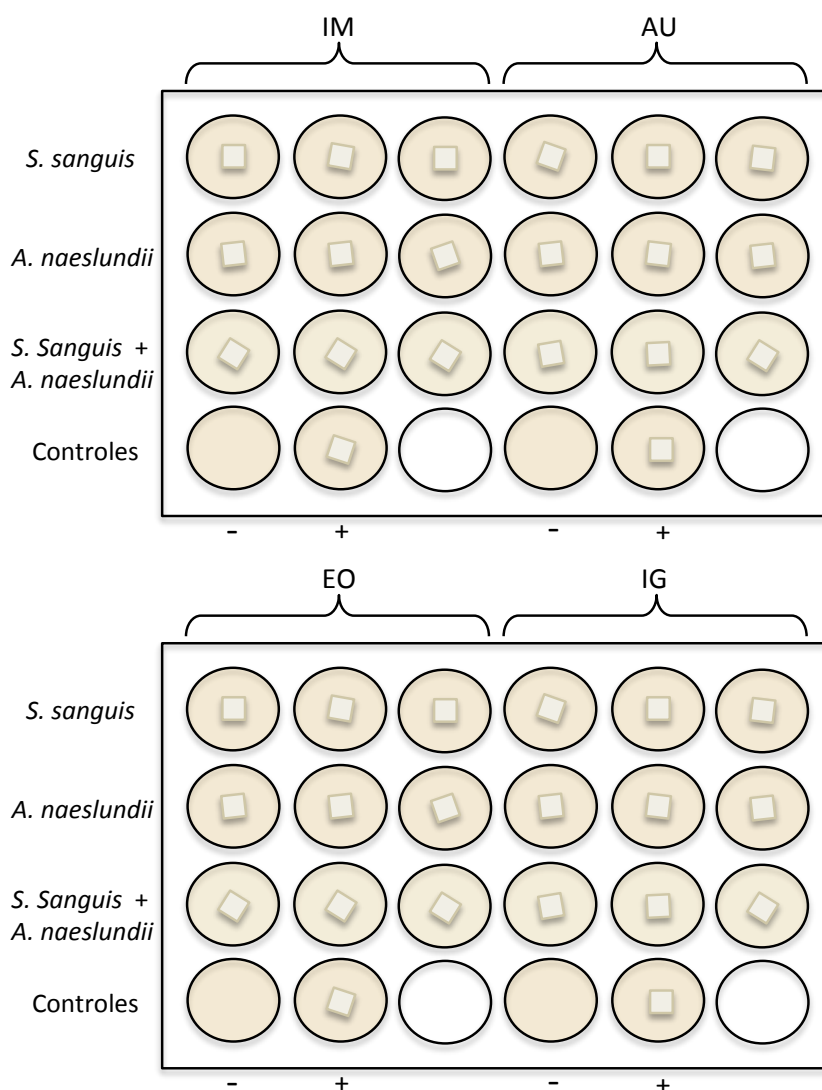


Decorrido o período de incubação, com o auxílio de uma micropipeta, o meio de cultura foi aspirado de cada poço e descartado e, em seguida, os espécimes foram submetidos, cuidadosamente a duas lavagens com 500 μL de PBS estéril para remoção dos microrganismos fracamente aderidos ⁹⁰. Os espécimes

referentes a cada tipo de biofilme foram utilizados para a realização das avaliações conforme descrito a seguir (Figura 20).

Visando verificar a ausência de contaminação do meio de cultura e do espécime, para cada grupo experimental avaliado, um controle negativo (poço com saliva + meio de cultura) e um controle positivo (espécime + saliva + meio de cultura) também foram incubados, nas mesmas condições dos biofilmes, para cada experimento realizado. A ausência de contaminação pode ser confirmada pela ausência de turvação do meio de cultura e por meio de avaliações de UFC/mL e por XTT.

Figura 20 – Desenho esquemático ilustrando a distribuição dos grupos e o posicionamento dos espécimes nas placas de 24 poços durante a realização de um experimento para cultivo dos biofilmes.

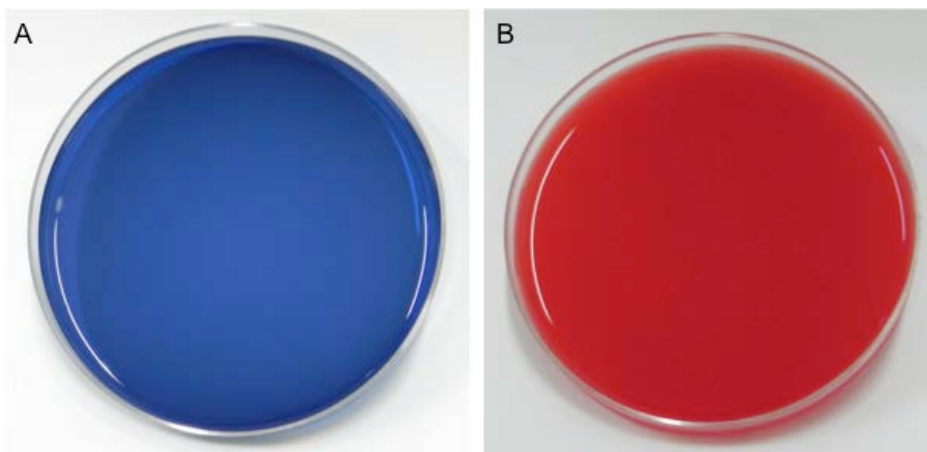


4.5.7 Avaliação dos microrganismos viáveis por meio de UFC/mL

Para o desprendimento dos microrganismos aderidos ao biofilme, cada espécime de esmalte foi, individualmente, transferido para um microtubo contendo 1 mL de PBS estéril em temperatura ambiente. Com o auxílio de um agitador do tipo vórtex, cada microtubo foi agitado por 2 min e, em seguida, 100 μ L da solução resultante foi aspirada e transferida para um novo microtubo contendo 900 μ L de PBS estéril (diluição 10^{-1}). Em seguida, procedimentos de diluições seriadas foram realizados sucessivamente até a obtenção da diluição 10^{-4} , conforme descrito anteriormente.

Após os procedimentos de diluição seriada, alíquotas de 25 μ L, referentes a cada diluição (10^{-1} a 10^{-4}) foram plaqueadas em duplicatas, conforme descrito anteriormente no item 4.3.4. Os meios de cultura utilizados foram CFAT para o *A. naeslundii*, o meio MSA para o *S. sanguis* (Figura 21), considerados específicos para o desenvolvimento destes microrganismos⁹². No caso do biofilme misto, alíquotas de 25 μ L foram obtidas de cada diluição selecionada e plaqueadas em duplicatas nos meios específicos para *A. naeslundii* e para *S. sanguis*. Todas as placas foram incubadas em estufa com 5% de CO₂ a 37°C, durante 48 h. Os experimentos foram realizados em três ocasiões distintas.

Figura 21 – Meios de cultura específicos. A - MSA (*Streptococcus*). B - CFAT (*A. naeslundii*).



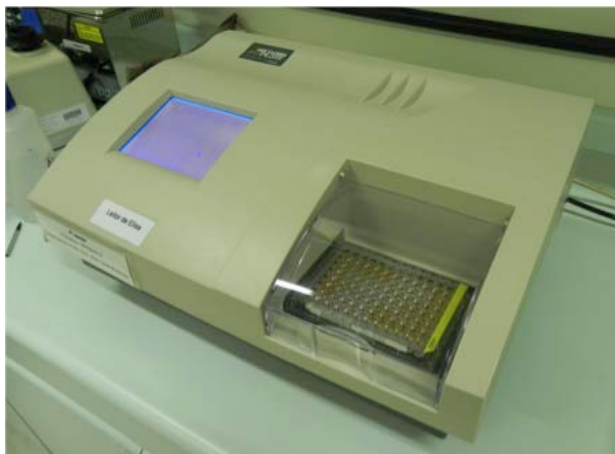
Após o período de incubação, foi realizada a contagem de colônias. As placas foram posicionadas no contador de colônias e a contagem foi realizada visualmente, contabilizando o número de colônias presentes em cada quadrante. O cálculo das UFC/mL foi realizado conforme descrito anteriormente, considerando somente os valores entre 30 e 300 colônias. A média aritmética dos valores de UFC/mL obtidos a partir das duplicatas foram tabulados e transformados em Log_{10} .

4.5.8 Avaliação da atividade metabólica dos microrganismos por meio de ensaio de XTT

Para a avaliação do metabolismo dos microrganismos presentes nos biofilmes, os espécimes foram submetidos ao ensaio de redução de XTT. Para o ensaio, duas soluções foram utilizadas: a solução de XTT e a solução de menadiona. A solução de XTT foi preparada utilizando-se água ultra pura a uma concentração de 1 mg/mL. A solução obtida foi mantida a -80°C até o momento do experimento. A solução de menadiona foi preparada em acetona a 0,4 mM, imediatamente antes da sua utilização.

Os espécimes foram transferidos para uma placa de cultura com 24 orifícios contendo 2 mL da seguinte solução: 158 μL de PBS estéril a 200 mM de glicose, 40 μL de solução de XTT previamente preparada e 2 μL de solução de menadiona previamente preparada. As placas foram embaladas em papel alumínio para evitar o contato com a luz e incubadas a 37°C por 3 h. Após esse período, a solução presente em cada orifício foi homogeneizada com o auxílio de uma micropipeta. A seguir, uma alíquota de 1 mL, referente a solução presente em cada poço, foi transferida para um microtubo e centrifugada a 5.000 rpm durante 2 min, visando a precipitação das células. Ao final do processo de centrifugação, 200 μL do produto da degradação do XTT (sobrenadante) foram transferidos, em duplicatas, para uma placa de 96 poços. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro de ELISA com filtro 492 nm⁹⁰ (Figura 22).

Figura 22 – Aferição da absorbância para o teste de XTT.



4.5.9 Avaliação da biomassa total dos biofilmes por meio de cristal violeta

Para a quantificação da biomassa total, com o auxílio de peças clínicas estéreis, os espécimes foram transferidos para novas placas de cultura de 24 poços e, com o auxílio de uma micropipeta, alíquotas de 500 μL de etanol foram adicionadas, cuidadosamente, aos poços contendo os espécimes de esmalte provenientes dos três tipos de biofilmes. Após 15 min, com o auxílio de peças clínicas, os espécimes foram cuidadosamente removidos do etanol e reservados durante 20 min para que o etanol remanescente na superfície de cada espécime pudesse evaporar.

Em seguida, com o auxílio de pinças clínicas, cada espécime foi imerso 500 μL do corante cristal violeta na concentração de 1%. Decorridos 5 min, os espécimes foram submetidos a 3 lavagens com 500 μL de PBS estéril. Em seguida, os espécimes foram removidos do PBS e reservados durante 15 min para que o PBS remanescente evaporasse. Finalmente, com o auxílio de pinças clínicas, cada espécime foi imerso em 500 μL de ácido acético na concentração de 33% e, após suave agitação, com o auxílio de uma micropipeta, uma alíquota de 200 μL referente a cada poço foi transferida, em duplicata, para uma placa de 96 poços. A placa contendo as alíquotas referentes a cada espécime foi posicionada no aparelho espectrofotômetro sob densidade óptica de 570 nm para aferição da absorbância⁹⁰ (Figura 23).

Figura 23 – Aferição da absorvância para o teste cristal violeta.



4.6 Análise dos dados

Os dados obtidos na Fase 1 pelas análises Raman, XPS e na Fase 2 pelas avaliações UFC/mL, XTT e cristal violeta foram submetidos a análise estatística. Métodos não paramétricos foram aplicados pois, com 4 ou 10 observações em cada grupo, foi considerado inviável avaliar ou supor alguma distribuição para os dados. O nível de significância dos testes foi de 5%, ou seja, diferenças ou efeitos foram considerados significantes quando o nível descritivo dos testes (valor de P) foi menor que 0,05. Os Softwares utilizados para a realização da análise estatística foram SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versão 19 e análise de variância não paramétrica (ANOVA np)

O pico $\text{PO}_4^{2-} \nu_1$ em 960 cm^{-1} , característico do esmalte dental, foi utilizado como referência para o ajuste de linha de base ⁴⁶, assim como para o cálculo das razões referentes aos compostos identificados pelas análises Raman. Identificado pela análise XPS, o pico referente ao C 1s foi submetido a deconvolução de seus componentes para detectar a porcentagem de CO_3 , que foi utilizada para o cálculo da razão CO_3/P . A razão Ca/P também foi calculada, por meio dos espectros referentes ao Ca 2p e P 2p.

Para os dados correspondentes as avaliações Raman e XPS, uma análise exploratória inicial utilizando testes não paramétricos de Wilcoxon e Kruskal-Wallis foi realizada para as comparações pré e pós-esterilização e entre grupos, respectivamente. Visando avaliar se o comportamento de um grupo, pré e pós-esterilização, foi diferente do comportamento do outro grupo, o efeito da interação

entre grupo e tempo (grupo x tempo) também foi verificado, tanto para os dados Raman quanto XPS, aplicando-se ANOVA np de dados ordinais com medidas repetidas.

As micrografias obtidas por meio das avaliações de MEV da superfície e da secção transversal do esmalte foram submetidas a análise qualitativa. A análise foi realizada por dois pesquisadores, um ciente a respeito da identificação dos grupos (IM, IG, EO, AU e controle) e outro cego (ciente apenas da distribuição dos espécimes em grupos I, II, III, IV e V). Inicialmente, cada pesquisador realizou a avaliação das imagens correspondentes aos espécimes do mesmo grupo e, posteriormente, realizou a comparação das imagens entre os diferentes grupos. A avaliação final foi realizada pelos dois pesquisadores.

Os gráficos obtidos por meio da análise EDS foram utilizados para a identificação dos elementos presentes nos espécimes de esmalte. A análise foi realizada de forma qualitativa, inicialmente comparando-se os espécimes de cada grupo e, posteriormente, realizando comparações entre os grupos experimentais e controle.

Os gráficos provenientes da análise de RMN foram analisados com o auxílio do programa DMFit. Foi realizado o cálculo de largura meia altura (FWHM) referente a cada um dos picos, por meio da utilização da função mista gaussiana/lorentziana, utilizando o melhor ajuste das curvas experimentais. Os gráficos foram, ainda, avaliados quanto ao desvio químico, expresso em ppm.

Para os dados obtidos por meio das avaliações de UFC/mL (Log_{10}), XTT e cristal violeta (valores de DO expressos em nm), testes não paramétricos de Kruskal-Wallis foram utilizados para comparação entre os grupos. Quando diferenças significativas entre os grupos foram observadas, múltiplas comparações (seis) entre pares de grupos foram feitas aplicando-se correção de Bonferroni.

5 Resultados

Os resultados obtidos pelos experimentos realizados nas Fases 1 e 2 foram descritos em seguida.

5.1 Fase 1: Caracterização morfológica, elementar e estrutural do esmalte dental submetido aos diferentes métodos de esterilização

Os resultados obtidos pelos experimentos da Fase 1 foram descritos a seguir.

5.1.1 Raman

Os espectros obtidos por meio das análises Raman possibilitaram a identificação de picos referentes aos compostos característicos do esmalte dental PO_4^{-3} ν_1 , PO_4^{-3} ν_2 , PO_4^{-3} ν_4 , CO_3^{-2} ν_1 ¹⁴. Em todos os espécimes foi identificada a presença dos grupos fosfato e carbonato. Foi possível identificar quatro modos vibracionais referentes ao grupo fosfato, sendo PO_4^{-3} ν_1 em 962 cm^{-1} , PO_4^{-3} ν_2 apresentando dois picos em 430 cm^{-1} (1) e 449 cm^{-1} (2), PO_4^{-3} ν_3 em 1026 cm^{-1} e PO_4^{-3} ν_4 apresentando três picos em 581 cm^{-1} (1), 594 cm^{-1} (2) e 611 cm^{-1} (3). Para o carbonato, apenas um modo vibracional foi identificado em 1070 cm^{-1} (CO_3^{-2} ν_1). Espectros representativos das análises pré e pós-esterilização em cada grupo podem ser observados nas Figuras 24 e 25.

A realização da análise dos padrões carbonato e fosfato, possibilitou a confirmação da identidade dos picos. Todos os modos vibracionais descritos acima estavam presentes em todos os espécimes avaliados na análise pré-esterilização. Na análise pós-esterilização, foi observada a manutenção de todos os picos, não tendo sido identificado o surgimento de nenhum novo pico nos espectros.

Figura 24 – Espectros representativos das análises Raman pré e pós-esterilização. A – Irradiação por micro-ondas. B – Irradiação gamma.

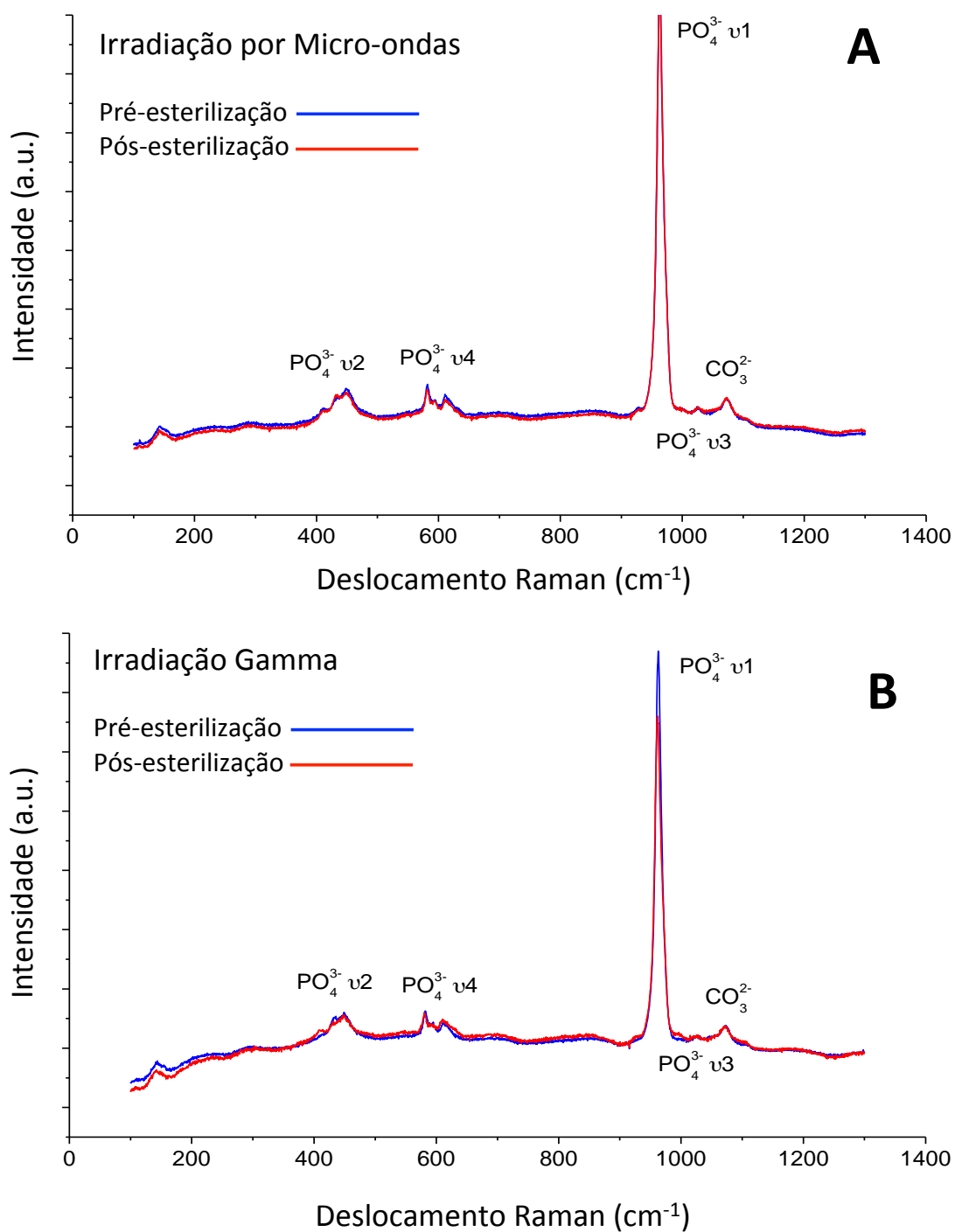
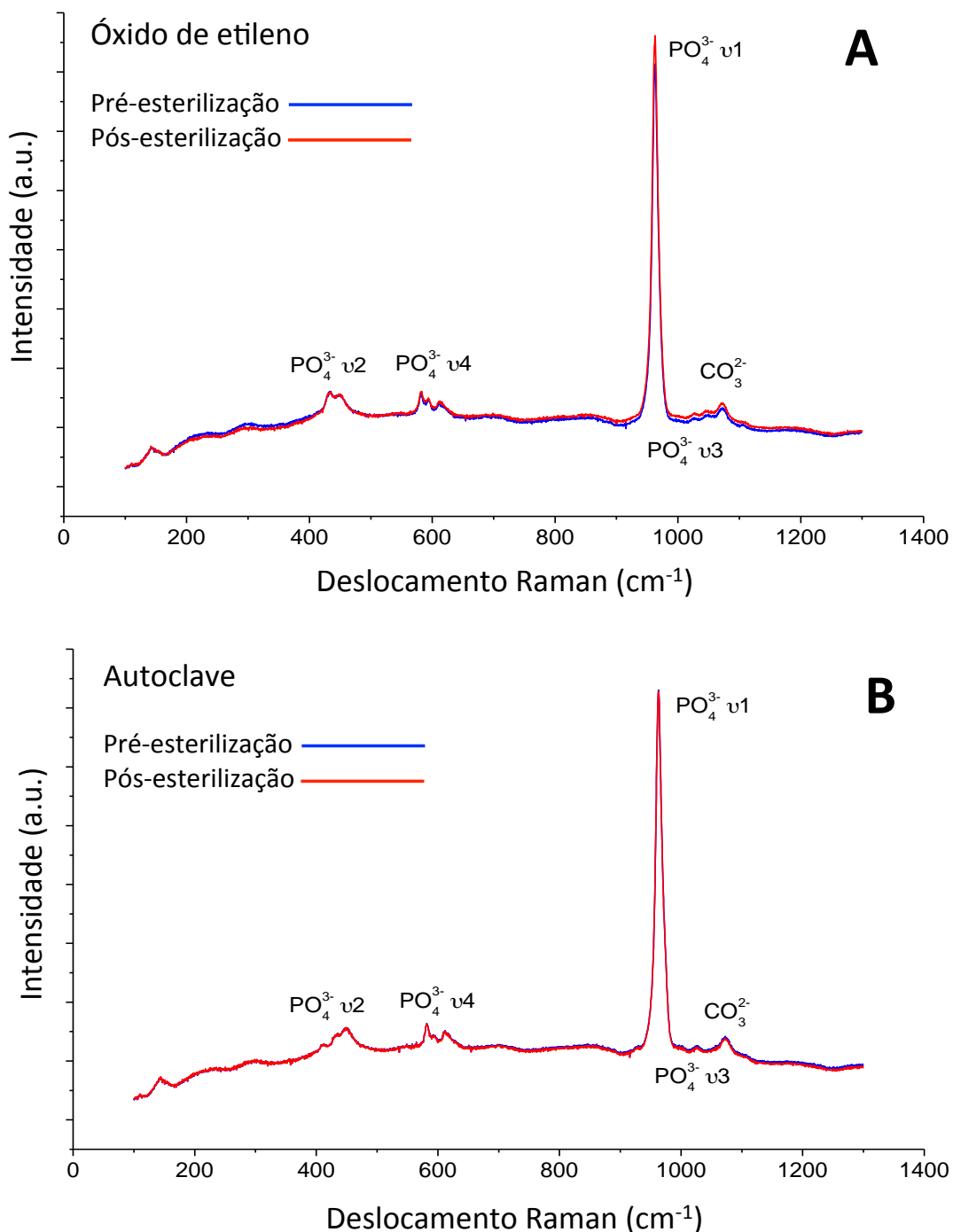


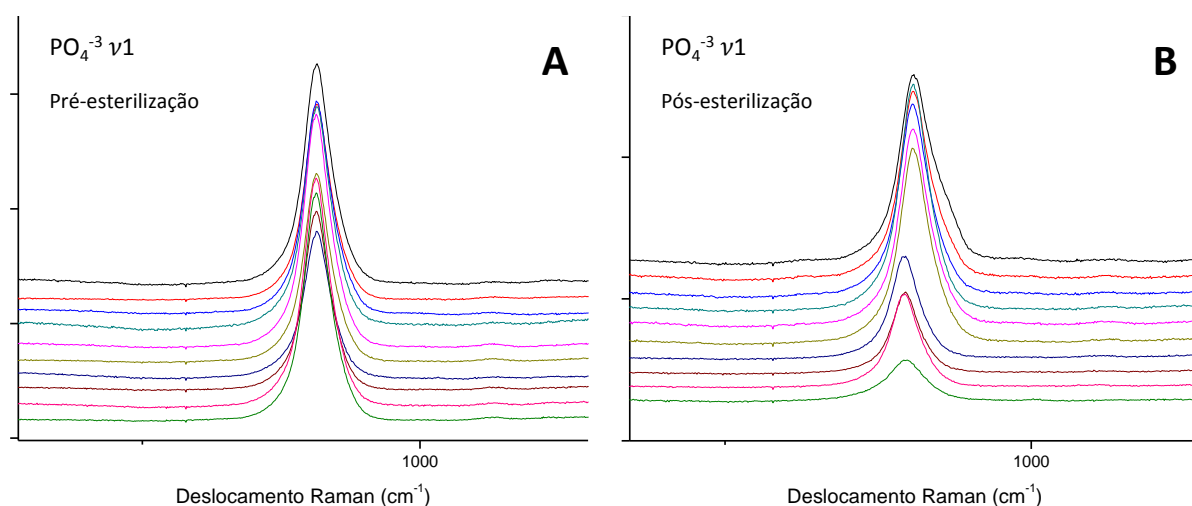
Figura 25- Espectros representativos das análises Raman pré e pós-esterilização. A - Óxido de etileno. B - Autoclave.



Quanto ao deslocamento dos picos no espectro, a comparação pré e pós-esterilização, realizada para cada grupo, não indicou deslocamentos, de uma forma geral, com exceção dos espécimes utilizados nas análises XPS, que apresentaram um deslocamento de 4 cm⁻¹ para a esquerda, em todos os picos do

espectro. Este comportamento foi observado em todos os espécimes submetidos a análise XPS (n=4) e está representado na Figura 26.

Figura 26 – Espectros representativos do pico $\text{PO}_4^{-3} \nu_1$ obtidos para todos os grupos avaliados pela análise Raman (n=10). A – Pré-esterilização. B - Pós-esterilização.



Com relação as intensidades dos picos, o fosfato ν_1 foi identificado como pico de maior intensidade, tendo sido utilizado como referência para o ajuste de linha de base dos espectros. O fosfato ν_3 , entretanto, apresentou intensidade muito reduzida, próxima aos índices de ruído do espectro e, dessa forma, não foi considerado no momento da quantificação das áreas dos picos. Os valores referentes as razões correspondentes aos componentes identificados/ fosfato ν_1 constam na Tabela 1.

De acordo com as comparações realizadas entre as razões obtidas pré e pós-esterilização para cada grupo (teste de Wilcoxon), apenas os valores correspondentes a razão pico 2 do fosfato ν_4 / fosfato ν_1 apresentaram alterações estatisticamente significantes nos grupos AU (redução após esterilização) e IM (aumento após esterilização). As demais razões não apresentaram alterações significativas considerando as comparações entre pré e pós esterilização, assim como entre grupos ($P > 0,05$).

Tabela 1 – Médias (DP) das razões correspondentes aos componentes identificados na análise Raman pré e pós-esterilização para os diferentes grupos (n=10).

Componente	Período	Grupo				Valor de <i>P</i>
		IM	IG	OE	AU	
PO ₄ ⁻³ ν 4 (1)/	Pré	0,038 (0,012)	0,038 (0,012)	0,032 (0,009)	0,024 (0,009)	0,072
PO ₄ ⁻³ ν1	Pós	0,030 (0,013)	0,038 (0,013)	0,026 (0,006)	0,028 (0,005)	0,154
<i>Valor de P</i>		0,093	0,959	0,139	0,214	
PO ₄ ⁻³ ν 4 (2)/	Pré	0,017 (0,004)	0,019 (0,004)	0,018 (0,002)	0,025 (0,013)	0,528
PO ₄ ⁻³ ν1	Pós	0,021 (0,009)	0,02 (0,01)	0,017 (0,006)	0,016 (0,004)	0,344
<i>Valor de P</i>		0,007*	0,878	0,386	0,050*	
PO ₄ ⁻³ ν 4 (3)/	Pré	0,036 (0,014)	0,040 (0,016)	0,032 (0,011)	0,025 (0,003)	0,263
PO ₄ ⁻³ ν1	Pós	0,033 (0,011)	0,046 (0,02)	0,031 (0,014)	0,027 (0,006)	0,084
<i>Valor de P</i>		0,721	0,114	0,333	0,767	
PO ₄ ⁻³ ν 2 (1)/	Pré	0,020 (0,009)	0,018 (0,008)	0,018 (0,007)	0,016 (0,008)	0,545
PO ₄ ⁻³ ν1	Pós	0,040 (0,039)	0,030 (0,042)	0,027 (0,028)	0,015 (0,008)	0,067
<i>Valor de P</i>		0,241	0,799	0,959	0,799	
PO ₄ ⁻³ ν 2 (2)/	Pré	0,088 (0,026)	0,101 (0,031)	0,111 (0,043)	0,096 (0,026)	0,533
PO ₄ ⁻³ ν1	Pós	0,098 (0,037)	0,128 (0,047)	0,101 (0,054)	0,088 (0,025)	0,277
<i>Valor de P</i>		0,646	0,093	0,508	0,285	
CO ₃ ²⁻ ν1/	Pré	0,031 (0,005)	0,039 (0,019)	0,037 (0,013)	0,037 (0,013)	0,559
PO ₄ ³⁻ ν1	Pós	0,039 (0,013)	0,049 (0,014)	0,041 (0,014)	0,043 (0,013)	0,487
<i>Valor de P</i>		0,093	0,093	0,575	0,139	

No sentido vertical: * Indica diferença estatisticamente significante entre pré e pós-esterilização (teste de Wilcoxon, $P < 0,05$).

A Tabela 2 apresenta os resultados correspondentes a análise ANOVA np para avaliação efeitos significativos de tempo (pré e pós esterilização), grupo e também da interação grupo x tempo. Na Tabela 3 estão descritos os valores *P* dos contrastes para as medidas que apresentaram efeitos significativos de interação ou de grupo.

Tabela 2 – Valores correspondentes aos efeitos relativos da interação entre grupo e tempo para a avaliação Raman.

Elemento	Período (n=4)	Grupo				Grupo	Valor de <i>P</i>	
		IM	IG	OE	AU		Tempo	Interação
PO ₄ ³⁻ ν 4 (1)/ PO ₄ ³⁻ ν1	Pré Pós	0,660 0,439	0,614 0,638	0,525 0,358	0,341 0,427	0,106	0,123	0,050*
PO ₄ ³⁻ ν 4 (2)/ PO ₄ ³⁻ ν1	Pré Pós	0,433 0,590	0,544 0,543	0,511 0,368	0,629 0,383			
PO ₄ ³⁻ ν 4 (3)/ PO ₄ ³⁻ ν1	Pré Pós	0,541 0,530	0,576 0,699	0,500 0,450	0,331 0,373	0,030*	0,542	0,555
PO ₄ ³⁻ ν 2 (1)/ PO ₄ ³⁻ ν1	Pré Pós	0,559 0,723	0,490 0,454	0,518 0,504	0,406 0,348			
PO ₄ ³⁻ ν 2 (2)/ PO ₄ ³⁻ ν1	Pré Pós	0,410 0,464	0,523 0,673	0,570 0,430	0,509 0,423	0,414	0,913	0,210
CO ₃ ²⁻ ν1/ PO ₄ ³⁻ ν1	Pré Pós	0,313 0,485	0,436 0,720	0,459 0,530	0,462 0,596			

* Estatisticamente significativa (ANOVA np medidas repetidas; *P* < 0,05).

Tabela 3 – Efeitos de interação (avaliação dos contrastes - valores de *P*) correspondentes as razões dos compostos identificados por meio da análise Raman.

Grupos	Razões					
	PO ₄ ³⁻ ν4 (1)/ PO ₄ ³⁻ ν1		PO ₄ ³⁻ ν4 (2)/ PO ₄ ³⁻ ν1		PO ₄ ³⁻ ν4 (3)/ PO ₄ ³⁻ ν1	PO ₄ ³⁻ ν2 (1)/ PO ₄ ³⁻ ν1
	Pré	Pós	Pré	Pós		
AU x IM	0,010*	0,923	0,133	0,107	0,070	0,001*
AU x IG	0,033*	0,074	0,504	0,249	0,005*	0,253
AU x OE	0,124	0,463	0,334	0,898	0,209	0,158
IM x IG	0,723	0,173	0,358	0,751	0,404	0,030*
IM x OE	0,270	0,524	0,493	0,098	0,609	0,149
IG x OE	0,484	0,022*	0,771	0,224	0,172	0,670
Pré x Pós	AU	0,331		0,014*	-	-
	IM	0,045*		0,002*	-	-
	IG	0,734		0,982	-	-
	OE	0,050*		0,296	-	-

* Estatisticamente significativa (ANOVA np medidas repetidas; *P* < 0,05).

Por meio dos dados apresentados na Tabela 2, foi possível observar que as razões fosfato ν_4 (1)/ fosfato ν_1 e fosfato ν_4 (2)/ fosfato ν_1 apresentaram efeitos significativos de interação grupo x tempo, ou seja, os comportamentos dos grupos após a esterilização foram diferentes. A comparação entre os grupos pré-esterilização indicou valores significativamente menores de fosfato ν_4 (1)/ fosfato ν_1 no grupo AU quando comparado aos grupos IM e IG (Tabelas 1 e 3). A razão fosfato ν_4 (1)/ fosfato ν_1 apresentou redução significativa após a esterilização nos grupos IM e OE. Após a esterilização, os valores correspondentes a razão fosfato ν_4 (2)/ fosfato ν_1 apresentaram redução significativa no grupo AU e aumento significativo no grupo IM (Tabelas 1 e 3).

As razões fosfato ν_4 (3)/ fosfato ν_1 e fosfato ν_2 (1)/ fosfato ν_1 apresentaram efeito significativo somente entre grupos (Tabela 2). O grupo AU apresentou menores valores de fosfato ν_4 (3)/ fosfato ν_1 que o grupo IG, tanto antes como após esterilização. Da mesma maneira, o grupo IM apresentou maiores valores de fosfato ν_2 (1)/ fosfato ν_1 , quando comparado aos grupos AU e IG (Tabelas 1 e 3). A razão fosfato ν_2 (2)/ fosfato ν_1 não apresentou efeitos significativos tanto entre os grupos como entre os tempos. A razão carbonato ν_1 / fosfato ν_1 apresentou efeito significativo apenas entre tempos, ou seja, todos os grupos apresentaram aumento significativo após esterilização (Tabela 3).

5.1.2 XPS

Os resultados obtidos pela análise XPS mostraram que composição química da superfície do esmalte foi semelhante entre os grupos avaliados, conforme pode ser observado na Figura 27. Os elementos identificados em maior concentração na superfície do esmalte foram oxigênio (O), carbono (C), cálcio (Ca), fósforo (P) e nitrogênio (N), enquanto os elementos sódio (Na), magnésio (Mg) e cloro (Cl) foram detectados em menores quantidades (< 0,5 % at.). A estatística descritiva dos elementos antes e após procedimento de esterilização

Os valores referentes às análises XPS pré e pós-esterilização para os elementos C, P, Ca, N, O, composto CO_3 (% at.) e razões CO_3/P e Ca/P são apresentados na Tabela 4.

Figura 27 – Espectros representativos das análises XPS pré e pós-esterilização. A - Irradiação por micro-ondas. B - Irradiação gamma. C - Óxido de etileno. D - Autoclave.

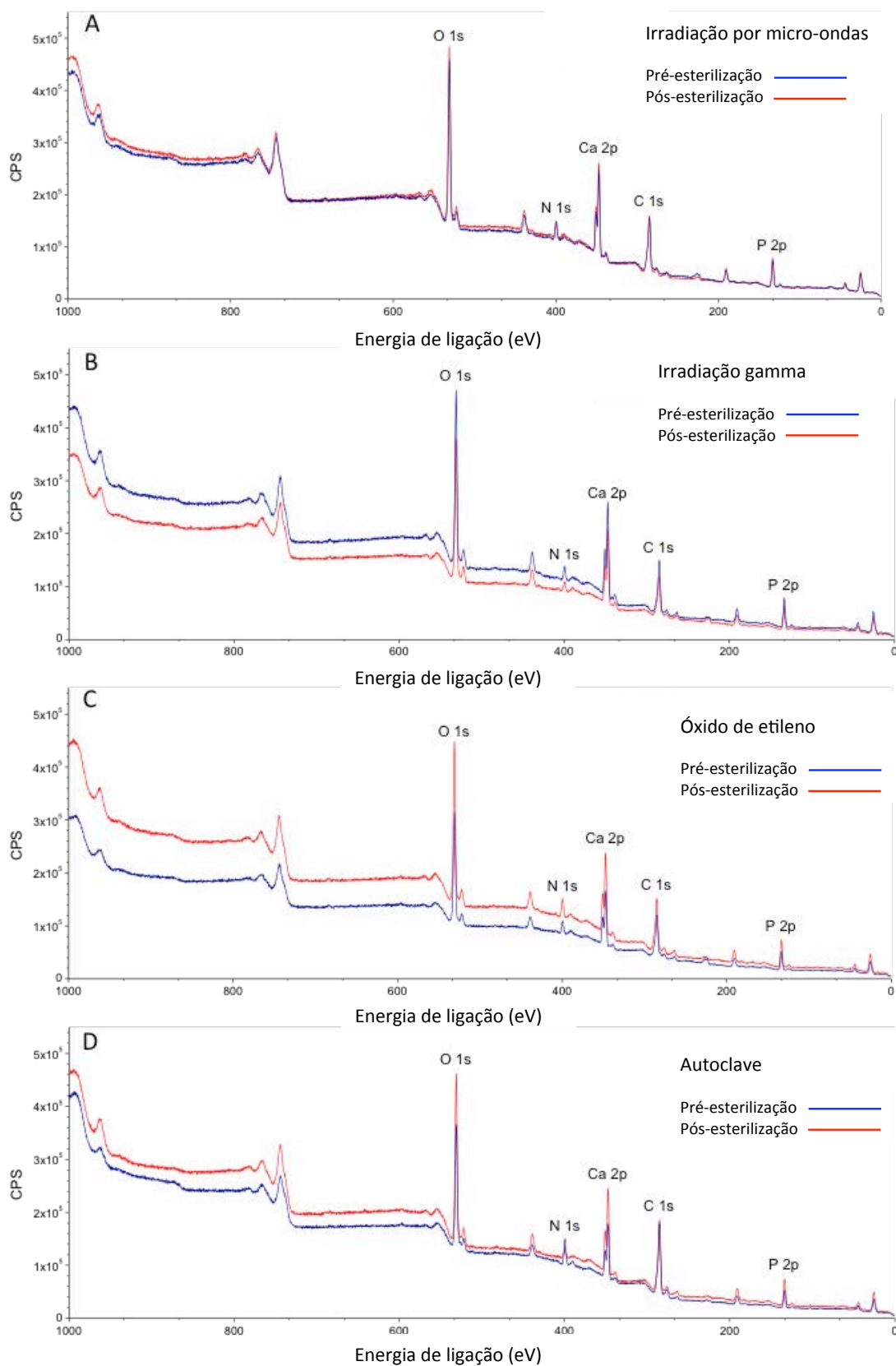


Tabela 4 –Médias (DP) da concentração atômica (% at.) referentes aos elementos identificados pelas análises XPS pré e pós-esterilização para os diferentes grupos (n=4).

Elemento	Período	Grupo				Valor de P
		IM	IG	OE	AU	
C	Pré	30,75 (1,2)	31,73 (3,1)	33,28 (3,7)	34,30 (6,4)	0,846
	Pós	37,03 (5,0)	30,78 (2,2)	36,38 (4,8)	40,68 (3,8)	0,084
	Valor de P	0,068	0,273	0,068	0,144	
P	Pré	9,35 (0,5)	9,28 (0,8)	9,18 (0,9)	9,00 (1,3)	0,959
	Pós	8,33 (1,3)	9,43 (0,6)	9,23 (1,1)	7,78 (1,1)	0,279
	Valor de P	0,109	0,285	1,000	0,141	
Ca	Pré	12,75 (0,5)	12,58 (1,0)	12,33 (1,0)	12,55 (1,6)	0,995
	Pós	10,83 (1,9)	12,70 (0,7)	11,83 (1,1)	10,28 (1,6)	0,246
	Valor de P	0,068	0,715	0,068	0,109	
N	Pré	4,30 (1,0)	4,23 (0,4)	4,45 (0,8)	3,18 (0,2)	0,030*
	Pós	5,70 (1,5)	4,18 (0,4)	4,28 (0,6)	5,58 (2,3)	0,400
	Valor de P	0,068	0,564	0,285	0,144	
O	Pré	42,40 (1,4)	42,20 (1,8)	40,83 (2,4)	40,93 (3,5)	0,724
	Pós	38,15 (3,2)	42,98 (1,2)	38,58 (3,1)	35,70 (3,3)	0,080
	Valor de P	0,068	0,197	0,068	0,144	
CO ₃	Pré	0,98 (0,3)	1,03 (0,4)	1,06 (0,2)	1,15 (0,12)	0,897
	Pós	0,77 (0,3)	1,30 (0,5)	0,88 (0,4)	0,72 (0,06)	0,265
	Valor de P	0,273	0,465	0,715	0,068	
CO ₃ /P	Pré	0,11(0,07)	0,11 (0,1)	0,12 (0,02)	0,13 (0,06)	0,613
	Pós	0,09 (0,1)	0,14 (0,1)	0,10 (0,05)	0,10 (0,04)	0,580
	Valor de P	0,068	0,465	0,273	0,715	
Ca/P	Pré	1,37 (0,07)	1,36 (0,06)	1,35 (0,1)	1,40 (0,06)	0,633
	Pós	1,30 (0,08)	1,35 (0,03)	1,32 (0,1)	1,32 (0,04)	0,384
	Valor de P	0,068	0,068	0,465	0,273	

No sentido horizontal: * Indica diferença estatisticamente significativa entre grupos (teste Kruskal-Wallis, $P < 0,05$).

De acordo com os dados apresentados na Tabela 4, durante a avaliação pré-esterilização entre grupos, o elemento N apresentou valores de

concentração significativamente diferentes entre os grupos (teste Kruskal-Wallis, $P < 0,05$). Após os procedimentos de esterilização, a comparação entre os grupos não apresentou diferenças significantes nas concentrações de todos os elementos químicos avaliados. As avaliações pré e pós-esterilização para cada grupo também não apresentaram diferenças estatisticamente significantes (teste Wilcoxon, $P > 0,05$).

Os resultados da análise de variância não paramétrica (ANOVA np) visando detectar efeitos significativos de interação grupo x tempo são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – Valores correspondentes aos efeitos relativos da interação entre grupo e tempo para a avaliação XPS.

Elemento	Período (n=4)	Grupo				Grupo	Valor de <i>P</i>	
		IM	IG	OE	AU		Tempo	Interação
C	Pré	0,305	0,363	0,457	0,484	0,204	0,003*	<0,001*
	Pós	0,645	0,305	0,617	0,824			
P	Pré	0,602	0,582	0,531	0,500	0,654	0,050*	0,050*
	Pós	0,383	0,621	0,555	0,227			
Ca	Pré	0,629	0,594	0,566	0,578	0,699	0,001*	0,010*
	Pós	0,320	0,645	0,438	0,230			
N	Pré	0,434	0,512	0,535	0,098	0,601	0,001*	0,001*
	Pós	0,758	0,504	0,512	0,648			
O	Pré	0,695	0,664	0,512	0,551	0,113	<0,001*	<0,001*
	Pós	0,324	0,727	0,348	0,180			
CO ₃	Pré	0,484	0,500	0,570	0,648	0,658	0,342	0,121
	Pós	0,352	0,695	0,484	0,266			
CO ₃ /P	Pré	0,445	0,453	0,578	0,656	0,832	0,489	0,330
	Pós	0,359	0,625	0,492	0,391			
Ca/P	Pré	0,652	0,578	0,535	0,805	0,861	<0,001*	0,022*
	Pós	0,254	0,496	0,395	0,285			

* Estatisticamente significativa (ANOVA np medidas repetidas; $P < 0,05$).

Os valores *P* dos contrastes para as medidas que apresentaram efeitos significativos de interação grupo x tempo ou de grupo são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Efeitos de interação (avaliação dos contrastes - valores de *P*) correspondentes aos elementos identificados por meio da análise XPS.

Período	Grupo	Elemento					
		C	P	Ca	N	O	Ca/P
Pré	AU x IM	0,413	0,664	0,810	0,034*	0,488	0,378
	AU x IG	0,617	0,746	0,950	< 0,001*	0,613	0,154
	AU x OE	0,915	0,905	0,962	< 0,001*	0,872	0,178
	IM x IG	0,650	0,906	0,827	0,681	0,811	0,699
	IM x OE	0,320	0,694	0,693	0,605	0,253	0,606
	IG x OE	0,610	0,803	0,895	0,884	0,399	0,843
Pós	AU x MI	0,291	0,452	0,638	0,652	0,348	0,795
	AU x IG	0,291	0,011*	0,009*	0,547	< 0,001*	0,022*
	AU x OE	0,237	0,117	0,318	0,597	0,356	0,625
	IM x IG	0,051	0,229	0,086	0,060	0,005*	0,045*
	IM x OE	0,899	0,478	0,612	0,138	0,906	0,553
	IG x OE	0,081	0,739	0,314	0,962	0,030*	0,650
Pré x Pós	IM	0,004*	0,036*	0,008*	0,003*	< 0,001*	0,004*
Pré x Pós	IG	0,117	0,379	0,427	0,857	0,157	0,388
Pré x Pós	OE	< 0,001*	0,768	< 0,001*	0,475	0,002*	0,257
Pré x Pós	AU	0,138	0,112	0,044*	0,009*	0,085	< 0,001*

* Estatisticamente significativa (ANOVA np medidas repetidas; $P < 0,05$).

De acordo com os dados apresentados na Tabela 5, os valores de CO_3 e CO_3/P não apresentaram efeitos significativos de interação grupo x tempo, como também não apresentaram efeitos significantes entre os grupos e após tratamentos. Efeitos significativos de interação grupo x tempo foram observados para os elementos C, P, Ca, N, O e para a razão Ca/P. A ocorrência de tais efeitos demonstrou que as alterações após tratamento dependeram do método de esterilização utilizado.

A avaliação pré-esterilização entre os grupos indicou que, dentre todos os elementos avaliados, efeitos estatisticamente significantes foram identificados apenas para o elemento N, cuja concentração foi significativamente menor no grupo AU em relação aos demais grupos (Tabelas 4 e 6).

Com relação as concentrações dos elementos avaliadas após a esterilização, não foram detectadas efeitos significativos nas concentrações de C e N entre os grupos avaliados (Tabela 6). As concentrações dos elementos P, Ca e os valores correspondentes a razão Ca/P foram significativamente menores no grupo AU quando comparado ao grupo IG (Tabelas 4 e 6). Após a esterilização, concentração significativamente maior de O foi observada no grupo IG quando comparado aos demais grupos (Tabelas 4 e 6). Valores menores de Ca/P também foram observados nos espécimes correspondentes ao grupo IM quando comparado ao grupo IG (Tabelas 4 e 6). De acordo com a Tabela 6, as demais comparações entre os grupos com relação aos demais elementos não foram estatisticamente significantes ($P > 0,05$).

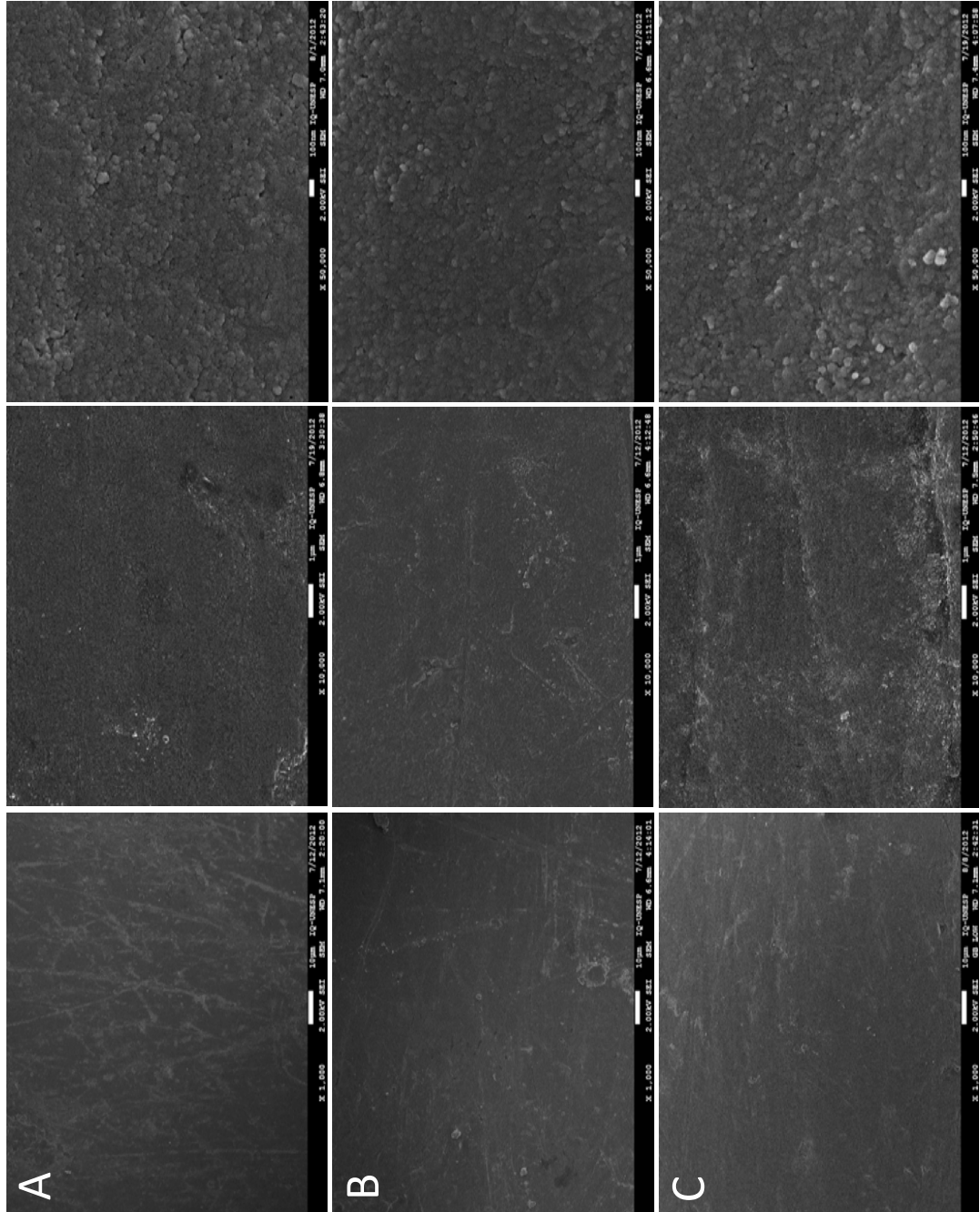
As concentrações dos elementos químicos, obtidas pré e pós-esterilização para cada grupo, revelaram diferentes comportamentos em cada método de esterilização avaliado. A composição química elementar dos espécimes referentes ao grupo IG não apresentou alterações significantes, da mesma forma, não foram observadas diferenças significantes nos valores correspondentes à razão Ca/P (Tabela 6). Nos grupos IM e OE, foram observados aumento significativo nas concentrações de C e redução significativa nas concentrações de O e Ca (Tabelas 4 e 6). Com relação aos grupos IM e AU aumento significativo foi observado nas concentrações do elemento N, assim como, redução significativa nos valores correspondentes à razão Ca/P (Tabelas 4 e 6). As concentrações dos elementos P e Ca também apresentaram redução significativa nos espécimes correspondentes ao grupo IM e AU, respectivamente (Tabelas 4 e 6). Os valores correspondentes ao composto CO_3 e à razão CO_3/P não apresentaram diferenças estatisticamente significantes em nenhum grupo (Tabela 6).

5.1.3 MEV superficial e em secção transversal

As micrografias selecionadas como representativas da superfície dos espécimes de esmalte de cada um dos grupos avaliados são apresentadas na Figura 28, A-E. As imagens correspondentes ao grupo controle mostram uma superfície de aparência homogênea, predominantemente densa e lisa (Figura 28 A; 1.000×, 10.000×). Nos grupos experimentais, diferentes graus de alteração puderam

ser observados na superfície dos espécimes quando os grupos foram comparados ao grupo controle, variando desde pequenas alterações de normalidade até pronunciadas alterações na superfície do esmalte. No grupo IG não foram observadas alterações morfológicas significantes, fato que pode ser constatado na Figura 28 B; 1.000×, 10.000×. Um pequeno grau de alteração pôde ser observado nos espécimes referentes ao grupo IM, caracterizado pela presença de microtrincas e pequeno grau de desorganização na superfície dos prismas (Figura 28 C; 1.000×, 10.000×). Da mesma maneira, por meio das micrografias correspondentes ao grupo OE (Figura 28 D; 1,000×, 10,000×), foi possível observar a ocorrência de microtrincas e ligeira intensificação dos danos causados aos prismas quando comparadas às imagens correspondentes ao grupo IM, IG e controle. De acordo com as imagens obtidas pelos espécimes referentes ao grupo AU, as alterações morfológicas presentes na superfície do esmalte ficam evidentes. Pode ser observado um desarranjo na superfície dos prismas, caracterizado por degradação e perda de substância do esmalte. Trincas, regiões com perda de substância e prismas desocluídos foram observados ao longo de toda a superfície do esmalte e em todos os espécimes referentes ao grupo AU (Figura 28 E; 1,000×, 10,000×). Nas imagens referentes aos maiores aumentos, os grupos controle, IG, IM e OE apresentaram características morfológicas semelhantes, com a presença de agregados esféricos e de organização uniforme (Figura 28 A-D, 50.000×). Nas imagens referentes ao grupo AU, entretanto, as características morfológicas observadas foram um pouco diferentes, de maneira que os cristais de esmalte apresentam-se mais largos e estão distribuídos de maneira irregular, tendo sido observada a presença de regiões de maior porosidade (Figura 28 E; 50.000×).

Figura 28 - Micrografias SEM da superfície do esmalte nos aumentos de 1.000, 10.000 e 50.000x.
 A - Controle; B - Irradiação gamma; C - Irradiação por micro-ondas. (Continua)



Continuação

Figura 28 - Micrografias SEM da superfície do esmalte nos aumentos de 1.000, 10.000 e 50.000x. D - Óxido de etileno; E - Autoclave.

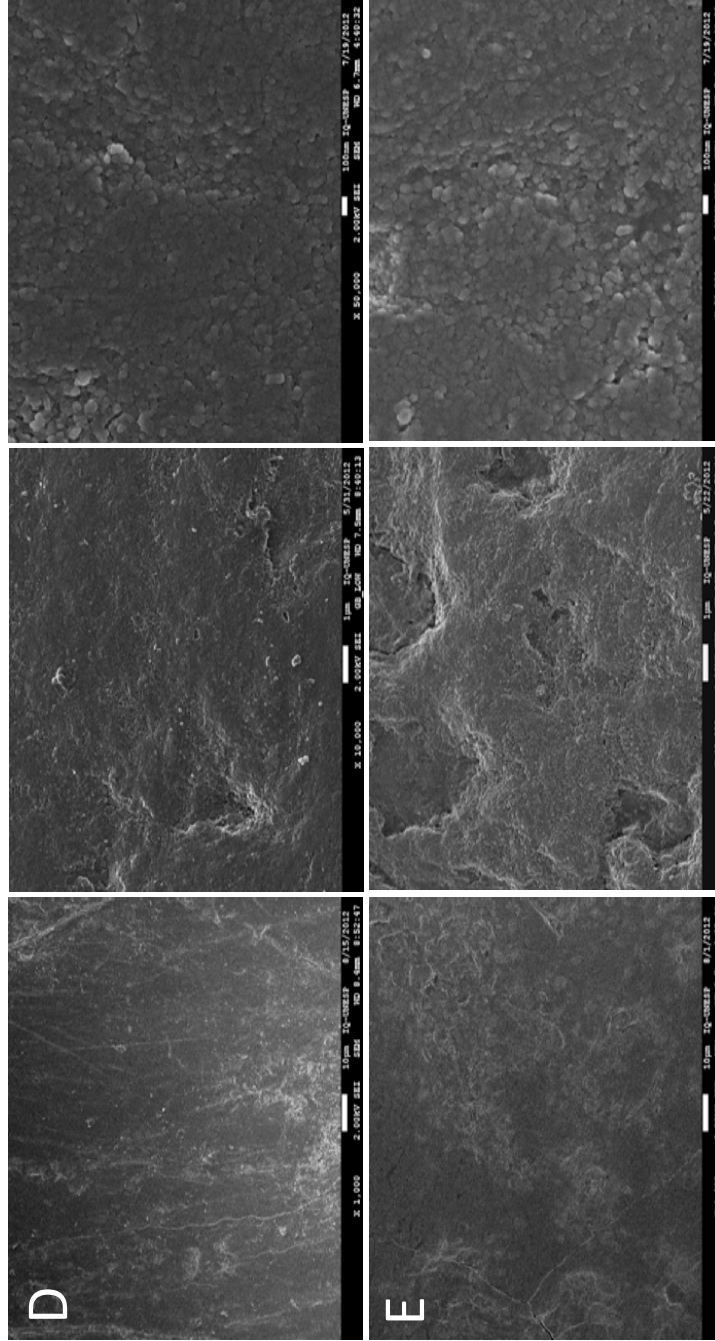
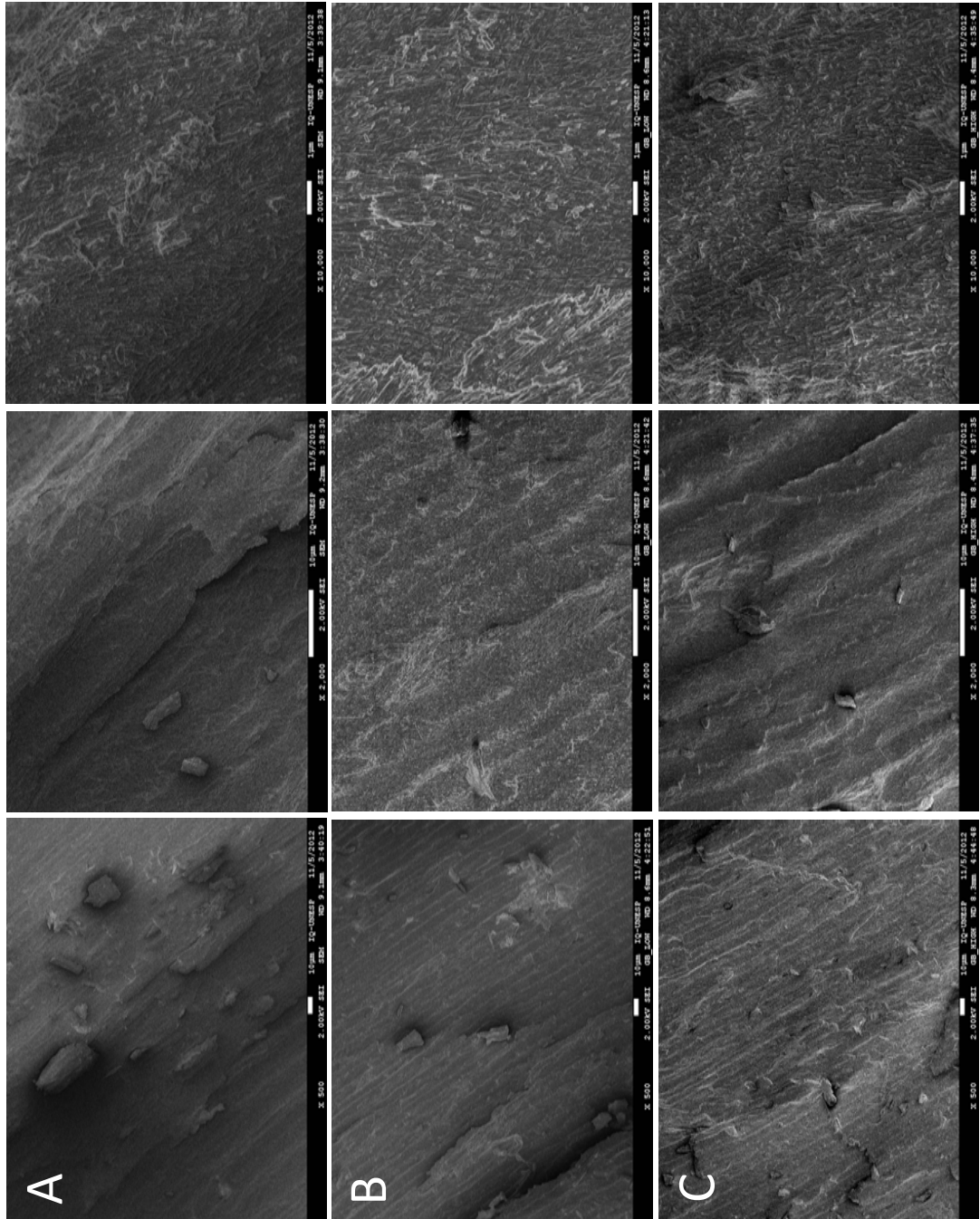
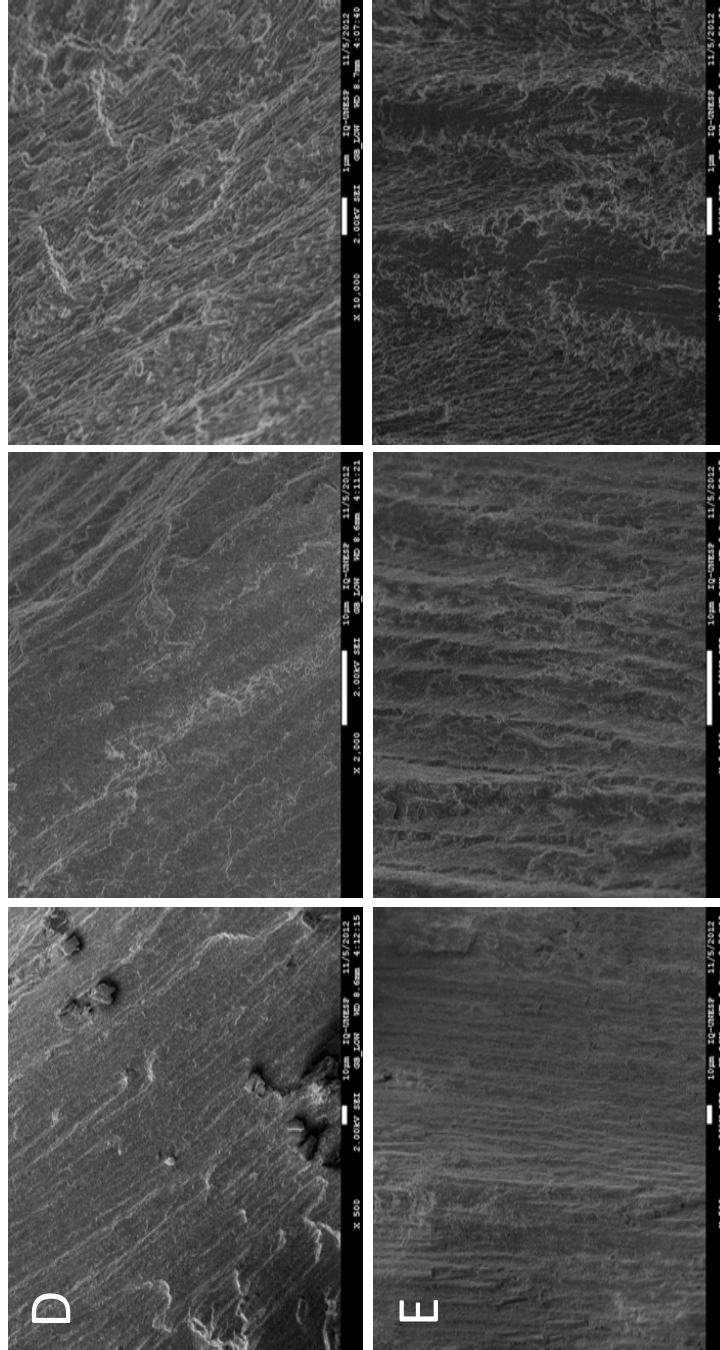


Figura 29 - Micrografias SEM da seção transversal do esmalte nos aumentos de 500, 2.000 e 10.000x. A - Controle; B - Irradiação gamma; C - Irradiação por micro-ondas. (Continua)



Continuação

Figura 29 - Micrografias SEM da secção transversal do esmalte nos aumentos de 500, 2.000 e 10.000x. D - Óxido de etileno; E - Autoclave.



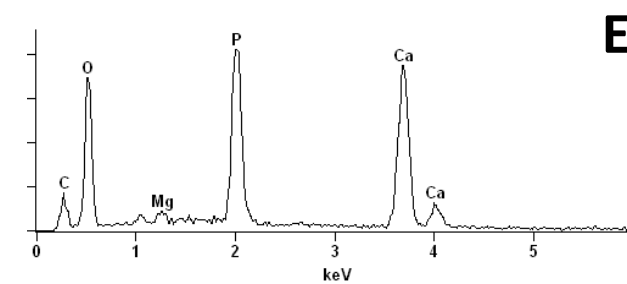
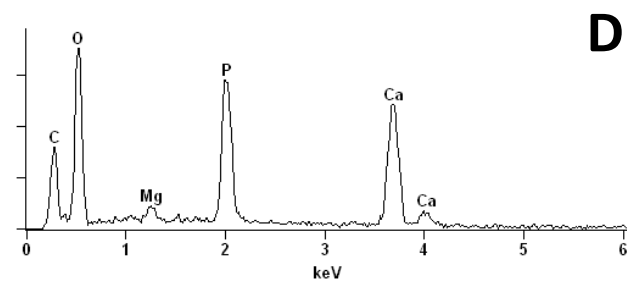
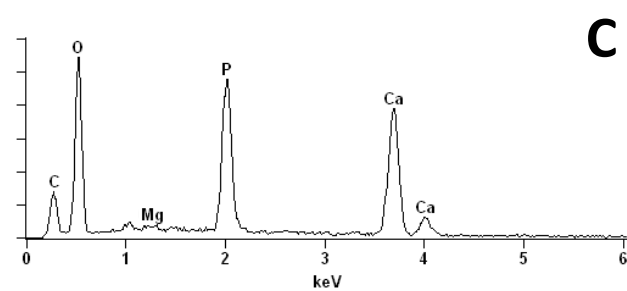
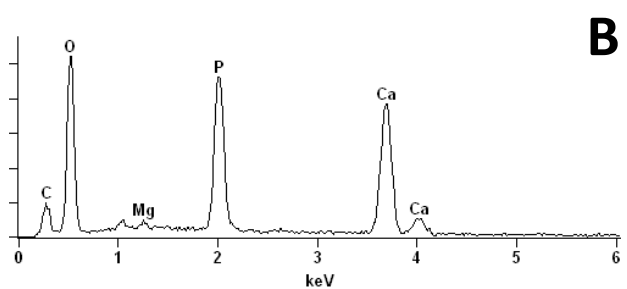
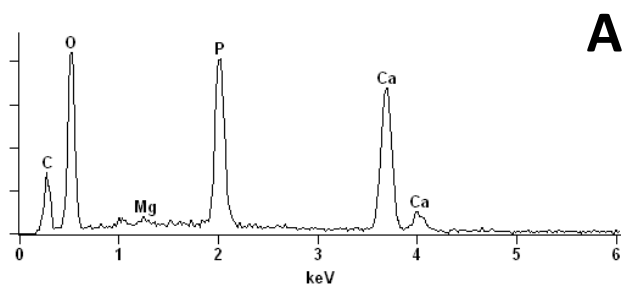
As micrografias representativas de cada grupo referentes ao esmalte em secção transversal são apresentadas na Figura 29 A-E. A morfologia referente ao grupo controle pode ser observada na Figura 29 A, caracterizada por uma superfície homogênea, predominantemente densa e lisa. As imagens referentes aos grupos IG, MI e OE apresentam características semelhantes, não tendo sido observadas alterações significativas quando comparadas ao grupo controle (Figura 29 B-D). No entanto, os espécimes do grupo AU apresentaram características morfológicas diferentes dos demais grupos, tendo sido observada a presença de elevada rugosidade ao longo de toda a secção transversal (Figura 29 E).

5.1.4 EDS

Por meio dos resultados obtidos pelas análises de EDS, foi possível observar a similaridade existente entre a composição elementar dos espécimes referentes aos diferentes grupos avaliados (Figura 30 A-E).

Por meio dos dados obtidos pela avaliação EDS, quatro elementos principais puderam ser identificados em todos os espécimes avaliados, os quais são carbono (C), oxigênio (O), cálcio (Ca) e fósforo (P). Os elementos sódio (Na), magnésio (Mg), cloro (Cl) e zinco (Zn) também foram identificados, em concentrações menores em alguns dos espécimes avaliados. A avaliação qualitativa realizada entre os espécimes de cada grupo não detectou diferenças na composição elementar, da mesma forma, análise comparativa realizada entre os diferentes grupos experimentais e o grupo controle também não indicou diferenças.

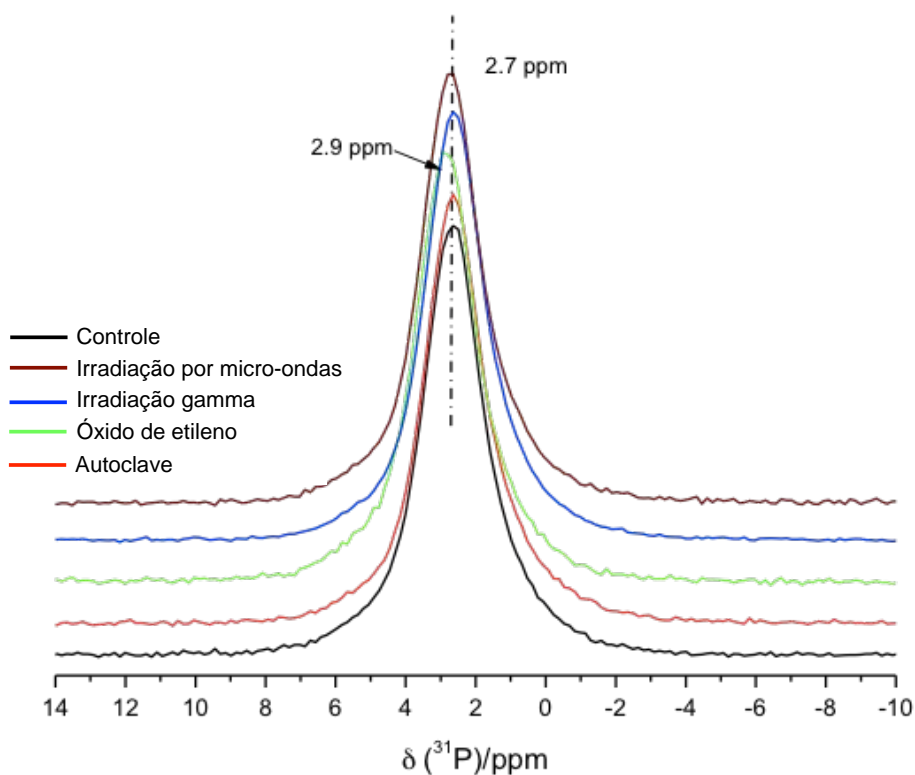
Figura 30 – Espectros representativos das análises EDS obtidos para os grupos avaliados. A - Controle; B - Irradiação gamma; C - Irradiação por micro-ondas; D - Óxido de etileno; E - Autoclave.



5.1.5 RMN

Por meio da interpretação dos gráficos obtidos pela análise de RMN - MAS, não foram encontradas diferenças significantes entre os grupos IM, IG, AU e controle. No entanto, o valor de desvio químico referente a amostra do grupo EO indica uma leve alteração no ambiente químico em torno do átomo P. Esta alteração foi identificada apenas para o grupo OE, tendo sido observado um pequeno aumento na FWHM, indicando uma dispersão nos valores de desvio químico. Os espectros referentes ao ^{31}P obtidos para as amostras referentes a cada grupo experimental e grupo controle podem ser observados na Figura 31.

Figura 31 – Análise RMN do isótopo ^{31}P -MAS. Espectros referentes as amostras dos diferentes grupos.



5.2 Fase 2: Avaliação da influência dos diferentes métodos de esterilização sobre a formação do biofilme *in vitro*

Os resultados obtidos pelos experimentos da Fase 2 foram descritos a seguir.

5.2.1 UFC/mL

De acordo com os resultados obtidos pelo experimento da curva de crescimento dos microrganismos, pode-se afirmar que os inóculos apresentaram valores de UFC/mL de $9,2 \times 10^7$ para o *A. naeslundii* e $1,4 \times 10^8$ para o *S. sanguis*.

As avaliações dos controles negativos e positivos, referentes as três ocasiões em que os experimentos envolvendo análise de UFC/mL, comprovaram a ausência de contaminação nos espécimes, no meio de cultura e na saliva. No caso dos controles negativos, não foi observada a presença de turvação do meio de cultura em todas as ocasiões, indicando a ausência de contaminação da saliva e do meio de cultura. As placas contendo os meios de cultura correspondentes aos plaqueamentos dos controles positivos não apresentaram desenvolvimento de microrganismos, comprovando a efetividade dos métodos de esterilização de esmalte. Da mesma forma, os plaqueamentos referentes às alíquotas de saliva filtrada também não apresentaram desenvolvimento de microrganismos, indicando a ausência de contaminação na saliva.

Os dados referentes a quantificação dos microrganismos viáveis presentes nos biofilmes avaliados nos diferentes grupos experimentais, expressos em Log_{10} são apresentados na Tabela 7.

De acordo com os resultados obtidos, não foram detectadas diferenças estatisticamente significantes entres os grupos com relação ao desenvolvimento dos biofilmes monoespécie *S. sanguis*. A análise dos biofilmes monoespécie *A. naeslundii* detectou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos.

Tabela 7 – Médias UFC/mL, expressas em Log₁₀ (DP), correspondentes aos biofilmes monoespécie e misto de acordo com os diferentes grupos experimentais (n=10).

Biofilme		Grupo				P
		IM	IG	OE	AU	
Monoespécie	<i>S. sanguis</i>	6,56 (0,2) ^A	6,57 (0,4) ^A	6,69 (0,4) ^A	6,79 (0,3) ^A	0,233
	<i>A. naeslundii</i>	6,64 (0,3)^A	6,82 (0,1)^A	7,00 (0,3) ^{A,B}	7,09 (0,2)^B	0,003
Misto	<i>S. sanguis</i>	6,57 (0,3) ^A	6,43 (0,3) ^A	6,45 (0,4) ^A	6,77 (0,3) ^A	0,111
	<i>A. naeslundii</i>	6,83 (0,2)^A	6,74 (0,1)^A	6,77 (0,3) ^{A,B}	7,03 (0,2)^B	0,006

No sentido horizontal, letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Kruskal-Wallis com correção de Bonferroni para 4 grupos, $P < 0,05$).

O grupo AU apresentou valores de UFC/mL significativamente superiores aos do grupo IM e aos do grupo IG. No entanto, o grupo AU não apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo OE. A comparação realizada entre os grupos IM e IG, IM e EO, IG e EO também não apresentou diferença estatisticamente significativa. Os resultados referentes a análise dos biofilmes misto não identificou diferenças entre os grupos quanto a quantificação de *S. sanguis*. Apesar disso, a quantificação de *A. naeslundii* proveniente dos biofilmes misto indicou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos. Foi observado uma quantidade significativamente maior de microrganismos viáveis no grupo AU quando comparado ao grupo IG e ao grupo IM. Apesar disso, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes nas comparações realizadas entre os grupos AU e EO, IM e IG, IM e EO e IG e EO.

5.2.2 XTT

As avaliações dos controles negativos e positivos, correspondentes as três ocasiões em que os experimentos envolvendo ensaio de XTT, comprovaram a ausência de contaminação nos espécimes, no meio de cultura e na saliva. No caso dos controles negativos, não foi observada a presença de turvação do meio de cultura em todas as ocasiões, indicando a ausência de contaminação da saliva e do meio de cultura. Da mesma forma, os plaqueamentos referentes às alíquotas de saliva filtrada também não apresentaram desenvolvimento de microrganismos,

indicando a ausência de contaminação na saliva. A avaliação XTT correspondente aos controles positivos obteve médias de valores de absorvância inferiores a 0,05 nm, indicando a ausência de atividade metabólica e, portanto, efetividade dos métodos de esterilização.

Os valores de DO, expressos em nm, referentes ao ensaio de XTT realizado para análise dos biofilmes nos diferentes grupos experimentais constam na Tabela 8.

Tabela 8 – Médias de absorvância (DP), expressas em nm, obtidas pelo ensaio de XTT, referentes aos biofilmes monoespécie e misto de acordo com os diferentes grupos experimentais (n=10).

Biofilme		Grupo				P
		IM	IG	OE	AU	
Monoespécie	<i>S. sanguis</i>	0,19 (0,1) ^A	0,20 (0,1) ^A	0,20 (0,1) ^A	0,15 (0,1) ^A	0,478
	<i>A. naeslundii</i>	0,14 (0,1) ^A	0,14 (0,1) ^A	0,15 (0,1) ^A	0,13 (0,1) ^A	0,886
Misto	<i>S. sanguis e A. naeslundii</i>	0,28 (0,1) ^{AB}	0,34 (0,1)^A	0,24 (0,1) ^{AB}	0,17 (0,1)^B	0,011

No sentido horizontal, letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Kruskal-Wallis com correção de Bonferroni para 4 grupos, $P < 0,05$).

Os resultados obtidos indicam que a avaliação dos biofilmes referentes as culturas monoespécie de *S. sanguis* e de *A. naeslundii* não detectou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos. Diferenças estatisticamente significantes foram observadas entre os grupos com relação a análise dos resultados correspondentes ao biofilmes mistos. Os valores correspondentes a atividade metabólica dos biofilmes mistos foi significativamente maior no grupo IG quando comparado ao grupo AU. Apesar disso, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes nas comparações realizadas entre os grupos AU e IM, AU e EO, IM e IG, IM e EO e IG e EO.

5.2.3 Cristal Violeta

As avaliações referentes aos controles negativos e positivos, utilizados nas três ocasiões em que os experimentos envolvendo análise de biomassa total, comprovaram a ausência de contaminação nos espécimes, no meio de cultura e na saliva. No caso dos controles negativos, não foi observada a presença de turvação do meio de cultura em todas as ocasiões, indicando a ausência de contaminação da saliva e do meio de cultura. Da mesma forma, os plaqueamentos referentes às alíquotas de saliva filtrada também não apresentaram desenvolvimento de microrganismos, indicando a ausência de contaminação na saliva. A avaliação por meio de cristal violeta correspondente aos controles positivos obteve valores médios de absorbância inferiores a 0,05 nm, indicando a ausência de formação de biomassa e, portanto, efetividade dos métodos de esterilização.

Os valores de DO, expressos em nm, referentes a avaliação de biomassa total realizada nos biofilmes correspondentes aos diferentes grupos experimentais são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 – Médias de absorbância (DP), expressas em nm, obtidas pelo teste Cristal violeta referentes aos biofilmes monoespécie e misto, de acordo com os diferentes grupos experimentais (n=10).

Biofilmes	Grupos				P	
	IM	IG	OE	AU		
Monoespécie	<i>S. sanguis</i>	0,19 (0,1) ^A	0,19 (0,1) ^A	0,22 (0,1) ^A	0,18 (0,1) ^A	0,920
	<i>A. naeslundii</i>	0,27 (0,1) ^A	0,17 (0,1) ^A	0,20 (0,1) ^A	0,18 (0,1) ^A	0,052
Misto	<i>S. sanguis e A. naeslundii</i>	0,24 (0,1) ^{A,B}	0,17 (0,1)^A	0,18 (0,1) ^{A,B}	0,27 (0,1)^B	0,006

No sentido horizontal, letras diferentes indicam diferença estatisticamente significante entre os grupos (Kruskal-Wallis com correção de Bonferroni para 4 grupos, $P < 0,05$).

De acordo com os resultados obtidos, os valores de biomassa correspondentes ao biofilmes monoespécie de *S. sanguis* e de *A. naeslundii* não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos avaliados.

No entanto, diferenças estatisticamente significante foram detectadas entre os grupos experimentais avaliados quanto aos biofilmes mistos. Foi observado que o grupo AU obteve índices de biomassa total significativamente maiores quando comparado ao índice de biomassa obtido pelo grupo IG. Não foram identificadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos AU e IM, AU e EO, IM e IG, IM e EO e EO e IG.

6 DISCUSSÃO

A esterilização dos espécimes dentais deve ser realizada previamente a sua utilização em estudos *in vitro* e *in situ*, não deve danificar a estrutura do esmalte e deve ser realizada respeitando-se, também, as normas éticas locais de cada instituição de pesquisa ⁷⁰. Apesar disso, de acordo literatura, ainda não haviam sido realizados estudos com a finalidade de comparar os diferentes métodos de esterilização IM, IG, OE e AU com relação aos efeitos causados sobre a morfologia, composição química e estrutura do esmalte dental e ainda, sobre o desenvolvimento de biofilmes *in vitro*.

Estudos realizados com a utilização de espécimes dentais provenientes de dentes humanos tem relatado a existência de uma variação inerente na composição química de dentes obtidos de diferentes regiões da cavidade oral e, ainda, de diferentes voluntários ^{64,82}. Para possibilitar a adequada avaliação da composição química do esmalte, a utilização de espécimes provenientes do mesmo tipo de dente e da mesma região da cavidade oral tem sido sugerida ⁸². Visando reduzir a variabilidade da amostra de esmalte e com o objetivo de possibilitar a adequada comparação do efeito de diferentes métodos de esterilização sobre a morfologia, composição química e estrutura do esmalte, um protocolo experimental específico foi delineado, no qual todos os grupos apresentaram espécimes provenientes da mesma amostra de dentes.

Tendo em vista a homogeneidade do esmalte bovino quando comparado ao esmalte humano ^{64,91}, o presente estudo avaliou espécimes de esmalte provenientes de dentes bovinos. Adicionalmente, a superfície do esmalte foi preservada em todos os espécimes utilizados nas análises químicas, uma vez que não foram realizados procedimentos de polimento na superfície do esmalte. Finalmente, para cada grupo, os mesmos espécimes foram utilizados nas cinco avaliações realizadas (XPS, Raman, MEV, EDS e RMN).

A avaliação por meio de MEV é uma técnica amplamente utilizada em pesquisas envolvendo a caracterização da superfície de diversos materiais e, na área de Odontologia, tem sido utilizada na avaliação da morfologia do esmalte dental ⁶¹, tendo a análise por MEV sido escolhida por este estudo para a avaliação do esmalte nas regiões de superfície e em secção transversal. No presente estudo, as

características morfológicas observadas nos espécimes provenientes do grupo controle estão de acordo com as características observadas em espécimes de esmalte referentes aos grupos controle (sem tratamento) em estudos que utilizaram esmalte bovino⁸¹ e esmalte humano⁶¹.

De acordo com a avaliação morfológica do esmalte realizada nos espécimes submetidos aos procedimentos de esterilização, foi observado que a esterilização por meio de IG não promoveu alterações no esmalte, tanto na avaliação da superfície quanto na avaliação em profundidade. A irradiação gamma é considerada um método de esterilização eficiente e que não promove alterações na microdureza superficial e na resposta a desmineralização do esmalte^{1,2,7,9,60}. Embora uma alteração visível na coloração dos espécimes tenha sido observada após o processo de esterilização por meio de irradiação gamma, não foram realizados testes específicos para aferição dessa alteração. O efeito de escurecimento do esmalte após a exposição à irradiação gamma tem sido descrito como dose-dependente, de maneira que a utilização de doses de irradiação superiores a 4,08 kGy tem sido associada à ocorrência de alteração na coloração do esmalte^{3,60}.

Os resultados obtidos para os espécimes provenientes do grupo IM indicaram a ocorrência de apenas pequenas alterações na superfície do esmalte, não tendo sido observadas alterações morfológicas em secção transversal. Foi observada a presença de microtrincas e exposição de alguns prismas de esmalte após o processo de irradiação por micro-ondas, entretanto, nenhum outro sinal de alteração pôde ser detectado. Em um estudo prévio, a irradiação por micro-ondas durante 3 min a 650 W mostrou-se efetiva para a completa desinfecção de espécimes de esmalte bovino, não promovendo alterações na microdureza superficial e na microdureza em profundidade do esmalte hígido, desmineralizado e remineralizado⁷⁹. Os efeitos deste método sobre a superfície do esmalte foram muito similares ao grupo IG, tendo sido observadas apenas pequenas alterações na morfologia superficial, como a presença de alguns prismas expostos e algumas microtrincas. Aparentemente, a temperatura atingida durante o processo de irradiação por micro-ondas não foi suficiente para causar danos mais extensos⁷⁹.

Os espécimes do grupo OE apresentaram maior dano a superfície do esmalte quando comparados aos espécimes provenientes dos grupos controle, IG e IM. Embora a presença de trincas e prismas expostos tenha sido maior nos

espécimes do grupo OE, nenhuma alteração pôde ser observada na avaliação das micrografias de secção transversal. De acordo com estudos de desmineralização e remineralização, os efeitos causados pela esterilização de esmalte por meio de OE tem sido descritos como pequenos e não significantes^{78,84,86}.

Por outro lado, alterações significativas puderam ser observadas nos espécimes referentes ao grupo AU. As alterações observadas após o processo de esterilização por autoclave foram uma combinação de prismas expostos, áreas de rugosidade e trincas ao longo de toda a superfície do esmalte. A avaliação das micrografias de secção transversal revelou, ainda, que áreas de rugosidade puderam ser observadas em profundidade. Dessa forma, as alterações morfológicas induzidas pelo processo de esterilização em AU não estão restritas apenas a superfície do esmalte e podem ser consideradas mais agressivas quando comparadas aos demais métodos avaliados no presente estudo. Amaechi et al.² [1998] relatou que o procedimento de esterilização em autoclave, apesar de não ter aumentado a profundidade das lesões artificiais de cárie, promoveu uma alteração na aparência da superfície do esmalte. Adicionalmente, diversos autores tem sugerido que o processo de esterilização em autoclave pode causar danos ou alterações a estrutura do esmalte^{1,2,9,18,20,39,43,72,84,86}, entretanto, esta é a primeira vez que uma alteração significativa na morfologia do esmalte foi demonstrada.

Resultados contraditórios tem sido relatados em relação ao procedimento de esterilização em autoclave. A utilização dos protocolos de esterilização de 121°C por 20 min ou de 132°C por 10 min não mostraram alterações morfológicas significativas no esmalte quando comparados ao controle não esterilizado^{9,68}. Entretanto, a avaliação morfológica foi realizada em baixo aumento (500×). O efeito da autoclave sobre a estrutura do esmalte pode ser atribuído às condições a que os espécimes são submetidos durante o processo de esterilização⁹, onde a combinação de umidade, calor, pressão e o processo de secagem podem ser os responsáveis pelas alterações morfológicas observadas que, no presente estudo, são semelhantes àquelas de um outro estudo, produzidas no esmalte irradiado pelo laser Er:YAG⁶¹.

Considerando que o diâmetro médio do *Streptococcus mutans* é 0,321 ± 0,007 µm, as dimensões das trincas, das áreas de rugosidade e dos prismas expostos podem ser considerados locais favoráveis para o acúmulo de bactérias cariogênicas como o *S. mutans*⁶¹. Portanto, as alterações morfológicas observadas

na superfície do esmalte esterilizado por meio de AU podem influenciar os resultados dos estudos que tem por objetivo avaliar o desenvolvimento de biofilmes cariogênicos *in vitro* e *in situ*. Além disso, as trincas presentes na superfície de esmalte podem agir como pontos de fragilidade, promovendo áreas mais susceptíveis ao ataque ácido, favorecendo a desmineralização em profundidade no caso de estudos que promovem ciclagens de pH. Considerando os resultados obtidos, estudos futuros são ainda necessários para detalhar os efeitos dos métodos de esterilização sobre a estrutura morfológica do esmalte bovino.

O conteúdo mineral do esmalte, assim como a concentração de alguns elementos, difere quando a superfície externa é comparada as porções mais profundas do esmalte. A densidade do esmalte, bem como as concentrações de cálcio, fosfato e de flúor diminuem da superfície externa do esmalte em direção à dentina, enquanto as concentrações de magnésio, carbonato e cloro aumentam na mesma direção ⁸². A técnica de EDS é considerada um método de análise de volume, cujo alcance abrange as camadas mais profundas do esmalte, tendo sido utilizada no presente estudo para a avaliação qualitativa da composição elementar da subsuperfície esmalte. É válido ressaltar que não existem na literatura relatos prévios da determinação da composição química elementar do esmalte após a realização de procedimentos de esterilização. Os resultados das análises EDS mostraram que a composição química dos espécimes de esmalte foi semelhante entre os grupos avaliados, de maneira que C, O, Ca e P foram detectados como sendo os principais elementos presentes em todos os espécimes avaliados.

O valor referente a razão Ca/P tem sido considerado como um indicador do grau de mineralização do esmalte ²³. Na hidroxiapatita pura $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, o valor da razão Ca/P é de aproximadamente 1,67, no entanto, devido a presença de impurezas ou substituições presentes no esmalte dental, valores de razão Ca/P de 1,48 a 1,41 tem sido relatados para espécimes de esmalte ^{44,47,75}. Considerado, também, como um componente de grande importância na constituição do esmalte, o carbonato pode influenciar a forma e o tamanho dos cristais de hidroxiapatita, assim como as propriedades mecânicas do esmalte ^{44,88}. Além disso, a razão CO_3/P tem sido considerada um indicador da susceptibilidade do esmalte ao ataque ácido durante o processo de formação da cárie ⁸⁷.

A presença de valores reduzidos de Ca/P na superfície do esmalte dental tem sido atribuída a diversos fatores, dentre eles, a adsorção de fosfatos a

superfície dos cristais, substituição de Ca^{+2} por Na^+ e Mg^{+2} , ou à incorporação de outros elementos considerados impurezas⁷⁶. A conformação estrutural da apatita pode ser modificada por diferentes substituições de íons⁷⁵, podendo ser citados como exemplos CO_3^{-2} por PO_4^{-3} e OH^- , Na^+ por Ca^{+2} , SiO_4^- por PO_4^{-3} e F^- por OH^- ⁷⁵. Os resultados de XPS obtidos pelo presente estudo corroboram com estudos prévios^{75,44}, onde os elementos detectados em maiores concentrações foram O, C, Ca, P e N. Entretanto, conforme relatado por Lou et al.⁴⁴ [2008], torna-se difícil realizar comparações diretas quando a composição química é apresentada em valores de porcentagem e o número total de elementos detectados difere entre os estudos. Assim, com exceção dos estudos que avaliaram o mesmo número de elementos, a proporcionalidade de cada elemento pode variar entre os estudos⁴⁴.

Os resultados obtidos por meio das análises XPS possibilitaram a avaliação quantitativa das alterações presentes na composição química elementar do esmalte pré e pós-esterilização. Durante a avaliação pré-esterilização de todos os componentes identificados, incluindo CO_3 e as razões CO_3/P e Ca/P , não foram detectadas diferenças significantes entre os grupos, exceto para o elemento N, que apresentou menor concentração no grupo autoclave em relação aos demais grupos. Tal diferença não foi observada após os procedimentos de esterilização. Dessa forma, a composição química elementar dos espécimes de esmalte que constituíram a amostra utilizada pode ser considerada homogênea.

Durante a análise estatística inicial, não foram detectadas diferenças significantes na concentração atômica de cada elemento avaliado entre grupos pré e pós-esterilização. Visando avaliar se o comportamento de um grupo, antes e após tratamento, foi diferente do comportamento do outro grupo, o efeito da interação entre grupo e tempo também foi verificado.

A razão Ca/P obtida para os espécimes de esmalte variou de 1,35 a 1,40 não apresentando diferenças significantes entre os grupos antes dos procedimentos de esterilização. No entanto, após os procedimentos de esterilização, os valores referentes a razão Ca/P apresentaram efeito de interação grupo x tempo, de maneira que o grupo IG apresentou valores significantemente maiores de Ca/P que os grupos AU e IM.

Quando as concentrações dos demais elementos foram avaliadas quanto ao efeito de interação grupo x tempo pós-esterilização, os grupos AU e IG apresentaram diferenças significantes para os elementos Ca, P e O. Valores

significativamente menores de Ca, P e O puderam ser observados no grupo AU quando comparado ao grupo IG. Valores menores de O também puderam ser observados no grupo IM quando comparado ao grupo IG. O grupo OE também apresentou valores reduzidos de O quando comparado ao grupo IG. As comparações entre os demais grupos e demais elementos não indicaram efeitos de interação significantes na avaliação pós-esterilização.

Para o grupo IG, não foram observadas alterações na composição elementar, assim como nos valores de concentração atômica de CO_3 e nas razões CO_3/P e Ca/P . Estes resultados demonstram que o processo de esterilização por meio de irradiação gamma preserva a composição original do esmalte. Embora este método não produza nenhuma alteração significativa na composição química elementar superficial, uma alteração de cor, com escurecimento do esmalte foi observada nos espécimes após o processo de irradiação. Apesar disso, deve ser destacado que a análise por meio de XPS permite detectar apenas a região mais superficial da estrutura do esmalte (~ 5 nm profundidade). Os raios gamma apresentam elevados índices penetração nos espécimes irradiados e, é possível que, os efeitos presentes na região de subsuperfície, região de maior conteúdo orgânico, podem não ter sido detectados por meio das técnicas XPS.

O efeito da irradiação gamma sobre as proteínas colágenas tem sido descrito^{38,81}, de maneira que, devido ao direto efeito do processo radiação ionizante, o colágeno pode ser danificado por quebras nas cadeias de polipeptídios, predominantemente quando o colágeno foi irradiado em condições com ausência de umidade. Porém, quando o colágeno foi irradiado na presença de água, um efeito indireto da irradiação gamma pode ocorrer por meio de uma reação do tipo cruzada^{38,81}. Apesar disso, as técnicas de análise utilizadas no presente estudo não foram capazes de detectar nenhum efeito da irradiação gamma na composição química elementar do esmalte.

Na avaliação pré e pós-esterilização, a ocorrência de aumento nas concentrações de N foi observada por meio da análise XPS após a esterilização dos espécimes dos grupos IM e AU. Tais alterações podem ser atribuídas a alguma influência sobre a matriz orgânica do esmalte. Após os procedimentos de esterilização, aumentos de 33% e 75% foram observados nas concentrações de N dos grupos IM e AU, respectivamente. Valores de concentração de N aumentados

em mais de 200% foram relacionados a exposição de componentes orgânicos na superfície do esmalte bovino após tratamento com H₂O₂ por 60 min⁶⁴.

O padrão de distribuição das proteínas no esmalte apresenta uma correlação inversa com as concentrações de cálcio e fósforo, de forma que as variações no conteúdo proteico poderiam ser associadas à variações distintas observadas nas porcentagens de cálcio e de fosfato⁵⁹. Este fenômeno pode ser observado por meio dos efeitos ocorridos nos espécimes do grupo IM, cujas concentrações de Ca e P reduziram significativamente 15% e 11%, respectivamente e nos espécimes do grupo AU, que apresentou redução significativa de 18 % na concentração de cálcio. Apesar disso, o processo de irradiação por micro-ondas não se mostrou tão agressivo quanto aqueles procedimentos de clareamento dental⁶⁴, cujos índices de alteração incluíram aumento de P em 19% e redução de Ca em 5%. Por outro lado, as presentes alterações observadas no conteúdo orgânico do esmalte são um indicativo de que algum dano ocorreu nos espécimes irradiados por meio de micro-ondas e autoclave.

Conforme descrito anteriormente, o processo de esterilização em autoclave submete os espécimes de esmalte a condições umidade sob elevadas temperatura e pressão, que podem atuar como responsáveis pelas alterações observadas na composição química elementar da superfície do esmalte. O efeito da irradiação por micro-ondas sobre os a concentração de elementos presentes em componentes orgânicos e inorgânicos do esmalte pode ser atribuído a uma combinação de efeitos térmicos e não térmicos, que são proporcionais ao tempo de exposição^{5,62}.

O processo de irradiação por micro-ondas durante 3 min a 70% de potência de 650 W, consiste em aproximadamente 2,1 min de efetiva irradiação intermitente. Isso significa que durante 0,9 min de todo o processo, nenhuma irradiação de micro-ondas foi aplicada sobre os espécimes de esmalte, indicando que as variações ambientais ocorridas durante o processo de irradiação não são tão severas quanto àquelas presentes no processo de esterilização em autoclave.

Também é importante mencionar que o tempo de radiação ligada/desligada durante o processo de irradiação por micro-ondas é eletronicamente controlado pelo circuito do aparelho de micro-ondas. Se os efeitos das micro-ondas sobre os componentes orgânicos e inorgânicos são de natureza térmica ou não térmica e, ainda, quais implicações específicas destes efeitos sobre

a cristalinidade do esmalte são questões que devem ser esclarecidas em estudos futuros.

A avaliação pré e pós-esterilização referente aos grupos OE e IM, foi observado aumento significativo nas concentrações de C em 9% e 20%, respectivamente. Os grupos OE e IM apresentaram, ainda, redução significativa de 6% e 10% na concentração de O, respectivamente. Carbono e oxigênio tem sido relacionados tanto a composição orgânica quanto a composição inorgânica do esmalte ^{44,47}. Os picos atribuídos a estes dois elementos, em conjunto, são C-O e CO₃, os quais são característicos da composição específica do esmalte. Os componentes puramente inorgânicos da apatita presente no esmalte (Ca e P), parecem ter sido relativamente menos influenciados pela esterilização por meio de óxido de etileno, uma vez que o P não apresentou alteração neste grupo e a redução de Ca, apesar de significativa, foi de apenas 4%. Com relação aos elementos C e O, que apresentam-se em componentes orgânicos, uma maior quantidade deles parece ter sido removida como resultado da utilização do processo de esterilização por óxido de etileno.

Embora não tenham sido observadas alterações na resposta a desmineralização e na microdureza superficial do esmalte após esterilização com óxido de etileno ^{1,2,3,9}, os presentes resultados devem ser considerados como um indicativo de que este método de esterilização pode promover alguma alteração nos componentes do esmalte. O óxido de etileno é considerado um agente alquilante altamente reativo e amplamente utilizado em processos de síntese química, de esterilização e em processos de fumigação ⁴⁹. O processo de esterilização não é realizado sob condições de completa falta de umidade (condições anidras), principalmente em sistemas do tipo sem evacuação. Na prática, algum teor de vapor está presente no ar ao redor do material a ser esterilizado. Dessa forma, os espécimes são submetidos a um teor de umidade que varia com a umidade relativa da atmosfera gerada no equipamento, sendo estas condições mantidas por todo o processo de esterilização.

Além da importância das condições de umidade atmosférica durante o processo de exposição ao óxido de etileno, as condições de umidade a que os espécimes e, conseqüentemente, os microrganismos são submetidos previamente ao processo de exposição ao OE são consideradas ainda mais relevantes ²⁴. Os mecanismos específicos que poderiam explicar as alterações ocorridas no esmalte

após a esterilização por óxido de etileno, observadas no presente estudo, ainda precisam ser detalhadamente esclarecidos por meio de outros estudos, entretanto, os resultados apresentados são um indicativo de que alguma alteração ocorreu no esmalte dental.

As condições ambientais durante o processo de esterilização por OE incluem variações de temperatura de 45 a 55°C, que não podem ser consideradas, unicamente, como agressivas. As variações nas condições ambientais envolvidas nos processos de pré e pós-exposição ao gás, entretanto, incluem variações nas condições de umidade que, associadas a variação de temperatura, poderiam ser consideradas responsáveis pelas alterações químicas observadas no esmalte.

Apesar das alterações observadas nos demais elementos identificados pela análise XPS, não foram detectadas alterações nas concentrações de carbonato, assim como de CO_3/P . A estrutura da hidroxiapatita pode conter íons carbonato em dois locais, de forma que, ou substituem os íons OH^- (tipo A), ou substituem íons PO_4^{-3} (tipo B) ⁷⁵. Ao substituir os grupos fosfato, o carbonato atua como um componente crucial para os cristais de hidroxiapatita, resultando em alterações na conformação estrutural e sendo associado a alterações nas propriedades físicas como o aumento da solubilidade ⁸⁸. O conteúdo de carbonato no esmalte varia de 2 a 5 %, sendo considerado maior que o conteúdo de material orgânico e de magnésio e, atuando como um importante substituto na estrutura cristalina do esmalte dental ⁸⁸.

As propriedades mecânicas do esmalte dental apresentam uma correlação direta com a composição elementar e o potencial associado aos efeitos do carbonato não devem ser subestimados. A correlação do conteúdo de carbonato com as propriedades mecânicas do esmalte tem sido descrita, de forma que, o aumento no conteúdo de carbonato tem sido associado a diminuição da cristalinidade, da dureza e do módulo de Young ⁸⁸. Dessa forma, é interessante observar que apesar das demais alterações detectadas, os níveis de carbonato e de CO_3/P foram mantidos inalterados em todos os grupos avaliados.

As propriedades mecânicas do esmalte também tem sido relacionadas aos conteúdos de Ca e P, de maneira que a diminuição nas concentrações destes componentes são associadas a diminuição nas propriedades mecânicas ⁸⁸. Considerando as avaliações pré e pós-esterilização, reduções significantes nos valores de Ca/P puderam ser observadas nos grupos IM e AU. Tais resultados são

um indício de que uma remoção seletiva de material inorgânico ocorreu na superfície do esmalte dos espécimes esterilizados por meio de autoclave e daqueles submetidos à irradiação por micro-ondas.

O conteúdo mineral do esmalte tem sido relacionado a densidade dos cristais/prismas, que, por sua vez, é considerada não uniforme⁵⁸. A maior parte da fase mineral do esmalte é considerada como sendo formada por hidroxiapatita substituída, entretanto, outras fases minerais tem sido descritas, particularmente em relação a ambos componentes magnésio e carbonato. Tais componentes podem estar concentrados na interface entre os prismas ou na superfície dos cristais, possivelmente como resultado do processo de recristalização ocorrido durante a fase de desenvolvimento do esmalte⁵⁸. Em regiões de trincas, uma estrutura prismática extremamente complexa tem sido descrita, incluindo um arranjo prismático deficiente, baixo teor mineral e alto conteúdo de proteínas e, portanto, maior porosidade⁵⁸.

As trincas observadas ao longo da superfície do esmalte dos espécimes autoclavados e, em menores proporções, para os espécimes esterilizados por óxido de etileno e por meio de irradiação por micro-ondas, podem atuar como canais para o processo de transferência de íons e facilitar o deslocamento de íons provenientes das camadas mais internas do esmalte¹¹. Apesar da ligação existente entre Ca-CO₃ ser considerada fraca⁴⁴, o processo de esterilização em autoclave, com elevadas temperatura e pressão, não promoveu substituição ou perda de carbonato presente nos cristais de hidroxiapatita localizados na superfície do esmalte.

Variações de temperatura entre 300 a 600°C resultam em um diminuição do tipo B de carbonato e o tratamento com temperatura de 900°C promove a redução de ambos, carbonatos do tipo A e B²². No presente estudo, não foi observada diminuição na concentração de carbonato nos espécimes submetidos a esterilização por AU. É provável que a exposição dos espécimes de esmalte a condições de temperatura de 121°C durante 30 min sob pressão de 15 libras não sejam suficientes para promover tal efeito.

O aumento na resistência a desmineralização tem sido relacionado a diminuição no conteúdo de carbonato, no entanto, o presente estudo não realizou avaliações das propriedades mecânicas ou de solubilidade, as quais poderiam indicar se tais propriedades foram afetadas pelos processos de esterilização.

Estudos futuros são necessários para esclarecer os mecanismos envolvidos nas alterações de composição química observadas no presente estudo.

A análise por meio de espectroscopia Raman tem sido utilizada para a caracterização da estrutura química/molecular de diversos materiais e tecidos e tem se mostrado cada vez mais importante em pesquisas da área médica, devido a sua elevada especificidade bioquímica⁸³. A análise Raman também tem se mostrado uma ferramenta valiosa para o estudo do esmalte dental, pelo fato de manter os espécimes intactos após a análise, possibilitando a realização de outros testes e, ainda, a realização de medidas repetidas no mesmo espécime, como é necessário em estudos de desmineralização/remineralização⁸⁷.

Em análises realizadas em esmalte, o pico localizado em 960 cm^{-1} tem sido atribuído ao grupo fosfato ν_1 e o pico presente em 1070 cm^{-1} tem sido atribuído modo vibracional 1 do grupo carbonato (carbonato do tipo B). Estudos utilizando hidroxiapatita, tem sugerido que mesmo pequenos níveis de alteração na composição química (por exemplo substituição por carbonato) podem induzir alterações na largura e na posição dos picos presentes no espectro Raman, principalmente no caso dos modos ν_1 e ν_3 do fosfato⁵⁶.

Da mesma forma, as intensidades dos picos carbonato e fosfato têm tido valores maiores atribuídos a superfície externa do esmalte, enquanto intensidades menores tem sido encontradas nas porções mais internas do esmalte, indicando uma redução no grau de cristalinidade da hidroxiapatita⁸⁸. Alterações ocorridas nas intensidades dos picos presentes no espectro Raman tem sido, ainda, associadas a alterações na orientação dos cristalitos do esmalte⁸⁷.

De acordo com os resultados obtidos pela análise dos espécimes, foi possível identificar os picos característicos do esmalte dental, incluindo um pico de alta intensidade na região de 960 cm^{-1} , referente ao fosfato ν_1 e, ainda, PO_4^{-3} ν_2 , ν_3 e ν_4 e CO_3^{-2} ν_1 com menores intensidades⁸⁷. Estes picos foram identificados em todos os espécimes avaliados, tanto nas análises pré-esterilização quanto nas análises realizadas pós-esterilização. Devido a baixa intensidade apresentada pelo componente fosfato ν_3 (1046 cm^{-1}), este não foi considerado no momento do cálculo das áreas integradas dos picos⁸³.

Durante a análise estatística inicial dos dados Raman, cada razão foi avaliada entre grupos pré e pós-esterilização. Por meio desta análise, diferenças significativas foram observadas apenas para a razão PO_4^{-3} ν_4 (2)/ PO_4^{-3} ν_1 , nos

grupos IM e AU, que apresentaram, respectivamente, aumento e redução significativa nestes valores. O efeito da interação entre grupo e tempo também foi verificado, com o objetivo de avaliar se o comportamento de um grupo, antes e após tratamento, foi diferente do comportamento do outro grupo.

Na avaliação pré-esterilização dos efeitos significativos de interação grupo x tempo, os valores referentes a razão fosfato ν_4 (1)/ fosfato ν_1 foram significativamente menores no grupo AU quando comparado aos grupos IM e IG. Apesar desta diferença, durante a avaliação dos efeitos de interação grupo x tempo pós-esterilização, a comparação entre os grupos indicou que este componente apresentou valores significativamente menores no grupo OE quando comparado ao grupo IG. A diferença observada nos valores do componente fosfato ν_4 (1)/ fosfato ν_1 indica comportamento distinto dos espécimes de esmalte esterilizados pelos métodos IG e OE. Considerando a avaliação dos efeitos pré e pós-esterilização de cada grupo, apenas os valores de fosfato ν_4 (1)/ fosfato ν_1 apresentaram redução significativa, observada nos grupos OE e IM.

A avaliação da razão fosfato ν_4 (2)/ fosfato ν_1 , não identificou efeitos de interação grupo x tempo tanto nas comparações pré-esterilização quanto nas comparações pós-esterilização. Apesar disso, a avaliação pré e pós-esterilização para a razão fosfato ν_4 (2)/ fosfato ν_1 , em cada grupo, indicou aumento significativo para o grupo IM e redução significativa no grupo AU.

A avaliação da razão fosfato ν_4 (3)/ fosfato ν_1 indicou diferença significativa entre os grupos IG e AU, de maneira que o grupo AU apresentou valores reduzidos deste componente quando comparado ao grupo IG tanto antes quanto após a esterilização. Os resultados observados para os compostos fosfato ν_4 (1), fosfato ν_4 (2) e fosfato ν_4 (3) indicaram uma possível redução dos componentes inorgânicos do esmalte após a esterilização por autoclave e por óxido de etileno e, ainda, uma provável substituição de fosfato ν_4 (1) por fosfato ν_4 (2) no grupo IM. O Grupo IG não apresentou alterações nos compostos avaliados, indicando uma estabilidade deste método quanto a manutenção da composição química e estrutura do esmalte.

Alterações presentes no componente fosfato ν_4 podem ser relacionadas às distorções triplas no modo flexional do O-P-O ou também chamado de modo de flexão do PO_4^{-3} . As intensidades relativas dos picos referentes ao

fosfato ν_4 tem sido associadas a cristalinidade do cristal apatita, de maneira que quanto maior a organização do cristal, maior a intensidade destes picos ⁴. As reduções observadas nos valores de área dos picos PO_4^{-3} ν_4 referentes aos grupos AU e EO podem ser um indicativo de que a cristalinidade do esmalte sofreu um pequeno grau de alteração após os procedimentos de esterilização por estes métodos. Da mesma forma, a ausência de alterações no grupo IG indica a manutenção da organização cristalina do esmalte.

Com relação à razão fosfato ν_2 (1)/ fosfato ν_1 , diferenças significativas entre grupos foram observadas, de maneira que o grupo IM apresentou valores significativamente maiores quando comparado aos grupos IG e AU. Vale destacar que, enquanto os grupos IM e IG apresentaram aumento, o grupo AU apresentou redução nos valores da razão fosfato ν_2 (1)/ fosfato ν_1 . Este resultado pode ser um mais um indício da perda de PO_4^{-3} no esmalte esterilizado por meio de AU.

A redução do pico fosfato ν_1 tem sido observada em estudos avaliando lasers ^{17,42} e tem sido atribuída desmineralização do esmalte. Apesar disso, não foram observadas alterações relacionadas a este modo vibracional do fosfato no presente estudo. Com relação ao carbonato, diferenças significativas entre pré e pós-esterilização foram observadas apenas quando os grupos avaliados foram considerados como um único grupo. Sendo assim as alterações observadas no componente carbonato podem ser consideradas discretas e não significativas entre os grupos.

Alterações relacionadas ao fosfato ν_1 influenciam as ligações do tipo P-O simétricas, também conhecidas como modo de estiramento simétrico total do grupo PO_4^{-3} tetraédrico ²³. No presente estudo, o componente fosfato ν_1 foi utilizado como pico de referência, não tendo sido utilizado isoladamente como parâmetro de comparação. As alterações observadas no grupo IM, com redução significativa de fosfato ν_4 (1), aumento significativo de fosfato ν_4 (2) e valores maiores de fosfato ν_4 (3) em relação aos grupos IG e AU podem ser um indicativo da ocorrência da substituição de fosfato ν_4 (1) por fosfato ν_4 (2) e/ou (3), com algum nível de redução na cristalinidade da apatita.

Não foram identificados indícios de incorporação de carbonato na estrutura da apatita para quaisquer grupos. O fato de não terem sido observadas diferenças significantes nos valores relativos a razão carbonato ν_1 / fosfato ν_1

indicam que não ocorreram alterações estruturais significativas nos espécimes esterilizados pelos métodos avaliados. O aumento de carbonato tem sido relacionado a alteração na estrutura física e na estabilidade química, promovendo alterações como a expansão ou contração do eixo estrutural da apatita, no caso das substituições do tipo A e B, respectivamente. No esmalte dental, aproximadamente 11% das substituições por carbonato são do tipo A, enquanto as do tipo B abrangem 89% dos reposicionamentos de íons ⁷³. Os presentes resultados estão de acordo com estes relatos, uma vez que o pico CO_3^{2-} ν_1 em 1070 cm^{-1} tem sido atribuído ao carbonato tipo B ⁸⁷.

O presente estudo não realizou testes para avaliar se a solubilidade do esmalte em meio ácido foi comprometida. Relatos da literatura sugerem que o aumento de carbonato está relacionado com o aumento da susceptibilidade ao desenvolvimento de cáries e erosão dental ⁷⁴. Baixos níveis de carbonato tem sido associados a menor solubilidade e maior resistência ao ataque ácido produzido pelo processo de formação da cárie, por outro lado, o aumento na concentração de carbonato tem sido relacionado a uma diminuição na dureza e na cristalinidade do esmalte ⁸⁸. O presente estudo não observou alterações estatisticamente significativas nos índices de carbonato entre os grupos avaliados, indicando que não ocorreu desmineralização significativa na superfície do esmalte. Apesar disso, mais estudos são necessários para avaliar se as alterações no conteúdo de fosfato apresentadas pelo presente estudo são suficientes para promover alterações na solubilidade do esmalte em meio ácido.

Também deve ser considerado o fato de que, apesar das alterações detectadas pelo cálculo das áreas dos picos, existem indicativos de que a estrutura do esmalte não foi severamente comprometida, uma vez que os espectros obtidos pré e pós-esterilização para cada grupo avaliado são muito semelhantes, de tal modo que todos os picos identificados na análise pré-esterilização estavam presentes na análise pós-esterilização e, ainda, não foram identificados novos picos após os procedimentos de esterilização ^{17,42,67}.

O deslocamento dos picos em 4 cm^{-1} observado nos espécimes submetidos, também, a análise por XPS, pode ser atribuído a um efeito adverso da técnica, que utiliza fonte de raios X. Este efeito se mostrou mais pronunciado na superfície dos espécimes do que os próprios procedimentos de esterilização.

Estudos complementares devem ser realizados com o objetivo de esclarecer este efeito causado pela técnica de XPS.

Composto basicamente por hidroxiapatita carbonada, o esmalte dental contém em sua estrutura grupos fosfato, carbonato e hidroxila. O esmalte apresenta um elevado grau de ressonância, caracterizado por bandas de absorção na região do infravermelho⁵¹. Um pico de ressonância centrado em 2,7 ppm, característico do grupo PO_4^{-3} na fase cristalina da hidroxiapatita, tem sido observado em espécimes de esmalte dental⁶³. De acordo com a literatura, a incorporação de íons carbonato a hidroxiapatita pode promover o deslocamento químico do ^{31}P ⁵³. A ocorrência de um pico de ressonância centrado em 2,9 ppm tem sido atribuída a carbonatoapatita⁷⁶.

Por meio dos resultados obtidos pela análise de RMN, as amostras referentes aos grupos controle, IG, IM e AU apresentaram picos de ressonância centrados em 2,7 ppm, característicos do grupo fosfato da fase cristalina da hidroxiapatita. No entanto, a análise da amostra referente ao espécime esterilizado por meio de OE apresentou um desvio químico, tendo sido o pico de ressonância centrado em 2,9 ppm. O valor de desvio químico da amostra submetida a esterilização por meio de OE indica uma leve alteração no ambiente químico em torno do átomo P. Tal alteração tem sido relatada para a largura meia altura (FWHM), da fase cristalina da hidroxiapatita relacionada a carbonatoapatita⁵³. Somente a amostra esterilizada por OE apresentou um pequeno aumento na FWHM, indicando uma dispersão nos valores de desvio químico.

Devido ao elevado poder de penetração do óxido de etileno no esmalte, esta dispersão pode estar associada ao grau de substituição dos grupos carbonato na hidroxiapatita, promovendo um aumento na interação com o esmalte. Em carbonatoapatitas do tipo B, tem sido observado que a substituição dos íons PO_4^{-3} por CO_3^{-2} , está associada a substituição de íons Ca^{+2} por Na^+ . Tais substituições tem sido relacionadas a alterações na morfologia e tamanho do cristal, assim como aumento da solubilidade do esmalte em meio ácido^{21,76}. Estas interações podem ocorrer por meio da interação química entre os grupos fosfatos da superfície com a água adsorvida ou, ainda, devido a formação de grupos hidroxilas⁶. A utilização de óxido de etileno pode promover o aparecimento de camada interfacial de água estável e influenciar as características de superfície³³.

Nas amostras correspondentes aos espécimes submetidos aos demais métodos de esterilização, não foram detectados desvios químicos, indicando que os

possíveis efeitos promovidos por estes métodos sobre a estrutura devem estar restritos a superfície, conforme observado pela análise Raman. As alterações estruturais observadas na amostra referente ao grupo OE são um indicativo de que este método promoveu uma alteração estrutural no esmalte. No entanto, mais estudos são necessários para detalhar os mecanismos envolvidos nas alterações estruturais observadas pelo presente estudo.

A formação do biofilme dental inicia-se instantaneamente após a higienização oral, por meio da adsorção de componentes salivares a superfície do esmalte, seguida pela adesão do microrganismos colonizadores iniciais, que por sua vez propiciam a adesão dos demais microrganismos que constituem o biofilme dental. Os mecanismos envolvidos no processo de adesão consistem em ligações físico-químicas e moleculares entre os microrganismos e o esmalte. Conhecidas também como ligações inespecíficas, as ligações físico-químicas iniciam-se pela atração inicial entre microrganismos e superfície, seguida de adesão e, posteriormente, conexão.

Devido a presença dos grupos fosfato na constituição da hidroxiapatita, o esmalte dental apresenta uma força de atração predominantemente negativa. Sobre esta superfície, se forma uma camada de hidratação, composta por íons cálcio de carga positiva. Sobre esta camada, por sua vez, componentes salivares e microbianos são adsorvidos por meio forcas físicas, como as gravitacionais e forcas de Van der Waals e, ainda, por meio de interações hidrofóbicas.

As interações moleculares, também conhecidas como específicas, ocorrem logo após a interação inespecífica. Neste momento, estruturas presentes nos microrganismos como cápsula, pili, fímbrias e adesinas interagem com a película adquirida formada no substrato por meio de proteínas salivares como as mucinas, glicoproteínas, aglutininas e ainda, com receptores polissacarídeos provenientes de vários tecidos presentes na cavidade oral e em outros microrganismos ³⁶. Este processo promove uma conexão seletiva que acarreta na firme adesão dos microrganismos ao substrato. A ocorrência destes eventos caracteriza a fase de formação do biofilme ³³.

Os microrganismos que iniciam a adesão são constituídos, principalmente, por bactérias gram positivas, que incluem *Actinomyces naeslundii* e *Streptococcus sanguis* ³⁶. O *A. naeslundii* tem sido descrito por apresentar o receptor fimbria tipo 1, que parece mediar a adesão à película salivar. A adesina

SsaB, atribuída ao *S. sanguis* tem sido relatada como responsável pela sua congregação com o *A. naeslundii*³⁶. Os polissacarídeos presentes na parede celular do *S. sanguis* também tem sido descritos como receptores de congregação³⁶. Um estudo realizado com diversos microrganismos observou que a adesão *A. naeslundii* e *S. sanguis* à película adquirida formada sobre o esmalte foi superior a adesão de outros microrganismos como o *S. mutans*.

A fase de adesão dos microrganismos e formação inicial do biofilme pode ser influenciada por fatores como as propriedades inerentes ao microrganismos, fatores ambientais e pelas características superficiais do substrato³³. Dentre os fatores que podem influenciar as características superficiais do substrato no momento da adesão dos microrganismos, podem ser citadas composição química, energia livre de superfície, hidrofobicidade, rugosidade superficial e morfologia. Alguns autores relataram que superfícies rugosas parecem promover índices maiores de formação e maturação do biofilme e superfícies com elevada energia livre de superfície tem sido relacionadas ao maior acúmulo de biofilme e maior força de adesão dos microrganismos. Apesar destes dois fatores apresentarem interação, tem sido sugerido que a rugosidade da superfície parece influenciar mais a formação do biofilme do que a energia livre de superfície¹³. O aumento da rugosidade tem sido relacionado ao aumento na adesão de microrganismos, fato observado por Hosoya et al.³⁰ [2003] em superfícies tratadas por um agente clareador.

De acordo com os resultados obtidos pela quantificação de UFC/mL, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os diferentes grupos durante a avaliação dos biofilmes monoespécie de *S. sanguis*. No caso do biofilme monoespécie de *A. naeslundii*, o grupo AU apresentou valores de UFC/mL significativamente superiores aos grupos IM e IG, não apresentando diferença significativa em relação ao grupo OE. Também não foram observadas diferenças significantes entre os grupos IM e OE, IM e IG e entre IG e OE. Este resultado indica que os espécimes esterilizados por meio de autoclave apresentaram um número maior de *A. naeslundii* viáveis quando comparados aos espécimes esterilizados por irradiação gamma ou irradiação por micro-ondas. Apesar disso, os biofilmes de *A. naeslundii* formados nos espécimes esterilizados por AU não apresentam diferenças quando comparados aos espécimes esterilizados por OE.

Na avaliação do desenvolvimento de biofilmes multiespécie, a quantificação do microrganismo *A. naeslundii* apresentou diferença estatisticamente significativa nos grupo AU quando comparado aos grupos IG e IM, não tendo sido observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos AU e EO, IM e EO e, IM e IG. Este resultado indica que os biofilmes mistos desenvolvidos sobre espécimes de esmalte esterilizados por AU apresentaram uma quantidade maior de *A. naeslundii* viáveis quando comparados aos espécimes esterilizados por IG ou por IM. No caso da quantificação de *S. sanguis* nos biofilmes mistos, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos avaliados.

Estes resultados estão de acordo com os relatos da literatura, que atribuem maiores índices de formação de biofilme a superfícies com irregularidades quando comparadas a superfícies lisas³³. Esta observação pode ser atribuída ao aumento da área de superfície proporcionado pelas regiões irregulares, que pode promover uma maior área de colonização, favorecendo a adesão e formação de biofilme. Este efeito tem sido descrito como marcante após incubação a longo prazo¹³.

Considerando os resultados das avaliações morfológicas do esmalte apresentados neste estudo, os espécimes esterilizados por meio de autoclave apresentam características morfológicas distintas dos demais grupos. Provavelmente, a presença de áreas de rugosidade, trincas e prismas expostos atuaram como fatores favoráveis ao acúmulo do *A. naeslundii*. Apesar disso, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes nos biofilmes de *S. sanguis* entre os diferentes grupos avaliados. Esta observação pode ser atribuída ao fato de que, as irregularidades presentes nos espécimes esterilizados por autoclave, de alguma maneira, foram mais favoráveis ao desenvolvimento do *A. naeslundii* (bacilo) do que do *S. sanguis* (coco). Um estudo que avaliou o desenvolvimento de biofilmes de *S. sanguis* formados sobre diferentes substratos, relatou que, em um biofilme de 6 h, estes microrganismos ocupavam cerca de 1% da superfície do esmalte bovino.

Dessa forma, é provável que a porcentagem de cobertura de superfície atingida pelo *S. sanguis* no presente estudo seja semelhante aquela relatada por Chin et al.¹², 2006, uma vez que ambos substratos são esmalte bovino e os inóculos utilizados foram semelhantes (1×10^8 células/mL). Uma porcentagem pequena de

ocupação da superfície pelo *S. sanguis* pode ter influenciado para que diferenças significativas não fossem detectadas entre os grupos avaliados no presente estudo.

A avaliação da atividade metabólica dos microrganismos por meio do ensaio de XTT mostrou que não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos na avaliação dos biofilmes monoespécie de *S. sanguis*. Da mesma forma, os biofilmes monoespécie de *A. naeslundii* também não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos quanto aos valores de atividade metabólica. Na avaliação referente aos biofilmes mistos, no entanto, a atividade metabólica dos microrganismos foi significativamente maior para o grupo IG quando comparado ao grupo AU, não tendo sido observadas diferenças entre os grupos AU e IM, AU e OE, OE e IG e, IG e IM.

Estes resultados indicam que a atividade metabólica dos microrganismos referentes aos biofilmes mistos desenvolvidos em espécimes de esmalte esterilizados por IG foi maior que a atividade metabólica observada no grupo AU. Dentre os fatores que podem influenciar o metabolismo dos microrganismos, as condições de fluxo presentes durante a formação do biofilme podem ser destacadas³³. A superfície dos espécimes de esmalte esterilizados por meio de IG apresentam discretas alterações morfológicas, não sendo observadas áreas de rugosidade ou microtrincas. Dessa forma, o biofilme formado sobre o esmalte esterilizado por IG está exposto as condições de fluxo do ambiente, uma vez que a superfície do esmalte não oferece condições adicionais de proteção aos microrganismos. Biofilmes formados nestas condições tem sido descritos como mais finos e mais densos que os biofilmes formados em superfícies protegidas¹⁰.

Sendo assim, é provável que os microrganismos presentes no biofilme misto do esmalte esterilizado por IG apresentem taxas de metabolismo elevadas em função da necessidade de formar um biofilme mais resistente às condições de fluxo. A obtenção de menores taxas de crescimento com elevada atividade metabólica tem sido descrita como característica estrutural de biofilmes formados em ambientes com elevados fluxo e forças de cisalhamento³³. Um número maior de ligações entre os microrganismos e o substrato também sido descrito para biofilmes formados em ambientes com elevadas condições de fluxo³¹. Os valores de atividade metabólica reduzidos observados para o biofilme formado em espécimes do grupo AU comparados aos do grupo IG podem ser considerados como não esperados.

Considerando os resultados obtidos pela quantificação de UFC/mL, o grupo AU apresenta um número maior de microrganismos viáveis que o grupo IG e, apesar disso, o grupo IG apresentou valores de atividade metabólica superiores. Este resultado pode ser atribuído ao fato de que, apesar dos microrganismos apresentarem-se em maior número, as condições oferecidas pelo substrato, provavelmente, favoreceram a colonização. Trincas e áreas de rugosidade podem ter atuado como locais protegidos das condições de fluxo do ambiente, o que exigiu um esforço metabólico menor durante o processo de formação do biofilme. Um estudo complementar deve ser realizado para avaliar morfologicamente se este comportamento está de fato ocorrendo.

De acordo com as avaliações de estrutura e composição química realizadas pelo presente estudo, o esmalte esterilizado por meio de autoclave apresenta níveis reduzidos de fosfato, cálcio e fósforo quando comparado ao esmalte esterilizado por irradiação gamma. A deficiência nestes componentes também pode estar influenciando o metabolismo dos microrganismos presentes no biofilme misto. A adsorção de bactérias ao substrato pode ser direcionada por gradientes de concentração de difusão (quimiotaxia) ou por fatores químicos de adesão a superfície (haptotaxia), como por exemplo aminoácidos, açúcares e oligopeptídeos³³. A ocorrência de quimiotaxia tem sido relacionada a maioria dos microrganismos e pode atuar na modulação do desenvolvimento dos microrganismos nas superfícies, por meio da regulação dos componentes celulares de adesão, que podem influenciar nas interações entre microrganismos e entre microrganismos e superfície³².

Os resultados referentes a quantificação de biomassa total provenientes da avaliação por cristal violeta indicaram que não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos avaliados quanto aos biofilmes monoespécie, tanto de *S. sanguis* quanto de *A. naeslundii*. No entanto, a avaliação dos biofilmes mistos revelou uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos AU e IG, com índices maiores de formação de biomassa presentes no grupo AU. Não foram observadas diferenças significantes nos valores de biomassa entre os grupos AU e OE, AU e IM, IM e IG, IM e OE e, IG e OE. Estes resultados indicam que os biofilmes mistos de *A. naeslundii* e *S. sanguis* formados nos espécimes de esmalte esterilizados por meio de autoclave apresentaram uma

maior formação de biomassa quando comparados aos biofilmes mistos referentes aos espécimes esterilizados por irradiação gamma.

A biomassa total é constituída por microrganismos viáveis, inviáveis, fragmentos celulares e por polissacarídeos ⁴⁰. As irregularidades presentes na superfície dos espécimes de esmalte referentes ao grupo AU, possivelmente, proporcionaram um ambiente protegido das condições de fluxo intenso e das forças de cisalhamento que atuam despreendendo o biofilme, possibilitando, assim, a formação de uma quantidade maior de biomassa total quando comparado aos demais grupos. As alterações morfológicas promovidas pela esterilização do esmalte por irradiação gamma não acarretam em irregularidades superficiais significativas como é o caso dos espécimes esterilizados por AU. Dessa forma, o biofilme misto formado sobre os esmaltes esterilizados por IG foi exposto as condições de fluxo do ambiente, que implicam na formação de um biofilme mais denso e mais fino e, conseqüentemente, com menores valores de biomassa total.

Tem sido relatado que composição química superficial do substrato influencia a adesão e proliferação dos microrganismos. O substrato que contenha grupos funcionais como metil, ácido carboxílico e tri (óxido de etileno) pode ter a hidrofobicidade e a carga da superfície alteradas e, assim, alterar a aderência dos microrganismos. Tem sido relatado que o óxido de etileno atua fornecendo um padrão para a nucleação da água, que consiste em camada interfacial de água estável que, por sua vez, impede o contato direto entre os microrganismos e a superfície ³³, apesar disso, não foram observadas diferenças significativas entre os espécimes esterilizados por óxido de etileno e aqueles esterilizados pelos demais métodos avaliados no presente estudo.

Não foram realizadas, neste estudo, avaliações de outros fatores que possam influenciar o desenvolvimento dos biofilmes, como a hidrofobicidade da superfície e a atuação das forças eletrostáticas. No entanto, a superfície do esmalte polido tem sido descrita como hidrofílica, de carga negativa e fortemente influenciada por forças eletrostáticas no momento da adesão de proteínas ⁵⁰. Estas propriedades podem estar sendo influenciadas pelas alterações de morfologia, composição química e estrutura observadas no presente estudo. Dessa forma, mais estudos são necessários para detalhar os efeitos dos métodos de esterilização sobre as propriedades do esmalte dental, assim como para detalhar os mecanismos de ação envolvidos nestas alterações.

As análises realizadas neste estudo proporcionaram um conhecimento detalhado a respeito da influência dos métodos de esterilização sobre a morfologia, composição química elementar, estrutura do esmalte e, ainda, sobre a formação de biofilme *in vitro*. O conhecimento do comportamento dos espécimes de esmalte frente aos processos de esterilização irá facilitar o processo de seleção do método de esterilização mais apropriado de acordo com a característica a ser avaliada em cada estudo, diminuindo a variabilidade e aumentando a confiabilidade dos resultados.

7 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo permitiram concluir que:

1. A esterilização por autoclave promoveu danos severos sobre a morfologia do esmalte bovino, enquanto a utilização de irradiação gamma não produziu alterações e, ainda, que os métodos de irradiação por micro-ondas e óxido de etileno causaram apenas pequenas alterações morfológicas.
2. A composição química elementar do esmalte foi preservada nos espécimes esterilizados por irradiação gamma, no entanto, perda mineral nos espécimes esterilizados por autoclave e um comprometimento dos componentes orgânicos e inorgânicos foram observados nos espécimes esterilizados por irradiação por micro-ondas e óxido de etileno, respectivamente.
3. A estrutura da superfície do esmalte apresentou perda de fosfato nos espécimes esterilizados por óxido de etileno e, de maneira mais abrangente, nos espécimes esterilizados por autoclave. Substituições envolvendo o componente de fosfato foram observadas nos espécimes submetidos a irradiação por micro-ondas.
4. O desenvolvimento de biofilmes de *S. sanguis* não apresentou diferenças significantes entre os grupos. No entanto, um valor significativamente maior de UFC/mL de *A. naeslundii* foi observado nos biofilmes do grupo autoclave quando comparado aos grupos irradiação por micro-ondas e irradiação gamma, tanto para os biofilmes monoespécie quanto para os do tipo misto.
5. Não foram observadas diferenças significantes nos valores de atividade metabólica entre os grupos na avaliação dos biofilmes monoespécie. Entretanto, atividade metabólica mais intensa foi observada no esmalte esterilizado por irradiação gamma quando comparado com o método autoclave.

6. A formação de biomassa total não foi significativamente diferente entre os grupos na avaliação dos biofilmes monoespécie. Os biofilmes mistos, no entanto, mostraram índices maiores de biomassa no esmalte esterilizado por autoclave quando comparado ao grupo irradiação gamma.

REFERÊNCIAS *

1. Amaechi BT, Higham SM, Edgar WM. Effect of sterilisation methods on the structural integrity of artificial enamel caries for intra-oral cariogenicity tests. *J Dent.* 1999; 27(4): 313-6.
2. Amaechi BT, Higham SM, Edgar WM. Efficacy of sterilization methods and their effect on enamel demineralisation. *Caries Res.* 1998; 32(6): 441-6.
3. Amaechi BT, Higham SM, Edgar WM. The use of gamma irradiation for the sterilization of enamel for intra-oral cariogenicity tests. *J Oral Rehabil.* 1999; 26(10): 809-13.
4. Antonakos A, Liarokapis E, Leventouri T. Micro-Raman and FTIR studies of synthetic and natural apatites. *Biomaterials.* 2007; 28(19): 3043-54.
5. Atmaca S, Akdag Z, Dasdag S, Celik S. Effect of microwaves on survival of some bacterial strains. *Acta Microbiol Immunol Hung.* 1996; 43(4): 371-8.
6. Belton PS, Harris RK, Wilkes PJ. Solid-state phosphorus-31 NMR studies of synthetic inorganic calcium phosphates. *J Phys Chem Solids.* 1988; 49(1): 21-7.
7. Brauer DS, Saeki K, Hilton JF, Marshall GW, Marshall SJ. Effect of sterilization by gamma radiation on nano-mechanical properties of teeth. *Dent Mater.* 2008; 24(8): 1137-40.
8. Cesar IC, Soares LE, Alves LP, Martin AA, Munin E, Liporoni PC. Fourier transform-Raman and reflectance studies on dental enamel bleached with hydrogen peroxide activated using a light-emitting diode-laser system. *Photomed Laser Surg.* 2009; 27(6): 913-9.

*De acordo com o manual da FOAr/UNESP, adaptadas das normas Vancouver. Disponível no site: <http://www.foar.unesp.br/#!/biblioteca/manual>

9. Chandler NP. Preparation of dental enamel for use in intraoral cariogenicity experiments. *J Dent.* 1990; 18(1): 54-8.
10. Chang HT, Rittmann BE, Amar D, Heim R, Ehlinger O, Lesty Y. Biofilm detachment mechanisms in a liquid-fluidized bed. *Biotechnol Bioeng.* 1991; 38(5): 499-506.
11. Cheng L, Li J, Hao Y, Zhou X. Effect of compounds of *Galla chinensis* on remineralization of enamel surface *in vitro*. *Arch Oral Biol.* 2010; 55(6): 435-40.
12. Chin MY, Busscher HJ, Evans R, Noar J, Pratten J. Early biofilm formation and the effects of antimicrobial agents on orthodontic bonding materials in a parallel plate flow chamber. *Eur J Orthod.* 2006 ;28(1): 1-7.
13. Daneshmehr L, Matin K, Nikaido T, Tagami J. Effects of root dentin surface coating with all-in-one adhesive materials on biofilm adherence. *J Dent.* 2008; 36(1): 33-41.
14. da Silva Tagliaferro EP, Rodrigues LK, Soares LE, Martin AA, Nobre-dos-Santos M. Physical and compositional changes on demineralized primary enamel induced by CO₂ Laser. *Photomed Laser Surg.* 2009;27(4): 585-90.
15. da Silva WJ, Seneviratne J, Parahitiyawa N, Rosa EA, Samaranayake LP, Del Bel Cury AA. Improvement of XTT assay performance for studies involving *Candida albicans* biofilms. *Braz Dent J.* 2008; 19(4): 364-9.
16. De Menezes Oliveira MA, Torres CP, Gomes-Silva JM, Chinelatti MA, De Menezes FC, Palma-Dibb RG, Borsatto MC. Microstructure and mineral composition of dental enamel of permanent and deciduous teeth. *Microsc Res Tech.* 2010; 73(5): 572-7.

17. De Sant'anna GR, dos Santos EA, Soares LE, do Espírito Santo AM, Martin AA, Duarte DA, Pacheco-Soares C, Brugnera A Jr. Dental enamel irradiated with infrared diode laser and photoabsorbing cream: part 1-FT-Raman study. *Photomed Laser Surg.* 2009; 27(3): 499-507.
18. DeWald JP. The use of extracted teeth for *in vitro* bonding studies: a review of infection control considerations. *Dent Mater.* 1997; 13(2): 74-81.
19. Dige I, Raarup MK, Nyengaard JR, Kilian M, Nyvad B. *Actinomyces naeslundii* in initial dental biofilm formation. *Microbiology.* 2009; 155(Pt 7): 2116-26.
20. Dominici JT, Eleazer PD, Clark SJ, Staat RH, Scheetz JP. Disinfection/sterilization of extracted teeth for dental student use. *J Dent Educ.* 2001; 65(11): 1278-80.
21. Elliott JC. The problems of the composition and structure of the mineral components of the hard tissues. *Clin Orthop Relat Res.* 1973 Jun; (93): 313-45.
22. Featherstone JD, Mayer I, Driessens FC, Verbeeck RM, Heijligers HJ. Synthetic apatites containing Na, Mg and CO₃ and their comparison with tooth enamel mineral. *Calcif Tissue Int.* 1983; 35(2): 169-71.
23. Gerth HU, Dammaschke T, Schäfer E, Züchner H. A three layer structure model of fluoridated enamel containing CaF₂, Ca(OH)₂ and FAp. *Dent Mater.* 2007; 23(12): 1521-8.
24. Gilbert GI, Gambill VM, Spiner DR, Hoffman RK, Phillips CR. Effect of moisture on ethylene oxide sterilization. *Appl Microbiol.* 1964 Nov; 12: 496-503.
25. Gilchrist F, Santini A, Harley K, Deery C. The use of micro-Raman spectroscopy to differentiate between sound and eroded primary enamel. *Int J Paediatr Dent.* 2007; 17(4): 274-80.

26. Gontijo L, Cruz R de A, Brandão PR. Dental enamel around fixed orthodontic appliances after fluoride varnish application. *Braz Dent J*. 2007; 18(1): 49-53.
27. Guggenheim B, Giertsen E, Schüpbach P, Shapiro S. Validation of an *in vitro* biofilm model of supragingival plaque. *J Dent Res*. 2001; 80(1): 363-70.
28. Guggenheim B, Guggenheim M, Gmür R, Giertsen E, Thurnheer T. Application of the Zürich biofilm model to problems of cariology. *Caries Res*. 2004; 38(3): 212-22.
29. Hashimoto M, Nakamura K, Kaga M, Yawaka Y. Crystal growth by fluoridated adhesive resins. *Dent Mater*. 2008; 24(4): 457-63.
30. Hosoya N, Honda K, Iino F, Arai T. Changes in enamel surface roughness and adhesion of *Streptococcus mutans* to enamel after vital bleaching. *J Dent*. 2003; 31(8): 543-8.
31. Hubble TS, Hatton JF, Nallapareddy SR, Murray BE, Gillespie MJ. Influence of *Enterococcus faecalis* proteases and the collagen-binding protein, Ace, on adhesion to dentin. *Oral Microbiol Immunol*. 2003; 18(2): 121-6.
32. Jenal U. Cyclic di-guanosine-monophosphate comes of age: a novel secondary messenger involved in modulating cell surface structures in bacteria? *Curr Opin Microbiol*. 2004; 7(2): 185-91.
33. Katsikogianni M, Missirlis YF. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions. *Eur Cell Mater*. 2004 Dec 7; 8: 37-57.
34. Ko AC, Hewko M, Sowa MG, Dong CC, Cleghorn B, Choo-Smith LP. Early dental caries detection using a fibre-optic coupled polarization-resolved Raman spectroscopic system. *Opt Express*. 2008; 16(9): 6274-84.

35. Kohn WG, Collins AS, Cleveland JL, Harte JA, Eklund KJ, Malvitz DM. Centers of Disease Control and Prevention (CDC): guidelines for infection control in dental health-care settings – 2003. *MMRW Recomm Rep* 2003. 52(RR17): 1-76.
36. Kolenbrander PE, London J. Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. *J Bacteriol.* 1993; 175(11): 3247-52.
37. Kolenbrander PE, Andersen RN, Blehert DS, Egland PG, Foster JS, Palmer RJ Jr. Communication among oral bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2002; 66(3): 486-505.
38. Korystov YN. Contribution of the direct and indirect effects of ionizing radiation to reproductive cell death. *Radiat Res.* 1992; 129(2): 228-34.
39. Kumar M, Sequeira PS, Peter S, Bhat GK. Sterilisation of extracted human teeth for educational use. *Indian J Med Microbiol.* 2005; 23(4): 256-8.
40. Landa AS, Van der Mei HC, Busscher HJ. Detachment of linking film bacteria from enamel surfaces by oral rinses and penetration of sodium lauryl sulphate through an artificial oral biofilm. *Adv Dent Res.* 1997; 11(4): 528-38.
41. Lazarin AA, Zamperini CA, Vergani CE, Wady AF, Giampaolo ET, Machado AL. *Candida albicans* adherence to an acrylic resin modified by experimental photopolymerised coatings: an *in vitro* study. *Gerodontology.* 2012 30 Jul. Epub.
42. Liu Y, Hsu CY. Laser-induced compositional changes on enamel: a FT-Raman study. *J Dent.* 2007; 35(3): 226-30.
43. Lolayekar NV, Bhat VS, Bhat SS. Disinfection methods of extracted human teeth. *J Oral Health Comm Dent.* 2007; 1(2): 27-9.

44. Lou L, Nelson AE, Heo G, Major PW. Surface chemical composition of human maxillary first premolar as assessed by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS). *Appl Surf Sci.* 2008; 254(21): 6706-9.
45. Mellberg JR. Hard-tissue substrates for evaluation of cariogenic and anti-cariogenic activity *in situ*. *J Dent Res.* 1992; 71 Spec No: 913-9.
46. Mihály J, Gombás V, Afishah A, Mink J. FT-Raman investigation of human dental enamel surfaces. *J Raman Spectrosc.* 2008; 40(8): 898-902.
47. Mine A, Yoshida Y, Suzuki K, Nakayama Y, Yatani H, Kuboki T. Spectroscopy Characterization of enamel surfaces irradiated with Er:YAG laser. *Dent Mat J.* 2006; 25(2): 214-8.
48. Montasser MA, Drummond JL, Roth JR, Al-Turki L, Evans CA. Rebonding of Orthodontic Brackets. Part II, an XPS and SEM Study. *Angle Orthod.* 2008; 78(3): 537-44.
49. Mori K, Kaido M, Fujishiro K, Inoue N, Koide O, Hori H, Tanaka I. Dose dependent effects of inhaled ethylene oxide on spermatogenesis in rats. *Br J Ind Med.* 1991; 48(4): 270-4.
50. Müller C, Lüders A, Hoth-Hannig W, Hannig M, Ziegler C. Initial bioadhesion on dental materials as a function of contact time, pH, surface wettability, and isoelectric point. *Langmuir.* 2010; 26(6): 4136-41.
51. Nelson DG, Featherstone JD. Preparation, analysis, and characterization of carbonated apatites. *Calcif Tissue Int.* 1982; 34 Suppl 2: S69-81.
52. Neppelenbroek KH, Pavarina AC, Spolidorio DM, Vergani CE, Mima EG, Machado AL. Effectiveness of microwave sterilization on three hard chairside relined resins. *Int J Prosthodont.* 2003; 16(6): 616-20.

53. Panda RN, Hsieh MF, Chung RJ, Chin TS. FTIR, XRD, SEM and solid state NMR investigations of carbonate-containing hydroxyapatite nano-particles synthesized by hydroxide-gel technique. *J Phys Chem Solids*. 2003;64(2):193-99.
54. Pantera EA Jr, Schuster GS. Sterilization of extracted human teeth. *J Dent Educ*. 1990; 54(5): 283-5.
55. Park HJ, Kwon TY, Nam SH, Kim HJ, Kim KH, Kim YJ. Changes in bovine enamel after treatment with a 30% hydrogen peroxide bleaching agent. *Dent Mater J*. 2004; 23(4): 517-21.
56. Penel G, Leroy G, Rey C, Bres E. MicroRaman spectral study of the PO₄ and CO₃ vibrational modes in synthetic and biological apatites. *Calcif Tissue Int*. 1998; 63(6): 475-81.
57. Pettit RK, Weber CA, Kean MJ, Hoffmann H, Pettit GR, Tan R, Franks KS, Horton ML. Microplate alamar blue assay for *Staphylococcus epidermidis* biofilm susceptibility testing. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49(7): 2612-17.
58. Robinson C, Shore RC, Brookes SJ, Strafford S, Wood SR, Kirkham J. The chemistry of enamel caries. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2000; 11(4): 481-95.
59. Robinson C, Wheatherell JA, Halls-Worth AS. Variation in composition of dental enamel within thin ground tooth sections. *Caries Res*. 1971; 5(1): 44-7.
60. Rodrigues LK, Cury JA, Santos MN. The effect of gamma radiation on enamel hardness and its resistance to demineralization *in vitro*. *J Oral Sci*. 2004; 46(4): 215-20.

61. Rodríguez-Vilchis LE, Contreras-Bulnes R, Olea-Mejía OF, Sánchez-Flores I, Centeno-Pedraza C. Morphological and structural changes on human dental enamel after Er:YAG laser irradiation: AFM, SEM, and EDS evaluation. *Photomed Laser Surg.* 2011; 29(7): 493-500.
62. Rosaspina S, Salvatorelli G, Anzanel D, Bovolenta R. Effect of microwave radiation on *Candida albicans*. *Microbios.* 1994; 78(314): 55-9.
63. Rothwell WP, Waugh JS, Yesinowski JP. High-resolution variable-temperature phosphorus-31 NMR of solid calcium phosphates. *J Am Chem Soc.* 1980; 102(8): 2637-43.
64. Ruse ND, Smith DC, Torneck CD, Titley KC. Preliminary surface analysis of etched, bleached, and normal bovine enamel. *J Dent Res.* 1990; 69(9): 1610-3.
65. Rutala WA, Weber DJ. Infection control: the role of disinfection and sterilization. *J Hosp Infect.* 1999; 43 Suppl: S43-55.
66. Sanborn MR, Wan SK, Bulard R. Microwave sterilization of plastic tissue culture vessels for reuse. *Appl Environ Microbiol.* 1982; 44(4): 960-4.
67. Santini A, Pulham CR, Rajab A, Ibbetson R. The effect of a 10% carbamide peroxide bleaching agent on the phosphate concentration of tooth enamel assessed by Raman spectroscopy. *Dent Traumatol.* 2008; 24(2): 220-3.
68. Shaffer SE, Barkmeier WW, Gwinnett AJ. Effect of disinfection/sterilization on *in vitro* enamel bonding. *J Dent Educ.* 1985; 49(9): 658-9.
69. Shapiro S, Giertsen E, Guggenheim B. An *in vitro* oral biofilm model for comparing the efficacy of antimicrobial mouthrinses. *Caries Res.* 2002; 36(2): 93-100.

70. Shellis RP, Ganss C, Ren Y, Zero DT, Lussi A. Methodology and models in erosion research: discussion and conclusions. *Caries Res.* 2011; 45 Suppl1: 69-77.
71. Silva MM, Vergani CE, Giampaolo ET, Neppelenbroek KH, Spolidorio DM, Machado AL. Effectiveness of microwave irradiation on the disinfection of complete dentures. *Int J Prosthodont.* 2006; 19(3): 288-93.
72. Sonju Clasen AB, Ogaard B. Experimental intra-oral caries models in fluoride research. *Acta Odontol Scand.* 1999; 57(6): 334-41.
73. Sonju Clasen AB, Ruyter IE. Quantitative determination of type A and type B carbonate in human deciduous and permanent enamel by means of Fourier transform infrared spectrometry. *Adv Dent Res.* 1997; 11(4): 523-7.
74. Spizzirri PG, Cochrane NJ, Praver S, Reynolds EC. A comparative study of carbonate determination in human teeth using Raman spectroscopy. *Caries Res.* 2012; 46(4): 353-60.
75. Taube F, Ylmén R, Shchukarev A, Nietzsche S, Norén JG. Morphological and chemical characterization of tooth enamel exposed to alkaline agents. *J Dent.* 2010; 38(1): 72-81.
76. Tseng YH, Tsai YL, Tsai TW, Chao JC, Lin CP, Huang SH, Mou CY, Chan JCC. Characterization of the phosphate units in rat dentin by solid-state NMR Spectroscopy. *Chem Mat.* 2007; 19(25): 6088-94.
77. Tian Y, He X, Torralba M, Yooseph S, Nelson KE, Lux R, McLean JS, Yu G, Shi W. Using DGGE profiling to develop a novel culture medium suitable for oral microbial communities. *Mol Oral Microbiol.* 2010; 25(5): 357-67.
78. Thomas RZ, Ruben JL, ten Bosch JJ, Huysmans MC. Effect of ethylene oxide sterilization on enamel and dentin demineralization *in vitro*. *J Dent.* 2007; 35(7): 547-51.

79. Viana PS, Machado AL, Giampaolo ET, Pavarina AC, Vergani CE. Disinfection of bovine enamel by microwave irradiation: effect on the surface microhardness and demineralization/remineralization processes. *Caries Res.* 2010; 44(4): 349-57.
80. Vukosavljevic D, Custodio W, Del Bel Cury AA, Siqueira WL. The effect of histatin 5, adsorbed on PMMA and hydroxyapatite, on *Candida albicans* colonization. *Yeast.* 2012; 29(11): 459-66.
81. Wang C, Li Y, Wang X, Zhang L, Tiantang, Fu B. The enamel microstructures of bovine mandibular incisors. *Anat Rec (Hoboken).* 2012; 295(10): 1698-706.
82. Weatherell JA, Robinson C, Hallsworth AS. Variations in the chemical composition of human enamel. *J Dent Res.* 1974; 53(2): 180-92.
83. Wentrup-Byrne E, Armstrong CA, Armstrong RS, Collins BM. Fourier transform Raman microscopic mapping of the molecular components in a human tooth. *J Raman Spectrosc.* 1997; 28(2-3): 151-8.
84. White RR, Hays GL. Failure of ethylene oxide to sterilize extracted human teeth. *Dent Mater.* 1995; 11(4): 231-3.
85. Wilson D, Xu C, Hong L, Wang Y. Effects of different preparation procedures during tooth whitening on enamel bonding. *J Mater Sci: Mater Med.* 2009; 20(4): 1001-7.
86. Toro MJ, Lukantsova LL, Williamson M, Hinesley R, Eckert GJ, Dunipace AJ. *In vitro* fluoride dose-response study of sterilized enamel lesions. *Caries Res.* 2000; 34(3): 246-53.
87. Tsuda H, Arends J. Raman spectroscopy in dental research: a short review of recent studies. *Adv Dent Res.* 1997; 11(4): 539-47.

88. Xu C, Reed R, Gorski JP, Wang Y, Walker MP. The distribution of carbonate in enamel and its correlation with structure and mechanical properties. *J Mater Sci.* 2012; 47(23): 8035-43.
89. Young SK, Graves DC, Rohrer MD, Bulard RA. Microwave sterilization of nitrous oxide nasal hoods contaminated with virus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1985; 60(6): 581-5.
90. Zamperini CA, Schiavinato PC, Pavarina AC, Giampaolo ET, Vergani CE, Machado AL. Effect of human whole saliva on the *in vitro* adhesion of *Candida albicans* to a denture base acrylic resin: a focus on collection and preparation of saliva samples. *J Investig Clin Dent.* 2012 Dez 17. Epub.
91. Zero DT. *In situ* caries models. *Adv Dent Res.* 1995; 9(3): 214-30.
92. Zylber LJ, Jordan HV. Development of a selective medium for detection and enumeration of *Actinomyces viscosus* and *Actinomyces naeslundii* in dental plaque. *J Clin Microbiol.* 1982; 15(2): 253-9.

Anexo A – Aprovação no CONEP

Plataforma Brasil - Ministério da Saúde

CONEP

PROJETO DE PESQUISA

Título: Influência de diferentes métodos de esterilização de esmalte bovino sobre sua composição química, morfologia superficial e formação do biofilme inicial

Área Temática: Área 7. Biossegurança.

Pesquisador: Carlos Eduardo Vergani

Versão: 2

Instituição: Faculdade de Odontologia de Araraquara -
UNESP

CAAE: 01549012.3.0000.5416

PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP

Número do Parecer: 64896

Data da Relatoria: 30/07/2012

Apresentação do Projeto:

Conteúdo do projeto não avaliado pela CONEP.

Objetivo da Pesquisa:

Conteúdo do projeto não avaliado pela CONEP.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Conteúdo do projeto não avaliado pela CONEP.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Não se aplica.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Não se aplica.

Recomendações:

Não se aplica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não se aplica.

Situação do Parecer:

Devolvido

Necessita Apreciação da CONEP:

Sim

Considerações Finais a critério do CEP:

Após análise da documentação encaminhada, a CONEP esclarece que essa pesquisa não se enquadra em nenhuma Área Temática Especial do Grupo I.

Nesse caso, a aprovação ética é delegada ao Comitê de Ética em Pesquisa da instituição, devendo ser seguido o procedimento para projetos que não são do Grupo I, conforme o fluxograma disponível no site: <http://conselho.saude.gov.br> e no Manual Operacional para CEP.

Diante do exposto, esta comissão delibera por devolver o protocolo em questão.

O presente projeto, seguiu nesta data para análise da CONEP e só tem o seu início autorizado após a aprovação pela mesma.

01 de Agosto de 2012

Assinado por:
Gyséle Saddi Tannous

Autorizo a reprodução deste trabalho
(Direitos de publicação reservados ao autor)

Araraquara, 18 de Julho de 2013.

Patricia Gabriela Sabino Viana