



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA

Patricia Gabriela Sabino Viana

*Esterilização de esmalte bovino por meio de
irradiação por microondas. Efeito sobre a
microdureza superficial e resistência à
desmineralização*

Araraquara
2009



Patricia Gabriela Sabino Viana

*Esterilização de esmalte bovino por meio de irradiação por
microondas. Efeito sobre a microdureza superficial e
resistência à desmineralização*

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Reabilitação Oral – Área de
Prótese, da Faculdade de
Odontologia de Araraquara, da
Universidade Estadual Paulista,
para a obtenção do título de
Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Vergani

Araraquara
2009

Patrícia Gabriela Sabino Viana

Esterilização de esmalte bovino por meio de
irradiação por microondas. Efeito sobre a
microdureza superficial e resistência à
desmineralização

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Prof. Dr. Carlos Eduardo Vergani - Orientador, Professor Adjunto do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP.

Profa. Dra. Ana Lúcia Machado - Professora Titular do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP.

Profa. Dra. Mônica Campos Serra - Professora Associada do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP.

Araraquara, 27 de Março de 2009.

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

Dedicatória

A Deus.

Aos meus Pais, *Regina* e *Misael*,
que desde sempre estimularam a busca pelo conhecimento.

Aos meus Irmãos *Silvinha* e *Matheus*,
pelo incentivo para a concretização deste trabalho.

Ao querido *Thiago*,
pelo apoio dedicado ao longo desta jornada.

Agradecimentos Especiais

*Ao Prof. Dr. Carlos Eduardo Vergani, por
compartilhar seus conhecimentos, pela amizade,
pela compreensão e, acima de tudo, por seu
exemplo de responsabilidade e determinação.*

Agradecimentos

À amiga *Mariana Montenegro Silva*, pelos ensinamentos durante os primeiros estágios do desenvolvimento deste trabalho.

À aluna *Paula Delello Macedo*, pelo auxílio e dedicação empregados durante o desenvolvimento da fase experimental deste projeto.

Ao colega *Murilo Souza Guimarães*, pela ajuda com o treinamento para a realização dos procedimentos de ciclagem de pH.

Ao funcionário *Marinho*, pelo auxílio durante a obtenção das amostras utilizadas neste estudo.

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

Aos Professores do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese pelos ensinamentos transmitidos.

Aos Professores Denise Madalena P. Spolidorio e Carlos Alberto de Souza Costa pela atenção e solicitude prestadas.

À FAPESP pela concessão da bolsa de Mestrado (processo 2007/02277-9).

À PROAP pela concessão do auxílio financeiro.

E a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a consolidação deste projeto.

Sumário

<i>Resumo.....</i>	<i>10</i>
<i>Abstract.....</i>	<i>13</i>
<i>1 Introdução.....</i>	<i>16</i>
<i>2 Proposição.....</i>	<i>20</i>
<i>3 Revisão da Literatura.....</i>	<i>22</i>
<i>4 Material e Método.....</i>	<i>72</i>
<i>5 Resultado.....</i>	<i>91</i>
<i>6 Discussão.....</i>	<i>95</i>
<i>7 Conclusão</i>	<i>107</i>
<i>8 Referências</i>	<i>108</i>
<i>9 Apêndices.....</i>	<i>119</i>

Resumo

Viana PGS. Esterilização de esmalte bovino por meio de irradiação por microondas. Efeito sobre a microdureza superficial e resistência à desmineralização. [Dissertação de Mestrado] Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2009.

RESUMO

Amostras de esmalte provenientes de dentes extraídos, de origem humana ou bovina, são amplamente utilizadas em estudos realizados *in vitro* e *in situ*. Esses dentes são considerados uma fonte em potencial de microorganismos patogênicos e devem ser esterilizados, antes da sua utilização nas pesquisas, para prevenir a ocorrência de infecções cruzadas. No entanto, o processo de esterilização do esmalte não deve alterar a sua integridade estrutural. O presente estudo teve como objetivo avaliar a efetividade da irradiação por microondas na esterilização do esmalte bovino, assim como o efeito deste método sobre a microdureza superficial e resistência à desmineralização do esmalte bovino. Dezoito incisivos bovinos foram utilizados para a obtenção de quarenta amostras de esmalte, divididas em dois grupos (n=20): controle (não-irradiados) e irradiados por microondas (3 minutos a 650 W). As amostras do grupo irradiado foram imersas, individualmente, em 200 mL de água destilada e submetidas à irradiação por microondas por 3 minutos a 650 W. Em seguida, ambos os grupos tiveram suas amostras imersas individualmente em tubos estéreis contendo 10 mL caldo BHI (Brain Heart Infusion), os quais foram incubados por 7 dias a 37°C, sob condições de aerobiose e anaerobiose. Após a incubação, o desenvolvimento de microorganismos foi verificado pela presença de turvação do meio de cultura. Em seguida, foram realizadas diluições seriadas

(10^{-2} a 10^{-5}), plaqueamento em meio ágar sangue e incubação em condições de aerobiose e anaerobiose, durante 48 h e 7 dias, respectivamente. Os valores de unidades formadoras de colônias foram calculados. Para a avaliação das propriedades do esmalte, outras 18 amostras de esmalte (4 x 4 mm) foram preparadas, individualmente embutidas em resina acrílica, seqüencialmente polidas e, então, seccionadas em duas metades, sendo uma das metades destinada ao grupo controle e a outra destinada ao grupo irradiado. As amostras do grupo irradiado foram imersas em 200 mL de água destilada e irradiadas durante 3 minutos a 650 W. Testes de microdureza superficial foram realizados no aparelho microdurômetro, equipado com diamante Knoop, tendo sido realizadas 5 indentações em cada amostra, sob carga de 25 gf por 05 segundos. Para a análise da resistência à desmineralização, os grupos foram submetidos a um processo de desmineralização e remineralização, realizado por meio de ciclagem de pH. A média dos valores de microdureza em secção longitudinal foi calculada para cada amostra e convertida em % de perda mineral. Os resultados foram analisados pelo teste t de Student, com $\alpha = 0,05$. O crescimento microbiológico foi observado apenas nas amostras do grupo controle, enquanto o grupo experimental não apresentou crescimento microbiano. Não ocorreu diferença significativa entre os valores de microdureza superficial e % de perda mineral dos grupos controle e irradiado. Os resultados obtidos indicam que a irradiação por microondas por 3 minutos a 650 W é um método eficiente de esterilização de esmalte bovino e que não promove alterações na microdureza superficial e na resistência a desmineralização das amostras de esmalte bovino.

Palavras-chave: Esterilização, microondas, esmalte dentário, desmineralização, testes de dureza.

Abstract

Viana PGS. Sterilization of bovine enamel by microwave irradiation. Microbiological effectiveness and the effect on the surface microhardness and resistance to demineralization. [Dissertação de Mestrado] Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2009.

ABSTRACT

Enamel samples from bovine or human teeth are routinely used for in vitro and in situ caries research. These enamel samples need to be sterilized before they can be used in intra-oral appliances and the sterilization method must not affect the structural integrity of the tooth. The aim of this study was to evaluate the effectiveness of microwave irradiation on bovine enamel sterilization, as well as its effect on the surface microhardness and resistance to demineralization of bovine enamel. Eighteen bovine incisors were used to produce forty enamel samples, divided in two groups (n = 20): control (non-irradiated) and microwave irradiated (3 minutes at 650 W). Microwaving samples were individually immersed in 200 mL of distilled water and submitted to irradiation at 650 W for 3 minutes. Following the microwaving, specimens from both groups were added individually to 10 mL of Brain Heart Infusion broth in sterile test tubes, which were incubated at 37°C for 7 days under aerobic and anaerobic conditions. After 7 days incubation, those test tubes in which turbidity was observed were considered to contain growing microorganisms. Dilutions of 10^{-2} to 10^{-5} were performed on blood agar plates, which were incubated aerobically and anaerobically for growth for up to 48 h and 7 days, respectively. After incubation, the numbers of colony-forming units were calculated. For the properties of enamel analysis, other 18

bovine enamel samples (4 x 4 mm) were prepared, embedded in acrylic resin, serially polished and sliced into two halves: one of the fragments was reserved as control while the other was microwaved in 200 mL of distilled water for 3 minutes at 650 W. Hardness measurements were conducted using a Microhardness tester with a Knoop diamond. Five indentations were performed under a load of 25 gf for 05 seconds. For the resistance to demineralization analysis, the groups were submitted to demineralization and remineralization process using a pH cycling regimen. The mean values of cross-sectional microhardness were averaged for each sample and the values were converted to % mineral volume. Data were analyzed statistically by paired Student's t-test, with $\alpha = 0,05$. While all control specimens showed microbial growth, those submitted to microwave irradiation showed consistent sterilization. There were no significant differences in surface microhardness and % mineral loss between the control and microwave groups. The results obtained showed that microwave irradiation for 3 minutes at 650 W proved to be effective for the sterilization of bovine enamel without affecting the surface microhardness and the resistance to demineralization of bovine enamel samples.

Keywords: Sterilization, microwaves, dental enamel, demineralization, hardness tests.

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Uma das maneiras utilizadas pelos profissionais da área de Odontologia para a escolha dos produtos utilizados em sua prática clínica é a comparação do seu desempenho em estudos in vivo e in situ⁵⁰. A utilização de amostras de esmalte dental na realização desses estudos permite a avaliação da efetividade de soluções fluoretadas^{7,18,26,33,34,46,51,78,88}, do desempenho de novos materiais adesivos e restauradores¹, das alterações proporcionadas por técnicas de clareamento^{9,51,54,61,64} e por agentes causadores de erosão dental⁹⁰. Os estudos realizados in vitro são constituídos apenas por procedimentos laboratoriais, enquanto que aqueles in situ envolvem experimentos intra-orais realizados em humanos^{55,72,80,89}. A utilização de dentes extraídos, de origem humana ou bovina, em estudos realizados in situ, tem sido amplamente difundida^{21,55,72,89}. Os dentes extraídos de origem humana são considerados a fonte mais apropriada de substrato dental para a realização desses estudos^{55,89}, porém, a maioria dos dentes humanos disponíveis para a realização de pesquisas não preenchem os requisitos necessários para uma adequada padronização das amostras^{55,72,78,89}. Dessa forma, dentes bovinos têm sido utilizados para a obtenção de amostras de esmalte^{2-4,21,55,89}, pois são facilmente obtidos^{1,78,89} e apresentam as qualidades necessárias para facilitar e promover a obtenção de amostras homogêneas^{21,50,55,89}.

Dentes extraídos são considerados uma fonte potencial de microrganismos patogênicos. O ambiente bucal e a vascularização, presente nos tecidos pulpaes e perirradiculares dos dentes, tornam possível a presença de vírus e muitos outros patógenos transmitidos pela via sanguínea^{20,65,80,83}. Consequentemente, os dentes extraídos, destinados a pesquisas ou utilizados pelos acadêmicos de odontologia para o aprendizado de técnicas em atividades pré-clínicas, devem ser esterilizados antes da sua

utilização, prevenindo a propagação de doenças entre acadêmicos, pesquisadores e voluntários^{2-4,14,20-21,24,48,50,65,72,75,80,83}. A maioria dos métodos comprovadamente eficazes na esterilização de dentes extraídos apresenta restrições quanto a sua utilização em pesquisas, pois provocam danos à estrutura dental, como alterações na microdureza superficial, na coloração e na composição mineral dos dentes, comprometendo os resultados dos estudos^{21,24,55,89}. Soluções químicas germicidas a base de formol, iodo, hipoclorito de sódio, peróxido de hidrogênio, glutaraldeído ou clorexidina são comumente empregadas para o armazenamento de dentes extraídos e utilizadas como método de esterilização^{1-3,7,20,24,27,36,48,50,53,63-64,78}. Entretanto, além de causar alterações na estrutura do esmalte^{2-3,21,24,48}, não existe uma padronização do tempo de armazenamento necessário para a obtenção da esterilização²⁴ e a manipulação de algumas destas substâncias pode provocar intoxicações^{24,48}. O óxido de etileno tem sido utilizado como método de esterilização de esmalte dental há mais de 40 anos, porém, sua utilização tem diminuído desde a década de 70, devido a sua alta toxicidade^{21,72} e, recentemente, sua ineficiência para a esterilização de dentes tem sido relatada^{24,83}. De acordo com as normas do Centers for Disease Control and Prevention (CDC)²⁰ e DeWald²⁴, em 1997, dentes extraídos, que não contenham restaurações de amálgama, utilizados para fins educacionais e de pesquisa, devem ser esterilizados em autoclave^{20,24}, porém, este procedimento pode causar alterações nas propriedades do esmalte^{21,48,75-76}, comprometendo os resultados dos estudos. Dentre os métodos de esterilização de esmalte dental disponíveis atualmente, a utilização da irradiação gamma é o mais recomendado, tanto pela sua eficiência como por ser capaz de preservar as propriedades do esmalte^{2-4,21,65}. Porém, a esterilização por meio de irradiação gamma consiste em um processo complexo, de alto custo e de difícil acesso^{50,82}. Portanto, métodos alternativos de esterilização de esmalte dental devem ser avaliados.

A irradiação por microondas tem sido utilizada como método de inativação de microrganismos patogênicos presentes em alimentos^{17,23,59}, objetos de uso doméstico⁴², lentes de contato^{38,67}, roupas íntimas³², amostras de solo^{40,77}, lixo hospitalar³⁹, corantes utilizados na fabricação de cosméticos⁴⁴, materiais destinados a experimentos microbiológicos^{13,49,69}, instrumentos utilizados em procedimentos médicos^{37,68} e odontológicos^{41,68,73,87}, próteses dentárias^{10,35,66-67,71,81} e materiais utilizados para a sua confecção^{11,25,58}. Para a obtenção de maior efetividade na desinfecção, tem sido recomendado o umedecimento dos materiais antes do processo de irradiação^{25,32,42}. Apesar da efetividade comprovada deste método para a desinfecção ou esterilização em diversas áreas, não há relato de estudos que tenham avaliado a eficiência da irradiação por microondas na esterilização de dentes humanos ou bovinos, bem como a sua influência sobre os tecidos minerais desses dentes.

Proposição

2 PROPOSIÇÃO

Os objetivos do presente trabalho foram:

1. Analisar a efetividade da irradiação por microondas na esterilização do esmalte bovino.
2. Avaliar a influência da irradiação por microondas sobre a microdureza superficial e resistência à desmineralização do esmalte bovino.

*Revisão da
Literatura*

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Métodos de Esterilização de Dentes extraídos

De acordo com Chandler²¹, em 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 fragmentos 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 minutos) 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 x 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 X. Para a avaliação da microdureza, dezoito amostras de esmalte bovino de 3 x 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 Mellberg⁵⁵, em 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 para a escolha entre dentes de origem humana ou bovina.

White, Hays⁸³, em 1995, relatam que os dentes humanos extraídos são considerados uma fonte potencial de microrganismos patogênicos. A vascularização, presente nos tecidos pulpaes 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 de origem humana extraídos. 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 minutos (n=22), II – tratamento com óxido de etileno a 63°C durante 130 minutos (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 (Tryptic 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.

Um artigo de revisão de literatura realizada por Zero⁸⁹, em 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 blocos de esmalte em aparelhos removíveis, os que fixam os blocos de esmalte aos dentes naturais dos pacientes e os estudos realizados com amostras seccionadas (fixas 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 DeWald²⁴, em 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.³, em 1998, desenvolveram um estudo com o objetivo de avaliar a efetividade de métodos de esterilização para o esmalte dental utilizado em testes de cariogenicidade intra-orais, 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 – iodine-povidine 7,5% (pH 5,3 por 24 h). Após a esterilização, todas as amostras foram imersas em caldo nutriente e incubadas 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, todas as amostras foram imersas em solução desmineralizante (pH 4,5) para a produção de lesões de cárie. As amostras foram preparadas, analisadas em

microscópio de luz polarizada e submetidas à 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, com aumento de 450 X, comprovou a presença de lesões de cárie nas amostras de todos os grupos. Alterações macroscópicas na superfície do esmalte foram observadas nos grupos iodine-povidine (lesões brancas), hipoclorito de sódio (clareamento) e irradiação gamma (mudança para a cor creme). 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 Amaecha et al.², em 1999, quanto à sua influência sobre a estrutura das amostras de esmalte bovino com cáries artificiais. As lesões de cárie foram induzidas artificialmente 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 iodine-povidine 7,5% (durante 24 h). Após os procedimentos de esterilização, testes microbiológicos foram realizados para comprovar a eficácia dos métodos utilizados. As amostras dos grupos controles e experimentais foram, individualmente, colocadas em frascos contendo caldo nutriente BHI e incubadas a 37°C durante 7 dias em condições de aerobiose e anaerobiose. Após este período, o crescimento de microorganismos 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, as amostras dos grupos controles e esterilizados foram analisadas em microscópio de luz polarizada e submetidas 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 X, 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, as amostras do grupo esterilizado em 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 irradiação gamma alterou a coloração das amostras e das lesões para a cor creme. Embora não tenha sido significativo, foi observado um aumento na perda mineral das amostras do grupo esterilizado com iodine-povidine 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 amostras de esmalte utilizadas em testes de cariogenicidade.

Dando continuidade a esse estudo, Amaechi et al.⁴, também em 1999, avaliaram a capacidade da irradiação gamma de esterilizar amostras de esmalte bovino sem causar danos estruturais. Incisivos bovinos foram utilizados para a obtenção de 160 amostras de esmalte, divididas 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 das amostras. Após a irradiação, os grupos controle e experimentais tiveram suas amostras imersas, individualmente, em frascos contendo caldo nutriente e incubadas 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 amostra 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 as amostras 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 Sonju Clasen, Ogaard⁷², em 1999. Neste artigo de revisão, foram utilizados estudos de desmineralização in situ publicados até o início 1999, com o objetivo de avaliar a 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 da amostra 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.⁷⁶, em 2000, considerando a importância da esterilização das amostras de esmalte utilizadas nas pesquisas in situ, realizou um estudo para avaliar a influência dos métodos de esterilização sobre amostras de esmalte com lesões de cárie submetidas à ciclagem de pH acrescida de flúor. As amostras de esmalte foram esterilizadas por meio de autoclave ou exposição ao óxido de etileno, e tiveram seu comportamento comparado às amostras imersas em solução desinfetante a base de álcool. As amostras de esmalte foram obtidas a partir de dentes humanos, submetidas ao processo de indução de lesões de cárie por meio de imersão em solução desmineralizante. Em seguida, as amostras foram divididas 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 minutos). Após este procedimento, todas as amostras foram submetidas à ciclagem de pH com adição de flúor. Posteriormente, o flúor presente nas amostras 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 entre os 3 grupos. Os dados obtidos pelas microrradiografias demonstram que as amostras 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 das amostras, foi recomendado que a esterilização das amostras 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.²⁷, em 2001. Cento e dez molares hígidos 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*, microorganismo 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 microorganismo, selados com material restaurador e incubados por 20 horas 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 minutos) e XI – autoclave (115,5°C por 40 minutos). 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 microorganismos (turvação) foi verificada após 48 horas. Os resultados

obtidos demonstraram que apenas os procedimentos de emprego da autoclave (40 minutos) ou imersão em formalina 10% (1 semana) foram efetivos na inibição do crescimento microbiano em 100% das amostras avaliadas. 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, em 2003. Os dentes extraídos que contenham restaurações de amálgama e que forem destinados a finalidades educacionais ou de pesquisas, podem ser desinfectados 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 minutos, procedimento considerado efetivo na inativação dos microrganismos patogênicos, mas, que promove alterações estruturais nos tecidos dentais.

Rodrigues et al.⁶⁵, em 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 horas e 49 minutos a 27°C). Após a irradiação, as porções foram novamente seccionadas, e os grupos subdivididos em amostras polidas (controle e irradiado) e não polidas (controle e irradiado). O teste de microdureza superficial Knoop foi realizado nas amostras polidas dos grupos controle e irradiado, por meio de 5 indentações (25 gf por 5 seg). Em seguida, para avaliar a resistência à desmineralização, todas as amostras

foram submetidas 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 todas as amostras esterilizadas. No entanto, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes nos valores de microdureza superficial e perda mineral, quando as amostras esterilizadas foram comparadas com aquelas dos grupos controle. A perda mineral foi significativamente maior nas amostras polidas, tendo esse efeito ocorrido independentemente da esterilização. Dessa forma, foi concluído que a esterilização de amostras 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.⁴⁸ realizaram um estudo para avaliar a efetividade de diferentes métodos de esterilização de dentes. 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.

Berrocal et al.¹², em 2006, realizaram um estudo para avaliar a eficácia do laser erbio: yag como método de esterilização de estruturas dentais utilizadas em testes in vitro. Foram utilizados 47 dentes de origem humana, divididos em 4 grupos: I - controle – não esterilizado (n=10), II – irradiados com 250 mJ (n=13), III – irradiados com 350 mJ (n=12) e IV – irradiados com 450 mJ (n=12) de laser erbio: yag. Após o procedimento experimental, todos os dentes foram imersos em caldo nutriente e incubados por 72 h a 37°C, sob condições de aerobiose e anaerobiose. O crescimento de microorganismos foi verificado visualmente após 24, 48 e 72 h, pela presença ou ausência de turvação nos meios. Posteriormente, culturas microbiológicas foram realizadas em placas ágar sangue para confirmar os achados da inspeção visual. Os resultados obtidos indicam que o crescimento microbiológico ocorreu em 100% das amostras do grupo controle e foi estatisticamente diferente dos grupos irradiados. Nos grupos irradiados, a esterilização foi observada em 30,8, 58,4 e 66,7% das amostras dos grupos II, III e IV, respectivamente. Um aumento na porcentagem de amostras esterilizadas foi observado com o aumento da intensidade da irradiação. Dessa forma, o laser erbio: yag foi capaz de esterilizar parte das amostras avaliadas, e pode ser considerado, então, um método de desinfecção das estruturas dentais utilizadas em testes in vitro.

Os dentes extraídos, normalmente são armazenados em soluções antes de serem submetidos ao processo de esterilização. As soluções de armazenamento e os métodos de esterilização podem influenciar o desempenho destes tecidos em testes de cariogenicidade e o seu comportamento frente a materiais restauradores. Lee et al.⁵⁰, em 2007, realizaram um estudo para avaliar os efeitos das soluções de

armazenamento e dos métodos de esterilização sobre a força de adesão de uma resina à dentina. Foram utilizados 170 incisivos bovinos, divididos em 6 grupos com diferentes soluções de armazenamento: I – água destilada (n=30), II – cloreto de sódio 0,9% (n=30), III – cloramina-t 0,5% (n=30), IV – hipoclorito de sódio 5,25% (n=30), V – glutaraldeído 2% (n=30) e tampão formalina neutro 10% (n=20). Amostras dentais provenientes das coroas foram armazenadas por 60 dias a 37°C. Em seguida, para avaliar a influência dos métodos de esterilização, 10 amostras de cada grupo foram autoclavadas durante 40 minutos e, simultaneamente, outras 10 amostras de cada grupo (exceto do grupo tampão formalina), foram armazenadas em tampão formalina 10% por 14 dias. Após a esterilização, todas as amostras foram embutidas em resina epóxi, polidas, submetidas a condicionamento ácido e aplicação de adesivo. Cada amostra recebeu uma restauração em resina de 2,38 mm², que teve sua força de adesão avaliada após 24 h. Os resultados demonstram que a esterilização em autoclave altera significativamente a força de adesão das amostras dos grupos armazenados em água destilada (diminui), formalina (diminui) e hipoclorito de sódio (aumenta). Enquanto isso, as amostras dos grupos armazenados em cloreto de sódio e hipoclorito de sódio tiveram aumento significativo na força de adesão quando esterilizados por meio de formalina. A solução de armazenamento alterou significativamente a força de adesão, exceto na amostras do grupo formalina, que permaneceram nesta solução durante o armazenamento e esterilização. Dessa forma, foi concluído que a melhor opção para a esterilização de dentes bovinos utilizados em testes de adesão é a imersão em solução de formalina 10%.

Diferentes métodos comumente utilizados na desinfecção/esterilização de dentes extraídos foram avaliados por Lolayekar et al.⁵³ 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 minutos), VII – autoclave (121°C por 30 minutos) 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 horas. Após o período de incubação, o desenvolvimento de microorganismos 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 microorganismos 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 minutos) 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 minutos), 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.⁷⁵, em 2007, avaliaram a influência do método de esterilização por óxido de etileno na resistência à desmineralização de amostras de dentina e esmalte. Para isso, molares e pré-molares de origem humana foram utilizados para a obtenção de 32 amostras de esmalte e 32 amostras de dentina, com dimensões de 3,2 x 3,2 x 1,5 mm. Para cada tecido, 4 blocos de resina contendo 8 amostras foram confeccionados, de maneira que apenas uma face de cada amostra ficasse exposta. Dezesesseis amostras de cada tecido foram esterilizadas com óxido de etileno e outras

dezesseis foram reservadas como grupo controle (sem esterilização). Para análise da influência da esterilização sobre a perda mineral e a profundidade de lesão, as amostras foram submetidas à desmineralização por 2 semanas, tendo sido, em seguida, analisadas 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. 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.¹⁴, em 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 (2 na face vestibular e 2 na face lingual) de 6 nano-indentações, sob carga de 400 μ N em dentina e 2000 μ N em esmalte. O módulo elástico e a dureza de cada tecido foram calculados a partir dos valores obtidos por meio de nano-indentações. Os resultados obtidos para esmalte e dentina demonstraram que não ocorreu diferença estatisticamente significativa entre os grupos, tanto em relação ao módulo elástico 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.

3.2 Utilização da Irradiação por Microondas como Método de Esterilização

Em 1965, Olsen⁵⁹ avaliou a efetividade da irradiação por microondas na redução da quantidade de fungos presentes em pães. Esporos de três fungos comumente encontrados nesse tipo de alimento (*Aspergillus niger*, *Penicillium spp.* e *Rhizopus nigicans*) foram cultivados em tubos contendo caldo nutriente e incubados durante sete dias. Após a incubação, alíquotas contendo amostras deste foram inoculadas em fatias de pães produzidos com ou sem a incorporação de conservante. As fatias de pães foram irradiadas por 2 minutos em um aparelho de microondas não convencional a 5000 W. Após a irradiação, a região dos pães inoculada com os microrganismos foi removida, macerada e inserida em recipientes contendo 50 mL de água destilada. Os recipientes foram agitados por 10 minutos, e alíquotas da solução resultante foram semeadas em placas de Petri ou tiveram o número de esporos viáveis contados em uma câmara hemocitométrica. O número de colônias e de esporos viáveis foi comparado com amostras obtidas a partir de pães não irradiados, mas que foram submetidos à mesma temperatura atingida pela irradiação. Foi observado que os números de esporos viáveis e de colônias dos três fungos avaliados foram significativamente reduzidos após a irradiação por microondas. De acordo com o autor, foi demonstrado na literatura que as espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* são inativadas em temperaturas entre 54,11°C a 56,88°C, quando mantidas por 20 minutos. No entanto, a maior temperatura registrada no aparelho de microondas utilizado nesse estudo foi de 51,33°C. Considerando-se o tempo de exposição utilizado (2 minutos) e a incapacidade das amostras de pães utilizadas reterem a temperatura atingida por tempo maior do que 5 a 10 minutos, o autor concluiu que a redução no número de esporos após a irradiação não foi provavelmente

originada de um efeito térmico convencional. Além disso, foi sugerido que as soluções salinas presentes no citoplasma dos esporos poderiam representar um alvo preferencial para a energia de microondas, o que leva a temperatura interna desses microrganismos a exceder o suficiente para promover lise ou inativação.

O objetivo do estudo de Carrol, Lopez¹⁷, em 1969, foi avaliar a possibilidade da existência de um efeito não térmico de inativação de microrganismos pelas microondas. Para os procedimentos experimentais, foi utilizado um aparelho de microondas não convencional sob potência de 500 W. O efeito das alterações de pH sobre os microrganismos testados (*Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Bacillus subtilis*) foi avaliado por meio da imersão dos mesmos em diferentes soluções com pHs específicos. Para o cultivo nas placas de Petri, os microrganismos foram previamente inoculados em alimentos (leite, suco de tomate e suco de laranja) e irradiados por períodos entre 16 e 64 minutos. Os autores observaram que não houve diminuição significativa do número dos microrganismos testados nas soluções com diferentes valores de pH. Após a irradiação por microondas, não foi observada redução de *S. cerevisiae* e *E. coli* previamente inoculados no leite e no suco de tomate. Para o suco de laranja, foi observada redução progressiva dos números de microrganismos com o aumento do tempo de exposição às microondas. A variabilidade dos resultados obtidos levou os autores a sugerirem que a composição química da suspensão irradiada e a das células microbianas poderiam explicar os efeitos não térmicos provenientes das microondas. Além disso, os autores relataram que existe a possibilidade da ocorrência de lise celular devido à rápida oscilação das cargas celulares elétricas negativas em decorrência de interação com o campo eletromagnético das microondas. Essa oscilação, segundo os autores, pode exceder os limites elásticos da estrutura celular, promovendo seu rompimento. Foi também enfatizado que, como a energia

das microondas é absorvida seletivamente por certas moléculas constituintes de uma célula microbiana, tais como DNA ou proteínas essenciais, a desnaturação irreversível dessas estruturas pode ocorrer, e os microrganismos seriam inativados mesmo em níveis baixos de calor.

Culkin, Fung²³, em 1975, avaliaram a efetividade e o mecanismo de ação da irradiação por microondas na eliminação de microrganismos presentes em alimentos. Para a realização dos experimentos, as bactérias selecionadas (*Salmonella typhimurium* e *E. coli*) foram inoculadas em alimentos líquidos (sopa de tomate, sopa de vegetais e caldo de carne). O número de células viáveis tanto nos alimentos crus quanto nos cozidos, para porções individuais (200 mL) ou triplas (600 mL), foi determinado por semeadura em placas de Petri incubadas a 37°C por 24 horas. A irradiação das sopas inoculadas foi realizada em períodos superiores a 150 segundos para porções individuais e a 10 minutos para as porções triplas. Tiras térmicas de papel foram utilizadas nas mensurações das temperaturas das sopas irradiadas. Os resultados evidenciaram redução progressiva na viabilidade das bactérias avaliadas de acordo com o aumento do tempo de exposição às microondas. Foi observado padrão similar para o aquecimento das sopas avaliadas, de forma que a maior temperatura foi observada na região intermediária. Segundo os autores, se a ação letal da energia de microondas fosse atribuída ao efeito do calor produzido pelas microondas, seria esperado que os microrganismos da região de maior temperatura apresentassem os menores valores de viabilidade microbiana. Entretanto, foi evidenciado que os microrganismos nas regiões superficiais, de temperatura inferior, apresentaram menores níveis de viabilidade quando comparados aos das regiões intermediárias, que apresentaram maior temperatura. Considerando esses aspectos, os autores sugeriram que o mecanismo de ação das microondas sobre os microrganismos pode ser explicado não somente por um efeito térmico, produzido pelo calor gerado

com a irradiação, mas também por um provável efeito mecânico resultante da intensidade do campo das microondas.

Em 1977, vários experimentos foram realizados por Latimer, Matsen⁴⁹ com o objetivo de avaliar a eficácia da irradiação por microondas na inativação de bactérias patogênicas presentes em um ambiente laboratorial. As bactérias patogênicas gram-positivas e gram-negativas selecionadas (*B. subtilis*, *Enterobacter cloacae*, *K. pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *P. aeruginosa*, *Streptococcus alpha* hemolítico do grupo D, *Enterococcus* e *S. epidermidis*.) foram inoculadas em caldo nutriente e incubadas durante o período noturno a 35°C. Após a incubação, as culturas foram irradiadas por 15, 30, 45 ou 60 segundos. As amostras foram, então, diluídas e semeadas em placas de Petri contendo ágar tryptic soy. Além disso, tiras de papel contaminadas com esporos de *Bacillus stearothermophilus* foram irradiadas por um dos seguintes tempos experimentais: 15, 30, 45 e 60 segundos e 2, 3, 4 e 5 minutos. Após a exposição, as tiras foram inoculadas em caldo de tryptic soy e incubadas a 56°C por 72 horas. Em outro experimento, suspensões de esporos de *B. subtilis* foram irradiadas em tempos entre 15 segundos e 11 minutos e semeadas em placas de ágar tryptic soy para quantificação dos esporos viáveis. Além disso, os autores testaram a efetividade das microondas nos tempos de exposição de 5, 10, 15 e 20 minutos na desinfecção de embalagens autoclaváveis contendo placas de Petri plásticas com meio e cultura contaminado. Em seguida, tiras inoculadas com o meio de cultura irradiado foram incubadas em caldo de tryptic soy por 48 horas a 35°C. Os resultados desse estudo evidenciaram esterilização das bactérias patogênicas gram-positivas e gram-negativas selecionadas após 60 segundos de exposição às microondas. Por outro lado, as tiras de papel contaminadas com *B. subtilis* não foram esterilizadas após 11 minutos de irradiação por microondas. O tempo de exposição de 5 minutos às

microondas foi considerado adequado para assegurar a eliminação dos esporos de *B. stearothermophilus* presentes nas culturas puras e promover esterilização das placas contaminadas.

A efetividade da irradiação por microondas na esterilização de microrganismos patogênicos foi avaliada por Fitzpatrick et al.³¹, em 1978. Para os experimentos, foram utilizados tubos de ensaio contendo suspensão salina de *S. aureus*, esporos de *B. subtilis* ou tiras umedecidas com esporos de *B. subtilis*. Inicialmente, cada condição avaliada foi submetida a cinco irradiações sucessivas de 12 segundos a 1000 W. Esses experimentos demonstraram que o tratamento, apesar de ter sido efetivo para eliminar microrganismos em suspensão (*S. aureus*), foi insuficiente para inativar as formas esporuladas. A partir desses resultados, os autores realizaram experimentos com tiras contaminadas por esporos (*B. stearothermophilus* e *B. subtilis*) e umedecidas em água destilada. Em seguida, essas tiras foram irradiadas por períodos superiores a 15 e 30 minutos. No entanto, ainda foi observada cultura positiva para os esporos testados. Com base nessas observações, culturas desses esporos foram incubadas em outros tubos de ensaio abertos. Entretanto, os experimentos demonstraram crescimento em todas as culturas avaliadas. Considerando essas observações, os autores realizaram experimentos com tubos de ensaio vedados com roscas e verificaram que não houve crescimento nas culturas avaliadas pelo período de 7 dias. Foi concluído que a esterilização pela energia de microondas apresentou-se viável quando o conteúdo a ser irradiado era adequadamente selado e apresentava água suficiente para a produção de vapor. Com base nos resultados obtidos, os autores sugeriram que a esterilização ocorreu em decorrência de um efeito térmico.

Os efeitos subletais das microondas em células de *S. aureus* foram avaliados por Dreyfuss, Chipley²⁸, em 1980. Culturas desses microrganismos em meio líquido foram irradiadas por 10, 20, 30 e 40

segundos em forno de microondas a 2,45 MHz. Células não irradiadas foram utilizadas como controle e outras células foram submetidas a tratamento térmico em banho-de-água como parâmetro de comparação. Os microrganismos foram cultivados em caldo nutriente e sua viabilidade avaliada quantitativamente por contagem. As células foram centrifugadas e ressuspensas em 5 ml de água destilada para em seguida serem lisadas sob pressão. Os lisados e paredes celulares de células irradiadas durante 20 segundos foram analisados quanto a atividades enzimáticas e quanto ao conteúdo de proteínas totais, analisado por meio de um sistema colorimétrico. Algumas enzimas das células irradiadas tiveram sua atividade enzimática aumentada e outras, diminuída, tanto em relação ao grupo controle quanto em relação às células aquecida em banho-de-água. Os autores afirmaram que houve maior lise das células irradiadas resultando em uma maior concentração de proteínas nos extratos obtidos a partir dessas células e, ainda, puderam concluir que as microondas afetaram a atividade metabólica de *S. aureus* de uma maneira que não pôde ser atribuída somente por efeitos térmicos. Os autores destacaram a atividade da enzima termonuclease que está relacionada com a estimulação de crescimento das culturas até temperaturas próximas ao ponto de inativação térmica, que é a temperatura em que há uma redução significativa no número de células. De acordo com os resultados obtidos para essa enzima, altas atividades enzimáticas corresponderam a um grande número de células viáveis e baixas atividades corresponderam a baixos números de células.

Sanborn et al.⁶⁹, em 1982, realizaram um estudo com o objetivo de avaliar o efeito da irradiação por microondas na esterilização de recipientes plásticos para cultura de células. Recipientes estéreis de várias marcas e dimensões foram inoculados com meios de cultura contendo um dos seguintes microrganismos: *E. coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *K. pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Spondias lutea*, *Corynebacterium equi*,

Bacillus alvei, *Bacillus globigii* e *Streptococcus faecium*. Após a contaminação, os recipientes foram submetidos à irradiação por microondas por tempos de exposição de 0, 15, 30, 60, 120, 180, 240, 300 ou 600 segundos. Em seguida, as superfícies dos recipientes foram recobertas com meio de cultura, incubadas a 37°C por 48 horas e avaliadas quanto à presença de crescimento bacteriano. Além disso, os autores avaliaram se os recipientes de culturas poderiam ser lavados, esterilizados por microondas e reutilizados. Para esses experimentos, recipientes utilizados foram escovados com detergente para remoção de células aderentes e enxaguados quatro vezes com água deionizada. Após 2 horas em temperatura ambiente, os recipientes foram irradiados durante os tempos de exposição previamente selecionados. Em seguida, vários tipos de células foram colocados nos recipientes. O crescimento dessas células foi comparado com o de outras colocadas em recipientes novos quanto à capacidade de aderência e formação de monocamadas. Os resultados demonstraram que, após 3 minutos de irradiação, todos os recipientes contaminados com as bactérias selecionadas foram esterilizados. Os autores concluíram que não houve diferença no crescimento das células colocadas nos recipientes estéreis e não reutilizados em relação ao crescimento observado nos recipientes reutilizados após exposição às microondas.

O objetivo do estudo de Rohrer, Bulard⁶⁶, em 1985, foi avaliar a efetividade da irradiação por microondas na redução da infecção cruzada entre consultório odontológico e laboratório de prótese. Os autores realizaram os experimentos com os microrganismos inoculados em recipientes contendo caldo nutritivo, próteses acrílicas com e sem metal, brocas metálicas ou peças de mão. Esses materiais foram contaminados com os seguintes microrganismos: três tipos de bactérias aeróbicas não esporuladas (*S. aureus*, *S. epidermidis* e *K. pneumoniae*), uma bactéria aeróbica esporulada (*B. subtilis*), uma bactéria esporulada anaeróbica

(*Clostridium histolyticum*), um fungo (*C. albicans*) e dois vírus (pólio tipo 1 e *H. simplex* tipo 1). Para as irradiações no forno de microondas, os materiais foram ou não fixados a um dispositivo rotacional tridimensional desenvolvido pelos autores. Os materiais contaminados foram submetidos às microondas a uma potência de 720 W por 0, 1, 3, 5, 8 ou 10 minutos e incubados a 37°C. O *B. subtilis* foi também inoculado em tiras de papel irradiadas por 20 minutos. O crescimento dos microrganismos foi avaliado para todos os materiais após 24 e 48 horas pela análise da turvação do meio de cultura e pelo crescimento de colônias em placas de Petri. Para a avaliação da estabilidade dimensional, as próteses foram imersas em água por 15 minutos ou mantidas a seco antes da exposição às microondas. Os resultados obtidos demonstraram que a desinfecção por microondas obteve maior eficácia quando o dispositivo rotacional tridimensional foi utilizado. O caldo nutritivo contendo uma suspensão de quatro bactérias aeróbicas e *C. albicans* não demonstrou crescimento microbiano após 10 minutos de irradiação. A inativação da bactéria esporulada anaeróbica *C. histolyticum* foi observada após 3 minutos de irradiação. As tiras de papel com a bactéria esporulada aeróbica *B. subtilis* demonstraram esterilização apenas após 15 minutos de exposição às microondas. Após 10 minutos de irradiação, as brocas dentárias e as peças de mão contaminadas com uma suspensão de quatro bactérias aeróbicas foram esterilizadas. As próteses contaminadas com as suspensões individuais de quatro bactérias aeróbicas e do fungo apresentaram esterilização para todos os microrganismos testados após 8 minutos de irradiação. Quando uma mistura de suspensões desses microrganismos foi utilizada, a esterilização das próteses foi observada após 10 minutos de irradiação. Não foram observadas alterações dimensionais tanto para as próteses imersas previamente em água quanto para as mantidas a seco e expostas às microondas por até 16 minutos. Para uma esterilização efetiva de materiais odontológicos, os autores recomendaram a

irradiação por microondas associada à utilização do dispositivo tridimensional desenvolvido nesse estudo.

Young et al.⁸⁷, em 1985, avaliaram a efetividade da irradiação por microondas na esterilização de aparelhos nasais para sedação com óxido nitroso. Os autores utilizaram um forno de microondas equipado com um dispositivo rotacional tridimensional. Inicialmente, os aparelhos nasais foram esterilizados com óxido de etileno e, então, contaminados com rinovírus, vírus parainfluenza tipo 3, adenovírus tipo 1 e vírus *H. simplex* tipo 1. Os aparelhos inoculados foram irradiados por 0, 1, 2, 4, 6, 8 ou 10 minutos. Após a desinfecção, os microrganismos aderidos foram removidos das áreas contaminadas dos aparelhos por meio de enxágüe com meio de cultura. Duas amostras de 50 µL desse meio foram diretamente colocadas em duas monocamadas de células e, em seguida, foram realizadas diluições seriadas da solução resultante. A eliminação dos vírus testados após a irradiação por microondas foi avaliada em níveis de redução da formação de placa (CPE) nas monocamadas infectadas. Os experimentos foram realizados em triplicatas. Além disso, com o objetivo de avaliar a possibilidade de efeitos deletérios por exposições sucessivas às microondas, um aparelho nasal foi irradiado por 25 vezes com intervalos de 5 minutos entre cada exposição. De acordo com os resultados, após 4 minutos de exposição às microondas, todos os vírus avaliados foram completamente inativados. O aparelho nasal exposto por 25 vezes consecutivas às microondas não evidenciou nenhuma alteração quanto à textura e flexibilidade. Os autores concluíram que os aparelhos nasais para sedação com óxido nitroso contaminados por vírus podem ser esterilizados em forno de microondas apropriadamente modificado por um dispositivo rotacional tridimensional.

A efetividade da irradiação por microondas na esterilização de lentes de contato hidrófilas foi avaliada por Rohrer et al.⁶⁷, em 1986. Após a

esterilização em autoclave, as lentes de contato foram contaminadas com um dos seguintes microrganismos: *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *P. vulgaris*, *Bacillus cereus*, *E. coli*, *S. marcescens*, *Aspergillus fumigatus* e *C. albicans*. Em seguida, as lentes foram transferidas para casulos de hidratação estéreis e colocadas em embalagens autoclaváveis, que foram fixadas a um dispositivo tridimensional rotatório. As embalagens contendo as lentes de contato foram irradiadas a 700 W por 1, 2, 4, 6, 8 ou 10 minutos. Após a irradiação, as lentes foram transferidas para tubos de ensaio contendo meio de cultura e incubadas a 37°C por 24 horas. O crescimento microbiano foi avaliado pela turvação do meio de cultura. As amostras foram semeadas em placas de Petri e incubadas a 37°C por 48 horas ou 7 dias, de acordo com o microrganismo testado. Os experimentos foram realizados em triplicatas. Para a avaliação das possíveis alterações nas propriedades refringentes das lentes de contato após a irradiação, um par de lentes para hipermetropia foi exposto às microondas durante 10 minutos por 101 vezes. Além disso, um par de lentes de contato submetido a esse último tratamento foi preparado para avaliação em microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os resultados evidenciaram que a exposição às microondas resultou em desidratação das lentes de contato após um período de aproximadamente 2 minutos. Porém, uma nova hidratação com solução salina restaurou a forma e a aparência das lentes sem alterações microscópicas. Foi observada a presença de pequenas partículas nas superfícies das lentes de contato testadas para a refringência. A MEV demonstrou a presença de pequenas partículas de detritos com estrutura cristalina em ambas as lentes avaliadas. Os autores observaram que, para a esterilização completa das bactérias avaliadas, foram necessários 8 minutos de irradiação por microondas. Já a inativação de dois fungos patogênicos (*C. albicans* e *A. fumigatus*) foi observada após 4 minutos de exposição às microondas. Os autores atribuíram a efetividade da esterilização por microondas a um possível efeito

não-térmico proveniente dessa irradiação. Esse efeito seria explicado pela absorção das microondas em vários graus por moléculas fundamentais dos microrganismos, tais como os ácidos nucleicos.

Jeng et al.⁴⁵, em 1987, realizaram um estudo para avaliar a possível presença de efeitos não-térmicos das microondas sobre os microrganismos. Os autores utilizaram suspensões de esporos de *B. subtilis*. Aliquotas de 10 µL dessas suspensões foram inoculadas na região central do fundo de frascos de borosilicato. Após a secagem dessa alíquota, os recipientes foram colocados durante uma semana no interior de uma câmara contendo um béquer com cloreto de cálcio saturado. Amostras paralelas dos microrganismos foram simultaneamente expostas a seco em forno elétrico de propagação de calor ou em forno de microondas até as temperaturas de 107°C, 117°C, 130°C e 137°C. Uma sonda térmica registrou a temperatura dentro dos fornos e um dispositivo automático ajustou a temperatura do forno de propagação de acordo com a do forno de microondas. As amostras foram resfriadas e ressuspensas em 5 mL de água destilada para posterior semeadura em placas de Petri e contagem de colônias viáveis. De acordo com curvas de sobrevivência em função do tempo, os autores puderam verificar que não houve diferença significativa entre a exposição às microondas ou ao calor seco. Além disso, a inativação dos esporos foi observada após um tempo mínimo de 45 minutos de exposição para as duas formas de aquecimento avaliadas. Os autores concluíram que não há efeitos não-térmicos significativos em processos de esterilização por microondas a seco e que a atividade esporicida dessa energia é de origem térmica.

Molinari, Runnells⁵⁷, em 1991, observaram que alguns produtos apresentam apenas propriedades desinfetantes, não promovendo a esterilização. De acordo com os autores, a efetividade da solução desinfetante depende da concentração e do tipo de microrganismo, da concentração do desinfetante, do tempo de exposição e da quantidade de

detritos orgânicos acumulados. Também foi constatado que um desinfetante ideal deveria apresentar requisitos tais como ter amplo espectro, possuir ação rápida, não ser afetado por fatores físicos (sangue, saliva e matéria orgânica), não ser tóxico, apresentar compatibilidade de superfície (não se oxidar), apresentar efeito residual sobre as superfícies tratadas, ser de fácil utilização e ser inodoro e econômico. Os autores citaram também a classificação dos desinfetantes, de acordo com a sua atuação sobre os microrganismos, em três níveis: alto, intermediário e baixo. Um desinfetante de alto nível, como, por exemplo, a solução de glutaraldeído, seria capaz de inativar esporos de bactérias resistentes e outras formas bacterianas. Um desinfetante de nível intermediário, como os compostos à base de cloro, não seria capaz de inativar esporos, porém destruiria outras formas resistentes, como o bacilo da tuberculose. Os desinfetantes de baixo nível apresentariam restrita atividade antimicrobiana e, nesse grupo incluem-se os compostos quaternários de amônia, fenóis simples e detergentes que, embora possam inativar certos vírus, não destroem o bacilo da tuberculose e os fungos.

O efeito da irradiação de microondas na esterilização de instrumentais cirúrgicos contaminados com *C. albicans* foi avaliado por Rosaspina et al.⁶⁸, em 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 minutos. As amostras do grupo controle foram preparadas similarmente às irradiadas, sendo esterilizadas em estufa por 2 horas a 140°C ou em autoclave por 20 minutos a 121°C. Amostras adicionais foram imersas em banho de água fervente durante os mesmos tempos determinados para as exposições às microondas. 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 horas. Os resultados demonstraram esterilização das amostras após 2 minutos de irradiação por microondas. A análise em MEV revelou que alterações causadas pelas microondas para o microrganismo estudado foram proporcionais ao tempo de exposição testado. Quando amostras contaminadas foram colocadas em banho de água fervente por 9 minutos, foi verificada inativação microbiana, embora não tenham sido observadas modificações na morfologia celular dos microrganismos. Foi sugerido que as microondas 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 microondas 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 microondas também exerceriam um efeito mais complexo no corpo celular dos microrganismos. Esse efeito, segundo os autores, ainda precisa ser avaliado.

Atmaca et al.⁸, em 1996, avaliaram o efeito da irradiação por microondas 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 microondas a 550 W por 5, 6, 7, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25 e 30 segundos. Em seguida, cada suspensão foi diluída e cultivada em placas a 37°C por 24 horas 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 segundos, tempos

em que a contagem de bactérias foi significativamente reduzida. Suspensões de 5 mL de cada espécie bacteriana também foram irradiadas durante 14, 16, 18, 20, 25 e 30 segundos. Os resultados demonstraram que a redução na contagem de bactérias após a irradiação por microondas foi estatisticamente significativa em relação ao controle. A diminuição na contagem de bactérias expostas ao calor convencional foi significativa em relação às amostras irradiadas por microondas. Porém, diferentemente ao observado com as amostras irradiadas, a aplicação de calor convencional por 30 segundos resultou em sobrevivência bacteriana, de modo que tempos adicionais de 1 e 2 minutos de aplicação de calor convencional também foram avaliados. O aumento do volume das suspensões exacerbou o efeito destrutivo das microondas, 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 microondas 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 microondas.

Em 1996, Cole, Robinson²² relataram que, para selecionar adequadamente os microrganismos para estudos de efetividade de tratamentos químicos, é importante considerar os mecanismos de resistência germicida, bem como os conceitos de patógenos hospedeiros e indicadores. Com base em dados científicos publicados na literatura, os autores sugeriram que alguns grupos de microrganismos poderiam ser utilizados em pesquisas para a avaliação da efetividade de desinfecção de agentes químicos. Foi recomendada a utilização de formas bacterianas vegetativas gram-positivas, como *S. aureus*, e gram-negativas, como *P. aeruginosa*. Esses microrganismos apresentam resistência à inativação química, sendo a *P. aeruginosa* mais resistente a uma ampla variedade de classes de germicidas em relação ao *S. aureus*. Segundo os autores, de acordo com

padrões europeus e com um estudo que avaliou nove fungos expostos a sete germicidas, a *C. albicans* foi considerada o fungo mais resistente e, por isso, deveria ser utilizada em pesquisas de desinfecção. Os autores recomendaram a utilização de esporos bacterianos como *B. subtilis* e *B. stearothermophilus* ou, uma vez que esses microrganismos são mais resistentes à inativação por desinfecção. Segundo os autores, os patógenos sugeridos (bactéria gram-positiva, bactéria gram-negativa, fungo e esporo bacteriano) são considerados indicadores de esterilização e, portanto, podem ser utilizados na validação de métodos de desinfecção.

O efeito da irradiação por microondas na inativação de bactérias patogênicas foi avaliado por Wu⁸⁴, em 1996. Quatro bactérias consideradas indicadoras de esterilização foram selecionadas: *B. subtilis*, *S. aureus*, *Bacillus pumilis* E601 e *B. stearothermophilus*. Além disso, foram avaliados o *B. subtilis* var *nigar* e o *B. cereus*. Os materiais selecionados para a irradiação (placas, bastões e papéis para embalagens de comida) foram contaminados individualmente com uma das bactérias. Os materiais foram divididos em vários grupos, sendo submetidos à potência alta ou média por tempos de exposição entre 0 e 50 minutos. Após a irradiação de cada grupo, os materiais foram colocados em tubos de ensaio contendo ágar nutriente e incubados por 24, 48 e 2 horas. Foi observado que a inativação das bactérias sobre os itens contaminados não dependeu somente do tempo de exposição às microondas e dos tipos de materiais envolvidos, mas também da potência de irradiação utilizada e das espécies testadas. A bactéria *B. subtilis* foi considerada como ótima indicadora para a desinfecção por microondas, visto que necessitou de maior tempo de irradiação para ser eliminada (45 minutos em média potência ou 35 minutos em alta potência). Para os bastões e papéis para embalagens de comida, as outras bactérias testadas foram inativadas, em média, após 20 minutos em alta ou média potência.

Tarantino et al.⁷³, em 1997, avaliaram a efetividade das microondas na esterilização de espelhos odontológicos contaminados com microrganismos patogênicos (*S. aureus*, *B. subtilis* e *B. stearothermophilus*). Para simular condições clínicas, os instrumentos foram testados quando úmidos (irradiados imediatamente após a inoculação) e quando mantidos a seco (irradiados após 8 horas da inoculação). As irradiações foram realizadas a 650 W por 4 minutos em um aparelho de microondas em que o fabricante recomenda a imersão do material a ser irradiado em um líquido à base de aldeído. Para os experimentos, três diferentes grupos foram avaliados: I - os instrumentos foram imersos no líquido e submetidos às microondas, II - os instrumentos foram imersos em solução salina a 0,9% e submetidos apenas à irradiação no aparelho, e III - os instrumentos foram apenas imersos no líquido e colocados em forno comum a 25°C por 4 minutos, não sendo irradiados. Os autores observaram que a esterilização ocorreu somente quando o líquido sugerido pelo fabricante foi utilizado (Grupo III) ou quando a imersão no líquido foi associada às microondas (Grupo I). A utilização de irradiação sem imersão no líquido não demonstrou uma completa eliminação dos microrganismos avaliados. De acordo com os resultados obtidos, os autores sugeriram que, para se obter uma esterilização efetiva, os instrumentos deverão ser imersos no líquido proposto pelo fabricante e irradiados por microondas.

Webb et al.⁸¹, em 1998, avaliaram a efetividade da irradiação por microondas e da imersão em hipoclorito de sódio na desinfecção de próteses totais superiores. Após a esterilização em autoclave, as próteses foram inoculadas com *C. albicans* ou *S. gordonii* e incubadas a 37°C. Em seguida, metade das próteses de cada microrganismo foi utilizada como controle (não irradiadas), sendo imersas em solução salina. As próteses submetidas à desinfecção por microondas foram expostas a 350 W ou 604 W por 1, 2, 4, 6, 8 ou 10 minutos. As próteses selecionadas para desinfecção

química foram imersas por 8 horas em solução de hipoclorito de sódio a 1%, 0,02% ou 0,0125%. Todas as próteses foram submetidas aos procedimentos de semeadura em placas de Petri. Algumas amostras em resina acrílica de cada condição foram preparadas para MEV. Os resultados evidenciaram que a irradiação por microondas por 6 minutos foi efetiva na inativação de *C. albicans* e *S. gordonii*, apesar não ter removido os microrganismos não viáveis das superfícies acrílicas, conforme observado nas fotomicrografias. Além disso, a imersão das próteses por 8 horas em hipoclorito de sódio nas concentrações de 0,02% e 0,0125% inativou as células de *C. albicans* e reduziu o crescimento de *S. gordonii*, removendo parte dos microrganismos das superfícies das amostras. Os autores concluíram que a irradiação por microondas por 6 minutos foi mais efetiva para a esterilização de próteses que a imersão em hipoclorito de sódio, apesar de nenhum procedimento eliminar todos os microrganismos das superfícies.

O objetivo do estudo realizado por Border, Rice-Spearman¹³, em 1999, foi avaliar a efetividade da irradiação por microondas na esterilização de materiais laboratoriais (meios de cultura, gazes e algodão). Quatro bactérias (*S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, *E. coli* e *S. aureus*) e um fungo (*C. albicans*) foram inoculados individualmente em cinco tubos de ensaio contendo caldo nutriente e incubados a 37°C por 24 horas. A seguir, 25 mL de cada solução foram irradiados a 650 W por 5 segundos. Esse procedimento foi repetido e, após 15 segundos de intervalo, uma nova irradiação de 90 segundos foi realizada. Os meios de cultura irradiados foram semeados em placas de Petri incubadas a 37°C por 24 horas. Chumaços de algodão e gazes foram imersos separadamente no meio de cultura inoculado, irradiados por 15 segundos a 650 W e novamente irradiados por 90 segundos. Após as irradiações, as gazes e os chumaços de algodão foram semeados por esfregaço em placas de Petri incubadas a 37°C por 24 horas. As colônias foram quantificadas em números por quadrante. Além

disso, um frasco contendo caldo nutriente não inoculado foi irradiado em intervalos de um minuto até um total de 5 minutos, sendo semeados em placas de Petri a cada intervalo. As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas. Os resultados demonstraram que foram necessários 60 segundos de irradiação para a esterilização de todos os microrganismos presentes no meio de cultura, nas gazes e nos chumaços de algodão. Além disso, os autores verificaram que, para esterilizar o meio de cultura não inoculado, foram necessários 3 minutos de exposição às microondas. Os autores concluíram que a irradiação por microondas foi efetiva para esterilização dos materiais laboratoriais avaliados.

Em 1999, Dixon et al.²⁵ avaliaram a efetividade da irradiação por microondas na desinfecção de resinas acrílicas contaminadas com *C. albicans* e o seu efeito sobre a dureza desses materiais. Na fase 1 do experimento, foram confeccionados 45 corpos-de-prova (10 mm x 10 mm x 3 mm) de cada material, sendo três rembasadores resilientes (Molloplast-B, Permaflex e/ou Permasoft) e uma resina termopolimerizável (Lucitone 199). Os corpos-de-prova foram submetidos aos ensaios de dureza (durômetro Shore A) e então inoculados com *C. albicans*. Após 48 horas, 30 corpos-de-prova foram irradiados a seco por 5 minutos em potência máxima, e o crescimento microbiológico foi avaliado por semeadura em placas de Petri. A esterilização em longo prazo (duas semanas) foi observada pela análise de crescimento visível no caldo de tioglicolato contendo os corpos-de-prova irradiados. Após 2 semanas, as leituras de dureza foram realizadas novamente para todos os corpos-de-prova. Para a fase 2, 15 corpos-de-prova de cada material foram irradiados a seco pelos tempos de exposição de 10 ou 15 minutos e submetidos aos ensaios de dureza. Na fase 3, 15 corpos-de-prova de cada material foram imersos em água e irradiados por 5 minutos em potência máxima. Para avaliar o efeito desse procedimento sobre a dureza, os corpos-de-prova foram irradiados por 5 vezes. De acordo

com os resultados, a irradiação a seco por 5 minutos não esterilizou nenhum dos materiais avaliados. Após 10 e 15 minutos de irradiação a seco, não houve esterilização dos corpos-de-prova de todos os materiais avaliados. A esterilização foi observada somente após a irradiação por microondas por 5 minutos quando os corpos-de-prova foram imersos em água. Os corpos-de-prova de todos os materiais não imersos e irradiados por 15 minutos e os imersos em água e irradiados por 5 minutos não apresentaram alteração de dureza clinicamente significativa. As cinco irradiações consecutivas de um mesmo corpo-de-prova resultaram em alteração significativa na dureza do material PermaSoft. Com base nos resultados, os autores concluíram que 5 minutos de exposição às microondas foram suficientes para inativar a *C. albicans* presente nos materiais avaliados desde que os corpos-de-prova estivessem imersos em água durante a irradiação.

O mecanismo de transferência transitória de calor de uma suspensão de *S. aureus* após a irradiação por microondas foi avaliado por Yeo et al.⁸⁶, em 1999. Culturas bacterianas de *S. aureus* foram inoculadas em meio nutriente, incubadas a 37°C por 8 horas e centrifugadas por 10 minutos. Para a exposição às microondas, foram utilizadas suspensões bacterianas em meio de cultura e em água destilada estéril. Alíquotas de 15 µL dessas suspensões foram pipetadas sobre as superfícies de discos estéreis de aço inoxidável (15 mm x 5 mm). Adesivos indicadores de temperatura foram aplicados nesses discos. Em seguida, os discos foram irradiados a 800 W, em vários tempos de exposição. As potências absorvidas pelos discos de aço inoxidável e pelas suspensões bacterianas foram calculadas por uma equação de condução térmica. A análise de transferência de calor entre o microrganismo e a água destilada foi avaliada por um método específico capaz de calcular o nível tempo-dependente de absorção de energia do microrganismo e do seu líquido circundante ao mesmo. Os resultados evidenciaram que a viabilidade celular foi reduzida

com o aumento do tempo de exposição, havendo uma inativação completa da suspensão bacteriana após 110 segundos, quando a temperatura atingiu o valor de 61,4°C. O baixo índice de aumento de temperatura da suspensão bacteriana quando comparada com água destilada estéril ou meio de cultura testados sem a suspensão bacteriana foi atribuído pelos autores a uma significativa influência da eficácia de esterilização pelas microondas nas propriedades térmicas dos microrganismos. Os autores concluíram que, quando a suspensão bacteriana sobre o disco de aço inoxidável foi submetida às microondas, a condução de calor do disco de aço para a suspensão foi a causa do efeito bacteriostático, com absorção de 23,8 W de potência pelo aço e de 0,16 W pela suspensão bacteriana. Dessa forma, os autores sugeriram que a ação de eliminação de *S. aureus* em discos de aço inoxidável foi principalmente atribuída à transferência de calor do substrato de aço, com pouca energia absorvida diretamente da irradiação por microondas.

Watanabe et al.⁷⁹, em 2000, investigaram o efeito dos componentes iônicos na inativação de microrganismos pela irradiação por microondas. As suspensões microbianas utilizadas (*E. coli*, *S. aureus* e *C. albicans*) apresentaram uma concentração inicial de 2×10^7 ufc/mL. Periodicamente, concentrações de NaCl, KCl e sacarose foram adicionadas às suspensões resultantes. Tubos de ensaio com a suspensão resultante foram colocados individualmente em Erlenmeyer contendo água e mantidos a 30°C por 5 minutos. A seguir, cada Erlenmeyer foi irradiado a 500 W por vários tempos experimentais e amostras da solução irradiada foram utilizadas para a contagem dos microrganismos viáveis. A temperatura das suspensões microbianas foi determinada com o auxílio de um termômetro digital. Os resultados evidenciaram que os microrganismos avaliados foram inativados após 50 segundos de irradiação. A temperatura das suspensões microbiológicas aumentou de 30°C para 100°C após 30 segundos de

irradiação a 500 W. Quando a temperatura inicial foi mantida a 0,5°C, a temperatura das suspensões aumentou para 28°C após 30 segundos de irradiação e, nessas condições, as células de *E. coli* não foram inativadas. De acordo com os resultados, os autores sugeriram que o efeito das microondas sobre os microrganismos foi principalmente devido ao calor gerado nas suspensões das células microbianas. Além disso, foi observado que as células microbianas foram inativadas com o aumento das concentrações de NaCl e KCl. Por outro lado, variando-se as concentrações de sacarose, houve mínima alteração de temperatura e a inativação das células microbianas foi pouco afetada. Para explicar esses resultados, os autores avaliaram o efeito das condições utilizadas no frasco de Erlenmeyer no aumento da temperatura do líquido contido nos tubos de ensaio colocados no frasco. Para este procedimento, os autores colocaram os tubos de ensaio com líquido (água ou solução de NaCl) em Erlenmeyers vazios ou cheios de líquido (água ou solução de NaCl). Foi verificado que o líquido no interior do tubo de ensaio aqueceu mais rapidamente quando o Erlenmeyer estava vazio. Essa observação foi atribuída ao fato da energia de microondas ter penetrado diretamente no líquido do tubo de ensaio, uma vez que não havia líquido no Erlenmeyer. No entanto, quando o Erlenmeyer estava com a solução de NaCl, o líquido no interior dos tubos de ensaio aqueceu muito menos que a solução do frasco. Os autores concluíram que, quando o volume da solução irradiada é menor ou quando a área superficial exposta às microondas é ampla, há maior possibilidade da irradiação por microondas aquecer todo o líquido contendo substâncias com alta perda dielétrica.

Hiti et al.³⁸, em 2001, avaliaram o efeito da irradiação por microondas na desinfecção de recipientes para armazenagem de lentes de contato contaminados com *Acanthamoeba*. Recipientes para armazenagem de lentes de contato foram contaminados com três diferentes espécies de

Acanthamoeba (*A. comandoni*, *A. castellanii*, *A. hatchetti*), nas formas de trofozoítos e cistos. Foi também avaliado o efeito das microondas sobre cistos de *Acanthamoeba* completamente desidratados. A irradiação por microondas para cada recipiente foi realizada a 600 W por 3, 5 ou 8 minutos. Em seguida, esfregaços da parte interna dos recipientes foram semeados em placas de Petri incubadas a 30°C por 14 dias. Os autores observaram que a irradiação por microondas foi efetiva na esterilização dos recipientes contaminados com as três espécies de *Acanthamoeba* após 3 minutos de exposição a 600 W. Além disso, a desidratação dos cistos de *Acanthamoeba* reduziu sua susceptibilidade às microondas, uma vez que houve crescimento microbiano independentemente do tempo de exposição utilizado. Os autores enfatizaram que os materiais contendo água são aquecidos pela vibração molecular e, como a célula biológica é caracterizada por um alto conteúdo de água, os microrganismos se tornam sensíveis à irradiação por microondas. Uma vez que a célula desidratada não apresenta essa vibração molecular, a efetividade das microondas se torna reduzida.

A efetividade da irradiação por microondas na esterilização de resinas acrílicas para reembasamento imediato foi verificada por Neppelenbroek et al.⁵⁸, em 2003. Para isso, três resinas foram utilizadas (Kooliner, Tokuso Rebase Fast e Ufi Gel Hard C). Oitenta corpos-de-prova de cada resina foram confeccionados nas dimensões de 10 mm x 10 mm x 1 mm e submetidos à esterilização por óxido de etileno. Posteriormente, as amostras foram individualmente inoculadas com os microrganismos selecionados para pesquisa (*C. albicans*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *B. subtilis*). Após inoculação, 40 corpos-de-prova de cada material foram imersos em 200 mL de água e submetidos à irradiação por microondas por 6 minutos a 650 W. Os outros 40 corpos-de-prova de cada material foram usados como controle positivo. Pela análise dos resultados, todos os corpos-de-prova submetidos por 6 minutos de irradiação a 650 W mostraram-se

livres de microrganismos, sem evidência de crescimento após 48 horas e 7 dias. As amostras do controle positivo mostraram crescimento de microrganismos após 48 horas de incubação. Portanto, todos os corpos-de-prova imersos em água foram esterilizados pelas microondas a 650 W por 6 minutos.

Celandroni et al.¹⁹, em 2004, realizaram um estudo com o objetivo de comparar a eficácia e os mecanismos da inativação de *B. subtilis* por meio da irradiação por microondas e por meio do mecanismo de aumento de temperatura convencional. Foram utilizados os mesmos valores de temperatura em ambos os métodos de esterilização avaliados. Os resultados demonstraram que, apesar de ambos os tratamentos apresentarem características semelhantes em relação à oscilação provocada no interior celular, a conformação estrutural dos esporos foi significativamente diferente entre os dois métodos. Os autores concluem que a irradiação por microondas pode ser considerada tão efetiva quanto o mecanismo de aquecimento convencional na eliminação de esporos de *B. subtilis*. No entanto, o campo eletromagnético exercido pelas microondas é capaz de alterar a estrutura e/ou os componentes moleculares dos esporos de *B. subtilis* de uma forma que não pode ser atribuída apenas ao aumento de temperatura.

O estudo realizado por Silva et al.⁷¹, em 2006, teve por objetivo avaliar a efetividade da irradiação por microondas na esterilização de próteses totais. Oitenta próteses totais padronizadas foram confeccionadas e submetidas à esterilização com óxido de etileno. As próteses foram então individualmente inoculadas com caldo de cultura tryptic soy contendo um dos seguintes microrganismos: *C. albicans*, *S. aureus*, *B. subtilis* e *P. aeruginosa*. Após 48 horas de incubação a 37°C, 40 próteses foram imersas em 200 mL de água destilada estéril e irradiadas a 650 W por 6 minutos. Quarenta próteses não irradiadas foram utilizadas como controle. A seguir, 25 µL da suspensão resultante das diluições seriadas de 10⁻¹ a 10⁻⁶ foram semeados

em placas de Petri contendo os meios de cultura seletivos para cada microrganismo. Todas as placas foram incubadas a 37°C por 48 horas. Após a incubação, as colônias foram quantificadas em ufc/mL. Para a verificação da efetividade da exposição às microondas em longo prazo, as próteses irradiadas foram imersas em béqueres contendo caldo de tryptic soy e incubadas a 37°C por 7 dias. As placas de Petri referentes às próteses contaminadas com *C. albicans*, *S. aureus* e *B. subtilis* não demonstraram presença de colônias viáveis após 48 horas de incubação. Nesse mesmo período, um número reduzido de colônias viáveis foi observado em duas placas de Petri referentes às próteses contaminadas com *P. aeruginosa*. Após 7 dias, houve crescimento microbiológico em três béqueres, sendo dois para *P. aeruginosa* e um para *B. subtilis*. Todas as próteses totais do grupo controle apresentaram crescimento microbiano nas placas de Petri após 48 horas. Os autores concluíram que a irradiação por microondas por 6 minutos a 650 W promoveu esterilização das próteses totais contaminadas com *C. albicans* e *S. aureus* e desinfecção daquelas contaminadas com *P. aeruginosa* e *B. subtilis*.

O objetivo do estudo de Campanha¹⁵, em 2007, foi investigar os efeitos da irradiação por microondas sobre células de *C. albicans* por meio de parâmetros de contagem celular e de liberação de substâncias intracelulares. Foram obtidas culturas de *C. albicans* de 24 horas em caldo de tryptic soy a partir de cepas padrão. As células foram centrifugadas, lavadas e ressuspensas em 400 mL de água destilada gelada na concentração de 108 org/mL. Essa suspensão foi dividida em experimental e controle. A suspensão experimental (200 mL) foi colocada em um béquer contendo uma prótese total acrílica estéril e irradiada por microondas a 650 W por 6 minutos. A suspensão controle não foi submetida à irradiação. Para ambas as suspensões, foram realizadas diluições seriadas para contagem celular em câmara de Neubauer, utilizando a entrada do corante azul de

metileno como indicativo de alteração de permeabilidade de membrana. Alíquotas diluídas também foram semeadas em ágar Sabouraud. Alíquotas não diluídas foram analisadas quanto à densidade óptica. Para a quantificação de substâncias liberadas, as células foram eliminadas das suspensões por centrifugação e filtração e a solução resultante foi liofilizada. O conteúdo liofilizado foi ressuspenso em 5 mL de água destilada e analisado pelos seguintes métodos: Microprote e Sensiprote, para quantificação de proteínas, potenciometria, para quantificação de Na^+ e K^+ , Liquiform, para quantificação de Ca^{++} , e DO a 260 nm para quantificação de ácidos nucleicos. Todos os testes foram realizados em duplicata e repetidos em 8 dias diferentes. Não foram encontradas diferenças entre as suspensões experimental e controle quando foram comparadas as suas médias de densidade óptica. As células da suspensão controle apresentaram-se íntegras, enquanto as da suspensão experimental não apresentaram integridade de membrana de acordo com a entrada do azul de metileno. Não foram observadas colônias viáveis de *C. albicans* nas placas de Petri da suspensão experimental, enquanto a suspensão controle apresentou contagens da ordem de 10^8 ufc/mL. A liberação de proteínas da suspensão experimental foi significativamente maior do que a da suspensão controle, tanto pelo sistema Microprote quanto para o sistema Sensiprote. A liberação de K^+ , Ca^{++} e ácidos nucleicos da suspensão experimental foi significativamente maior do que a da suspensão controle. Pela técnica de potenciometria, não foi detectada a presença de Na^+ em nenhuma das suspensões. Foi concluído que, para a maioria dos parâmetros utilizados, a suspensão experimental apresentou valores significativamente menores de contagem de células e maiores de substâncias liberadas. Entretanto, a irradiação por microondas não causou redução na densidade óptica das células em suspensão.

A efetividade de diferentes tempos de exposição à irradiação por microondas na desinfecção de uma resina reembasadora rígida foi avaliada por Mima et al.⁵⁶, em 2008. Amostras estéreis foram inoculadas com um dos microorganismos testados (*P. aeruginosa*, *S. aureus*, *C. albicans* e *B. subtilis*) e, em seguida, incubadas a 37°C durante 24 horas. Nos grupos referentes a cada microorganismo, 10 amostras não foram submetidas à irradiação (controle) e 50 foram irradiadas por microondas. As amostras referentes aos controles foram individualmente imersas em solução salina estéril e alíquotas referentes às diluições seriadas foram plaqueadas em meio seletivo de acordo com cada microorganismo avaliado. As amostras irradiadas foram imersas em água e submetidas à irradiação por microondas a 650 W por 1, 2, 3, 4 ou 5 minutos. Em seguida, foram realizadas diluições seriadas e plaqueamento. Após 48 horas de incubação, foi realizada a quantificação das unidades formadoras de colônias. As amostras irradiadas também foram submetidas à incubação por 7 dias. Algumas amostras foram preparadas para análise por microscopia eletrônica de varredura. Os resultados obtidos indicaram que as amostras irradiadas por 3, 4 ou 5 minutos foram esterilizadas. As amostras referentes ao microorganismo *C. albicans* foram esterilizadas quando submetidas a 2 ou mais minutos de irradiação por microondas, enquanto que as amostras referentes aos demais microorganismos foram apenas desinfetadas. A utilização de irradiação por microondas durante 1 minuto não inibiu o crescimento dos microorganismos. Portanto, a efetividade da irradiação por microondas aumentou em função do aumento do tempo de irradiação utilizado. Os autores sugeriram que a utilização da irradiação por microondas durante 3 minutos é adequada para promover a esterilização de resina reembasadora rígida e prevenir a ocorrência de contaminação cruzada.

Os mecanismos de inativação de *B. subtilis* por meio da irradiação por microondas sob alta potência foram avaliados por Kim et al.⁴⁷,

em 2008. A irradiação por microondas foi realizada sob potência de 2000 W e a análise das células irradiadas foi feita por meio de microscopia eletrônica de transmissão e quantificação da liberação de proteínas e ácidos nucleicos intracelulares. Os resultados indicaram que a irradiação por microondas promoveu uma liberação menor de proteínas em comparação com as células submetidas apenas ao aumento de temperatura (não irradiadas). Em relação à análise ultra-estrutural, apenas as células expostas às microondas apresentaram alterações, evidenciadas pelo rompimento da parede celular. Portanto, os mecanismos de inativação microbianos exercidos por meio da irradiação por microondas incluem danos à parede celular, ruptura do DNA e coagulação das proteínas citoplasmáticas em função do aumento da temperatura, e ainda, que estes efeitos apresentam características morfológicas distintas das células não irradiadas.

A desinfecção de próteses totais por meio de irradiação por microondas tem sido recomendada para o tratamento da estomatite protética em pacientes que não apresentam comprometimento do sistema imunológico. Considerando que a candidose é uma manifestação freqüente em pacientes infectados com HIV, Sanitá et al.⁷⁰, em 2008, realizaram um estudo com o objetivo de avaliar a efetividade da irradiação por microondas na desinfecção de próteses totais inoculadas com ATCC (American Type Culture Collection) e cinco espécies de *Candida* isoladas de pacientes HIV. Cinquenta próteses totais foram confeccionadas, esterilizadas e inoculadas com os seguintes microorganismos: *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. krusei*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*. Após incubação a 37°C durante 48 horas, as próteses foram irradiadas por microondas durante 3 minutos a 650 W. Próteses não submetidas à irradiação foram utilizadas como controles positivos. Alíquotas referentes às suspensões foram plaqueadas nas diluições 10⁻¹ a 10⁻⁴ e incubadas por 48 horas a 37°C. Após o período de incubação, foi realizada a quantificação das unidades formadoras de

colônias. Os resultados obtidos indicaram que todas as próteses contaminadas, independente do microorganismo, foram esterilizadas após a irradiação por microondas. Foi observado o desenvolvimento de microorganismos em todas as placas referentes às próteses do grupo controle. Os valores de ufc/mL observados foram significativamente maiores para *C. glabrata* e significativamente menores para *C. krusei*. Os valores de ufc/mL também foram significativamente maiores para as amostras obtidas dos pacientes em relação às amostras ATCC. Os autores concluíram que a irradiação por microondas durante 3 minutos a 650 W foi capaz de esterilizar todas as próteses totais avaliadas.

3.3 Avaliação das alterações minerais ocorridas no esmalte

Em 1983, Featherstone et al.³⁰ desenvolveram um estudo visando viabilizar a comparação direta entre os resultados obtidos por análises de microrradiografia quantitativa e microdureza, por meio da utilização de amostras de esmalte humano contendo cáries artificiais. Coroas contendo lesões de cárie artificiais foram seccionadas na porção central da lesão e cada uma das metades da amostra foi analisada por uma das duas técnicas. As análises de microrradiografia e microdureza foram realizadas nas regiões da superfície do esmalte, da lesão de cárie e na camada de esmalte subjacente à lesão. Os dados obtidos pela análise por microrradiografia, expressos em porcentagem de volume mineral, apresentaram uma relação linear com a raiz quadrada os valores de microdureza Knoop. A relação linear entre os dois métodos de análise foi estabelecida para o esmalte hígido e para o esmalte que contém lesão artificial de cárie. Dessa forma, os autores concluíram que tanto a análise por microrradiografia, quanto a análise da microdureza são efetivas na

determinação do conteúdo mineral do esmalte submetido a desafios cariogênicos.

Considerando a especificidade dos estudos cariogênicos atuais e a necessidade da análise precisa das alterações ocorridas no conteúdo mineral dos tecidos dentais desmineralizados, Ten Bosch, Angmar-Mansson⁷⁴, em 1991, realizaram uma revisão de literatura abordando os métodos quantitativos de análise mineral existentes. Tendo em vista a necessidade de preparo das amostras para a realização das avaliações, os autores dividiram os métodos de análise mineral em não destrutivos e destrutivos. Os métodos não destrutivos foram considerados aqueles que possibilitam a realização de análises longitudinais na mesma amostra. Diversas tecnologias disponíveis foram revisadas e os princípios básicos de cada uma foram sumarizados e as características foram discutidas. Todos os métodos avaliados foram abordados quanto à correlação existente entre a medida parâmetro e a perda mineral e, ainda, em relação à caracterização e reprodutibilidade dos resultados. No caso dos artigos que não forneciam tais informações, estas foram calculadas com base nos dados disponíveis na literatura. Poucos estudos comparativos foram encontrados, tendo em vista a grande quantidade de métodos de avaliação do conteúdo mineral utilizados pelos estudos de cariogenicidade. Os autores recomendam que a escolha do método de análise a ser utilizado envolva preferivelmente aqueles do tipo não destrutivo, possibilitando uma maior padronização e, posteriormente, a realização de estudos comparativos.

As diferentes técnicas de análise da porcentagem mineral do esmalte e da dentina, hígidos e cariados, foram avaliadas por Arends, Ten Bosch⁵, em 1992. Foi observado que a avaliação do esmalte por meio de testes de microdureza em secção longitudinal proporciona uma análise indireta das alterações ocorridas no conteúdo mineral das amostras. O parâmetro delta Z, foi definido como a diferença integrada entre o volume

mineral da amostra desmineralizada e o volume mineral da amostra hígida e, dessa forma, amostras submetidas a um processo de desmineralização apresentarão altos valores de delta Z e, após um processo de remineralização, as mesmas amostras indicarão valores diminuídos de delta Z. Assim, a utilização do parâmetro delta Z foi considerada um dos principais métodos para a análise da perda e ganho mineral dos tecidos dentais.

A influencia da presença do flúor nos estágios iniciais de desenvolvimento de lesões de cárie em esmalte humano foram avaliados por Argenta et al.⁷, em 2003. Visando avaliar os estágios iniciais de desenvolvimento das lesões de cárie, o modelo de ciclagem de pH descrito por Featherstone et al.³⁰, (1986) foi modificado com o objetivo de preservar a superfície do esmalte e possibilitar a realização de testes de microdureza superficial e microdureza em secção longitudinal. A validação do modelo proposto foi realizada por meio de uma avaliação dose-resposta em relação à presença de flúor. Amostras de esmalte humano tiveram os valores de microdureza superficial determinados e foram divididas em 4 grupos: controle (água deionizada) e submetidos à ciclagem de pH com soluções contendo 70, 140 e 280 ppm de flúor. Foram realizadas análises das alterações ocorridas nos valores de microdureza superficial e ΔZ (perda mineral). Os resultados obtidos demonstraram a presença de correlações negativas e estatisticamente significantes entre as diferentes concentrações de flúor e a perda mineral observada no esmalte. Os autores concluíram o flúor promove aumento na resistência à desmineralização das amostras submetidas ao desafio cariogenico e que o modelo de ciclagem proposto foi capaz de detectar as alterações ocorridas nas camadas mais superficiais do esmalte.

Rodrigues et al.⁶⁴, em 2005, realizaram um estudo in situ com o objetivo de avaliar as alterações ocorridas na microdureza do esmalte após a realização de clareamento em consultório ou do tipo caseiro. O experimento foi realizado com a utilização de amostras de esmalte fixadas

temporariamente aos dentes dos pacientes. Oitenta e oito amostras de esmalte humano passaram por um processo de polimento e foram submetidas a testes de microdureza Knoop. As amostras de esmalte foram fixadas nas superfícies vestibulares dos primeiros molares de 44 pacientes selecionados para este estudo. Os pacientes foram, então, divididos em quatro grupos (n=11), com os seguintes protocolos de tratamento: G1 – peróxido de carbamida 37% (consultório) + peróxido de carbamida 10% (caseiro), G2 - peróxido de carbamida 37% (consultório) + placebo (caseiro), G3 – placebo (consultório) + peróxido de carbamida 10% (caseiro) e G4 – placebo (consultório) + placebo (caseiro). Após 3 semanas de tratamento, novos testes de microdureza foram realizados. A análise dos resultados obtidos demonstrou a ocorrência de diferenças estatisticamente significantes entre os valores de microdureza iniciais e finais para cada grupo. Foi observada uma redução de 6.8% no G1, 4.1% no G2, 3.4% no G3 e 3.5% no G4. Os clareamentos realizados em consultório com peróxido de carbamida 37%, em casa com peróxido de carbamida 10% e a combinação dos dois tratamentos resultaram em menores valores de microdureza do esmalte, avaliada imediatamente após a finalização do tratamento. Entretanto, os efeitos destes tratamentos em longo prazo não foram estabelecidos. Foi sugerido que em condições clínicas, estes efeitos sejam insignificantes, devido à pequena redução observada nos valores de microdureza do esmalte.

Visando estabelecer metodologias específicas para a verificação da relação dose-resposta em amostras de esmalte bovino utilizadas em estudos de cariogenicidade, Vieira et al.⁷⁸, em 2005, desenvolveram um estudo onde estas amostras foram submetidas à ciclagem de pH com adição de flúor. Foram utilizadas amostras de esmalte provenientes de dentes bovinos. A imersão em solução a base de formol foi utilizada como método de desinfecção. A análise consistiu na realização de 6

tipos de modelos de ciclagens, constituídos por diferentes soluções, pHs e, também, períodos de desmineralização e remineralização distintos. Cada modelo de ciclagem consistiu em um tipo de desafio cariogênico. Foram utilizados quarenta blocos de esmalte em cada grupo, submetidos a 6 dias de ciclagem sob temperatura de 37°C. Dentre os modelos de ciclagem avaliados, dois deles já apresentavam alta padronização e elevado nível de precisão e, foram utilizados como padrão de comparação. Nos demais modelos de ciclagem, o flúor teve sua concentração gradualmente reduzida, e seu efeito sobre os processos de desmineralização e remineralização foi avaliado por meio dos valores de perda mineral. Os resultados obtidos demonstraram que a o desenvolvimento de modelos específicos de ciclagem possibilitam a verificação dos benefícios proporcionados pela utilização de flúor nos dentífricos. Porém, de acordo com o estudo, é necessária a validação de modelos específicos para a análise do processo de cárie.

A utilização das ondas terahertz para a avaliação de tecidos mineralizados é considerada uma técnica de análise relativamente nova, de origem não ionizante e que apresenta vantagens como a manutenção da integridade da amostra. Assim, Pickwell et al.⁶⁰ (2007) avaliaram a capacidade das ondas terahertz na detecção de lesões de cárie durante diferentes fases do processo de des- e remineralização do esmalte dental. Uma análise comparativa entre utilização das ondas terahertz e de microrradiografias foi realizada em amostras de esmalte submetidas a um desafio cariogênico in vitro. Amostras de esmalte bovino, contendo lesões de cárie produzidas artificialmente foram submetidas a diferentes níveis de desmineralização por meio da utilização de gel ácido ou carboprol e, e seguida, foram analisadas pelas duas técnicas. Os valores obtidos pela análise por meio das ondas terahertz e pelas microrradiografias referentes às amostras desmineralizadas apresentaram um alto coeficiente de precisão ($r^2=0,995$). Uma análise detalhada dos resultados foi realizada. Este estudo

concluiu que a utilização das ondas terahertz pode fornecer informações quantitativas sobre a extensão das lesões formadas após a desmineralização in vitro, apresentando, portanto, potencial para realizar análises in vivo.

Material e
Método

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Materiais e Equipamentos Utilizados

4.1.1 *Materiais de consumo*

- Ácido Acético Glacial PA ACS - 1L (Qhemis);
- Ácido Clorídrico 37% PA – 1L (Qhemis);
- Adesivo instantâneo Super Bonder (Loctite);
- Água destilada;
- Água deionizada;
- Discos de papel feltro - Texmet 1500 (Buehler);
- Esmalte Verniz & Cor (Colorama);
- Fosfato Potássio Monobásico Anidro PA – 500 g (Qhemis);
- Godiva em bastão – Exata (DFL);
- Hidróxido de Cálcio PA – 500 g (Synth);
- Hidróxido Sódio Lentilhas PA – 500 g (Qhemis);
- Lixas d'água Carbureto de Silício para politriz - granulações 400; 1200, 2500 e 4000 (Buehler);
- Meio de cultura Blood Agar Base (Oxoid Ltda.);
- Meio de cultura Brain Heart Infusion (Acumedia Manufactures Inc);
- Pedra Pomes em pó – Herjos (Vigodent);
- Resina Acrílica Incolor – Jet (Clássico);
- Sangue desfibrinado de carneiro (Ebefarma Biológica e Agropecuária Ltda.);
- Sódio cloreto P. A. A. C. S. (CAQ - Casa da química Ind. e Com. Ltda.);
- Suspensão de abrasivo de diamante - 1 μ m (Buehler);
- Tampão Tris (Merck);

- Timol – 100 g (Qhemis).

4.1.2 Instrumentos e vidrarias

- Alça de Drigalsky;
- Baixa rotação e Peça reta (Kavo);
- Béquer graduado – 600 mL (Satelit);
- Caneta para retroprojektor;
- Cureta Mc Call - nº 13-14 (Golgran);
- Disco Flexível Diamantado Mono Face (KG Sorensen);
- Disco Diamantado para eixos de 1/2" - diâmetro 76 mm (Buehler);
- Erlenmeyer graduado – 1L e 6 L (Satelit);
- Frascos graduados com tampa rosqueável – 100 mL (Boeco);
- Jarra Anaeróbica Acrílica (Permutation);
- Lamparina Inox (Konnen);
- Limas endodônticas tipo Hedströen - nº 50 (Maillefer);
- Micropipetas - 05-50 µL e 100-1000 µL (Boeco);
- Pipeta graduada de vidro - 10 mL (Satelit);
- Placas de Petri 100 x 15 mm (Perfecta);
- Pinça anatômica - 16 mm (Golgran);
- Ponta maxicut para peça reta (Edenta);
- Provetas graduadas – 50 mL, 250 mL, 1 L e 2L (Satelit);
- Tubos de ensaio – 20 x 150 mm (Pyrex);

4.1.3 – Material de uso permanente

- Agitador de tubos - A 162 (Marconi);
- Aparelho de cortes seriados - Isomet 1000 (Buehler);
- Autoclave vertical - AV 60 (Phoenix);
- Balança de precisão - BG 400 (Gehaka);

- Câmara de fluxo laminar vertical - PA 115 (Pachane);
- Contador de colônias - CP 600 Plus (Phoenix);
- Embutidora – Pre30Mi (Arotec);
- Estufa bacteriológica - MA 0324 (Marconi);
- Estufa para secagem e esterilização - MA 033 (Marconi);
- Microdurômetro - Micromet 5103 (Buehler);
- Microondas de dupla emissão de ondas - Sensor Crisp 38 (Brastemp);
- pHmetro portátil - PG-1400 (Gehaka);
- Politriz - Aropol 2V (Arotec);
- Ultra-som - Ultrasonic 1440 Plus (Odontobrás).

4.2 Método

4.2.1 Obtenção e preparo das amostras de esmalte

4.2.1.1 Preparo dos dentes

Foram selecionados 20 dentes incisivos bovinos, tendo como critério de escolha a qualidade aparente do esmalte, como ausência de trincas e hipoplasias. Os dentes foram limpos com o auxílio de curetas do tipo Mc Call para remoção do tecido periodontal remanescente e, em seguida, foram imersos em água destilada (Figura 1). O seccionamento das raízes dos dentes bovinos foi realizado por meio de disco diamantado, montado em peça reta, sob baixa rotação e com irrigação indireta de água destilada. O tecido pulpar coronário foi removido com limas endodônticas do tipo hedströen. Em seguida, as coroas passaram por um processo final de limpeza e polimento, em torno equipado com escova de cerdas pretas e mistura de pedra pomes e água. As amostras foram, então, imersas em água destilada e armazenadas em refrigerador a 5°C, até a sua utilização.



FIGURA 1 – DENTE BOVINO.

4.2.1.2 Obtenção das amostras de esmalte

As coroas foram fixadas em placas de madeira (4 x 4 cm e 5 mm de espessura) com godiva de baixa fusão, aquecida em chama de lamparina, com a face vestibular voltada para cima. As placas de madeira, por sua vez, foram individualmente acopladas na máquina para cortes de precisão. A face vestibular de cada coroa foi seccionada longitudinalmente, por meio de um disco diamantado montado na máquina de cortes, sob refrigeração com água destilada. Foram realizados dois cortes longitudinais, com distância de 4 mm entre cada corte (Figura 2).



FIGURA 2 - SECCIONAMENTO LONGITUDINAL DA COROA DO DENTE BOVINO.

As porções laterais de cada coroa foram removidas das placas de madeira, e as porções centrais, com larguras de 4 mm, foram novamente seccionadas na sua região mais plana, por meio de dois cortes transversais, espaçados 4 mm um do outro. Dessa forma, para cada coroa, foi obtido um fragmento dental, contendo esmalte proveniente da face vestibular, com dimensões 4 x 4 mm (Figura 3). Estes 20 fragmentos dentais foram armazenados em água destilada e, posteriormente, utilizados para a realização dos testes de microdureza Knoop.



FIGURA 3 – FRAGMENTO DENTAL (4 X 4 MM).

As porções laterais dessas coroas foram utilizadas para a obtenção de amostras contendo apenas esmalte dental, utilizadas nos testes microbiológicos. Para isso, o tecido dentinário foi removido por meio de ponta maxicut montada em peça reta sob baixa rotação e refrigeração com água destilada (Figuras 4A e 4B).

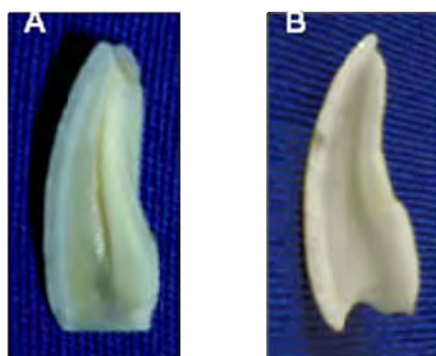


FIGURA 4 – PORÇÃO LATERAL DA COROA ANTES (A) E APÓS A REMOÇÃO DO TECIDO DENTINÁRIO (B).

As porções laterais das coroas contendo apenas esmalte foram, então, novamente seccionadas por meio de disco diamantado, possibilitando a obtenção de 40 amostras de esmalte, que foram, em seguida, armazenadas em água destilada e reservadas para a realização dos testes microbiológicos (Figura 5).

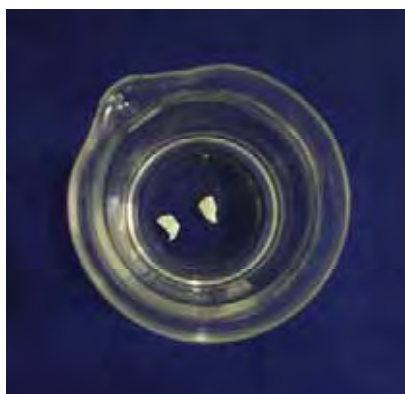


FIGURA 5 – AMOSTRAS DE ESMALTE RESERVADAS PARA REALIZAÇÃO DOS TESTES MICROBIOLÓGICOS.

4.2.3 Avaliação Microbiológica

4.2.3.1 Preparo dos materiais microbiológicos

O meio de cultura BHI (infusão de cérebro e coração), que se constitui de um caldo nutriente que propicia o crescimento de vários tipos de microrganismos, sendo considerado um meio de cultura não seletivo⁴³, foi preparado segundo as recomendações do fabricante para a incubação das amostras de esmalte dentário bovino. Após o seu preparo, uma alíquota de 10 mL foi pipetada e dispensada, individualmente, em tubos de ensaio devidamente identificados, datados, os quais foram esterilizados em autoclave vertical a 121°C por 15 minutos (Figura 6).



FIGURA 6 – TUBOS DE ENSAIO
CONTENDO O MEIO BHI.

Após esse procedimento, os tubos de ensaio, eram tampados e resfriados, lentamente, até atingirem a temperatura ambiente. Finalmente, os tubos foram armazenados em refrigerador a 5°C até a sua utilização nos procedimentos experimentais.

A solução salina utilizada nas diluições seriadas foi preparada pela diluição completa de 8,5 g de cloreto de sódio em 1 L de água destilada. Após a dissolução, 4,5 mL da solução salina resultante, na concentração de 0,15 mol, foi distribuída em tubos de ensaio. A seguir, esses tubos foram tampados com algodão e levados em esterilizados em autoclave vertical a 121°C por 15 minutos. Após a sua esterilização, os tubos de ensaio foram resfriados lentamente até atingirem a temperatura ambiente. Finalmente, os tubos de ensaio contendo solução salina foram armazenados em refrigerador a 5°C até a utilização nos procedimentos experimentais. O meio de cultura utilizado neste estudo foi o Blood Agar Base enriquecido com sangue desfibrinado de carneiro, na concentração de 5%. O meio Blood Agar Base foi proporcionado, manipulado e esterilizado segundo as recomendações do fabricante. Após o preparo e resfriamento do meio de cultura, uma alíquota

de sangue desfibrinado de carneiro, equivalente a 5% da quantidade de meio Blood Agar Base, foi adicionada ao meio ainda na fase líquida. A solução resultante foi vertida em placas de Petri esterilizadas em estufa a 175°C por 2 horas, na quantidade de, aproximadamente, 20 mL por placa (Figura 7).



FIGURA 7 – PLACA DE PETRI
CONTENDO O MEIO ÁGAR SANGUE.

As placas de Petri foram, individualmente, fechadas e mantidas na câmara de fluxo laminar até que fosse observada a solidificação do meio de cultura, quando, então, as placas de Petri foram devidamente identificadas, datadas e incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas. Estes procedimentos foram realizados com o objetivo de verificar a esterilização das placas de Petri e do meio de cultura. Após a incubação, seriam descartadas deste estudo todas as placas que apresentaram quaisquer indícios de crescimento microbiano, não tendo este fato ocorrido em nenhuma placa. A seguir, a parte inferior de cada placa de Petri foi externamente dividida em quadrantes com o auxílio de caneta retroprojeter, facilitando posteriormente, os procedimentos de semeadura (diluição seriada por quadrante). Finalmente, as placas de Petri foram armazenadas em refrigerador a 5°C para serem utilizadas nos procedimentos de semeadura das amostras de esmalte dentário bovino.

4.2.3.2 Desinfecção dos fragmentos de esmalte

As 40 amostras de esmalte dentário bovino que estavam armazenadas em água destilada foram divididas, aleatoriamente, em dois grupos (n=20): irradiado e controle. As amostras do grupo irradiado foram colocadas individualmente em béqueres contendo 200 mL de água destilada estéril. Em seguida, cada béquer foi posicionado, individualmente, no prato giratório do forno de microondas e irradiado a 650 W durante 3 minutos⁵⁶ (Figura 8).



FIGURA 8 – IRRADIAÇÃO EM MICROONDAS A 650 W POR 3 MINUTOS.

As amostras grupos (irradiado e controle) foram, individualmente, transferidas com o auxílio de pinça estéril, para os tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura BHI estéril. Cada tubo de ensaio foi vigorosamente agitado em agitador de tubos por 1 minuto. As amostras foram, então, assepticamente transferidas para outros tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura BHI estéril. Cada tubo de ensaio foi vigorosamente agitado em agitador de tubos por 1 minuto. Os tubos de ensaio que continham apenas o caldo BHI foram incubados em condições de anaerobiose, por meio de jarras de anaerobiose (Figura 9), enquanto os demais foram incubados em condições de aerobiose (Figura 10).



FIGURA 9 – TUBOS DE ENSAIO PREPARADOS PARA INCUBAÇÃO EM ANAEROBIOSE.



FIGURA 10 – TUBOS DE ENSAIO PREPARADOS PARA INCUBAÇÃO EM AEROBIOSE.

Todos os tubos (n=80) foram igualmente submetidos à incubação em estufa bacteriológica a 37°C por 7 dias. Decorrido esse período, foi observada a presença ou ausência de turvação no meio de cultura, sendo que a presença de turvação no meio de cultura indicava o crescimento de microrganismos.

Independentemente da presença de turvação do meio de cultura, todos os tubos de ensaio foram vigorosamente agitados por 1 minuto em um agitador de tubos para que as células microbianas fossem suspensas. Uma alíquota de 500 µL de cada tubo foi pipetada e transferida para tubos de ensaio contendo 4,5 mL de solução salina estéril. Os tubos foram agitados novamente por 30 segundos e uma nova alíquota de 500 µL foi removida e colocada em outro tubo de ensaio contendo 4,5 mL de solução salina. Esse procedimento foi realizado cinco vezes para cada amostra e, desta forma, as diluições seriadas de 10^{-1} a 10^{-5} foram obtidas⁵². As quatro últimas diluições seriadas (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5}) foram separadas e uma alíquota de 25 µL de cada uma dessas diluições foi transferida para um dos quadrantes de uma placa de Petri, contendo o meio de cultura Blood Agar Base enriquecido com sangue desfibrinado de carneiro. Uma alça de Drigalsky estéril foi utilizada para espalhar a solução sobre o meio de cultura em cada quadrante da placa. É importante enfatizar que os procedimentos de semeadura foram realizados em duplicatas. As placas referentes aos tubos de ensaio incubados em meio anaeróbico foram incubadas a 37°C por 7 dias sob condições anaeróbicas, enquanto as demais placas de Petri foram submetidas à incubação a 37°C por 48 horas sob condições aeróbicas.

4.2.3.3 Contagem de microrganismos

Após o período de incubação, todas as placas de Petri foram submetidas à contagem de colônias em contador de colônias digital. As placas de Petri foram posicionadas sobre o aparelho e um dos quadrantes da placa que apresentava valores entre 30 e 300 foi selecionado. A seguir, a ponta do contador foi posicionada, individualmente, sobre cada uma das colônias formadas para realização da contagem. Os números de unidades formadoras de colônias por mL (ufc/mL) foram, então, calculados e

comparados para verificação da efetividade do método de esterilização testado.

4.2.4 Avaliação das propriedades do esmalte

4.2.4.1 Preparo dos corpos de prova

Os 20 fragmentos dentais com dimensões de 4 x 4 mm, reservados para os testes de microdureza, foram removidos da água destilada e secos com folhas de papel absorvente. Cada fragmento dental foi fixado, por meio de adesivo instantâneo, à matriz metálica de uma embutidora e, então, individualmente incluídos em 7g de resina acrílica, sob pressão de 150kgf/cm² durante 7 minutos em aquecimento e outros 7 minutos de resfriamento. Durante este procedimento, 2 amostras foram excluídas do estudo devido à presença de trincas na superfície do esmalte. Dessa forma, foram obtidas 18 amostras de esmalte bovino com somente a face vestibular dos fragmentos dentais exposta ao meio externo (Figura 11).

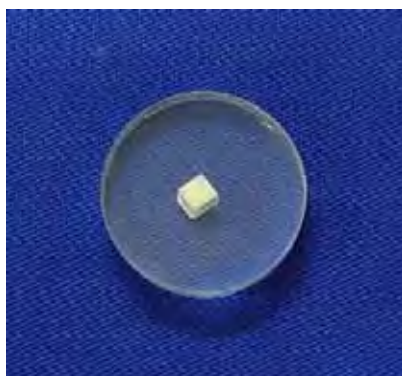


FIGURA 11 – AMOSTRA DE ESMALTE INCLUÍDA EM RESINA ACRÍLICA.

Em seguida, as amostras incluídas em resina acrílica foram polidas em politriz, sob refrigeração com água destilada. A sequência de lixas d'água utilizada foi de: granulação 400 (1 minuto) e granulações 1200,

2500 e 4000⁴⁶ (2 minutos cada), tendo sido, entre cada lixa, realizada limpeza dos corpos-de-prova em ultra-som com água destilada por dois minutos. O acabamento final foi realizado com disco de papel feltro e suspensão de diamante de 1 μ m⁶³ (2 minutos).

Cada amostra foi acoplada à máquina para cortes de precisão e seccionada longitudinalmente em duas porções, de maneira que a superfície de esmalte exposta fosse dividida ao meio, permitindo a obtenção de dois corpos-de-prova contendo uma superfície de esmalte com dimensões de 2 x 4 mm (Figura 12).



FIGURA 12 – DELIMITAÇÃO DA AMOSTRA PARA A REALIZAÇÃO DO SECCIONAMENTO.

Os corpos-de-prova provenientes de uma mesma amostra de esmalte bovino eram, então, destinados a um dos dois grupos (n=18): Controle e Irradiado. As amostras do grupo Controle foram mantidas em água destilada até a realização do teste de microdureza. No caso do grupo Irradiado, as amostras foram, individualmente, imersas em béqueres contendo 200 mL de água destilada estéril e submetidas à irradiação por microondas durante 3 minutos a 650 W⁵⁶ (Figura 13).



FIGURA 13 – AMOSTRA REFERENTE AO GRUPO IRRADIADO PREPARADA PARA A IRRADIAÇÃO POR MICROONDAS.

4.2.4.2 Avaliação da microdureza superficial do esmalte

Para a realização dos testes de microdureza superficial nas amostras dos grupos Controle e Irradiado, os corpos-de-prova foram secos com auxílio de papel absorvente e posicionados, individualmente, no aparelho microdurômetro, equipado com diamante Knoop. Foram realizadas 5 indentações, sob carga de 25 gf por 05 segundos⁷, na região central da amostra de esmalte, mantendo-se a distância de 100 μm entre as indentações.

4.2.4.3 Avaliação da perda mineral do esmalte

Após a realização da análise de microdureza superficial, as amostras foram isoladas com duas camadas de esmalte para unhas², de maneira que apenas a região vestibular da superfície de esmalte (8 mm²) ficasse exposta (Figura 14).



FIGURA 14 – AMOSTRA DE ESMALTE PREPARADA PARA PROCEDIMENTO DE CICLAGEM DE PH.

Os grupos foram submetidos a um processo de desmineralização e remineralização, realizado por meio de ciclagem de pH, tendo o modelo de ciclagem utilizado sido proposto por Featherstone et al.²⁹ e descrito por Vieira et al.⁷⁸. A solução desmineralizadora, de pH 4.3, foi composta por 2 mM cálcio, 2 mM fosfato e 75 mM ácido acético, tendo sido aplicada na proporção de 5 mL/mm² de superfície de esmalte exposta (40 mL por amostra). A solução remineralizadora, composta de 1.5 mM cálcio, 0.9 mM fosfato, 150 mM KCl e 20 mM tampão TRIS, com pH 7.0, foi aplicada na proporção de 2.5 mL/mm² (20 mL por amostra). As soluções desmineralizadora e remineralizadora foram preparadas, no início do experimento, pela adição dos reagentes em água deionizada, de acordo com cada protocolo. Cristais de timol foram adicionados, visando evitar o desenvolvimento de microorganismos e, então, as soluções foram armazenadas em refrigerador. O processo de ciclagem das amostras foi realizado, individualmente, por meio de frascos com tampa rosqueável. Ao início de cada ciclo, cada amostra foi transferida para um frasco contendo 40 mL da solução desmineralizadora. Em seguida, os frascos eram tampados e mantidos a 37°C, em estufa, durante 6 horas. Decorrido este período, a solução contida no frasco era descartada e as amostras eram transferidas para novos frascos, contendo 20 mL da solução remineralizadora. Após o

fechamento dos frascos, estes eram mantidos em estufa a 37 °C por 18 horas. Água deionizada foi utilizada para irrigar as amostras entre as trocas de solução. As amostras foram submetidas ao processo de ciclagem durante 5 dias e, em seguida, permaneceram por mais 48 horas em solução remineralizadora.

Após o processo de ciclagem, a resistência à desmineralização foi verificada por meio de avaliação da microdureza em secção longitudinal. A camada de esmalte de unhas que isolava a face seccionada foi removida de cada corpo-de-prova por meio de seqüência de polimento, realizada para possibilitar a realização do teste de microdureza. Foram utilizadas lixas d' água de granulação 400 (1 minuto) e granulações 1200, 2500 e 4000⁴⁶ (2 minutos cada), montadas em politriz. Entre cada troca de lixa, as amostras foram imersas em água destilada e mantidas em ultra-som, durante dois minutos. O acabamento final foi realizado com disco de papel feltro e suspensão de diamante de 1µm, por 2 minutos. A face seccionada de cada corpo-de-prova foi posicionada no aparelho microdurômetro para a realização de 3 séries em 7 profundidades, localizadas no centro da amostra, separadas lateralmente por 100 µm. As indentações foram feitas a 10, 30, 50, 70, 90, 110 e 300 µm de distância da superfície externa do esmalte. A carga utilizada foi de 25 gf, durante 5 segundos⁷. A média dos valores de microdureza obtidos para cada profundidade foi calculada para cada amostra, tendo esse valor sido convertido em % de volume mineral de acordo com a fórmula proposta por Featherstone³⁰. Os valores de conteúdo mineral do esmalte natural (ΔZ_1) e os valores de perda mineral (ΔZ_2) foram calculados a partir de gráficos contendo os valores de % de volume mineral x profundidades (µm), elaborados para cada amostra. Os maiores valores obtidos em % de volume mineral foram utilizados como parâmetro para o cálculo do conteúdo mineral do esmalte natural. O cálculo da porcentagem

de perda mineral⁶ foi obtido de acordo com a expressão: $[\% \Delta Z = 100 \times (\Delta Z_2 / \Delta Z_1)]$.

4.3 Análise estatística

Para determinar a efetividade das microondas na desinfecção das amostras de esmalte avaliadas, foi calculado o número de microrganismos viáveis, em valores de ufc/mL, obtido com e sem o procedimento de desinfecção pela irradiação por microondas. É importante ressaltar que, para cada duplicata, a contagem do número de colônias foi realizada para cada uma das diluições semeadas. Foram considerados somente os valores entre 30 e 300 colônias, sendo escolhido o número de colônias referente a uma única diluição que representasse um valor entre a variação considerada. Após a obtenção desse valor em cada duplicata, o número de unidades formadoras de colônias por mililitro (ufc/mL) foi calculado. Para esse cálculo, utilizou-se a fórmula a seguir:

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

Nessa fórmula, n equivale ao valor absoluto da diluição (2, 3, 4, ou 5) e q equivale à quantidade, em mL, pipetada para cada diluição semeada nas placas. No presente estudo, q = 0,025 já que foram pipetados 25 µL para cada diluição. Os valores de ufc/mL obtidos foram deixados em notação científica e foi obtida então a média aritmética dos valores das duplicatas de cada amostra.

Os dados obtidos pelos testes de microdureza superficial e microdureza em secção longitudinal, apresentaram distribuição normal e homogênea, portanto o teste t de Student, do tipo pareado, foi utilizado para

a análise estatística destes dados, com $\alpha = 0,05$. Os programas GMC ¹⁶ e XLSTAT versão 2009.2.03⁸⁵ foram utilizados para a realização dos testes estatísticos.

Resultado

5 RESULTADO

Após 7 dias de incubação a 37°C, os dados obtidos pela inspeção visual realizada nos tubos de ensaio contendo o meio BHI, indicaram que o crescimento de microorganismos (presença de turvação no meio de cultura) ocorreu em todos os tubos de ensaio referentes às amostras do grupo controle, para ambas as condições, de aerobiose e anaerobiose (Figura 16). Não ocorreu desenvolvimento de microorganismos em nenhum dos tubos de ensaio referentes aos grupos irradiados (Figura 17).



FIGURA 16 - TUBO DE ENSAIO CORRESPONDENTE AO GRUPO CONTROLE COM PRESENÇA DE TURVAÇÃO DO MEIO.



FIGURA 17 - TUBO DE ENSAIO CORRESPONDENTE AO GRUPO IRRADIADO COM AUSÊNCIA DE TURVAÇÃO DO MEIO.

Os resultados obtidos pela contagem de ufc/mL (Tabela 1) nas placas de ágar sangue confirmaram os resultados obtidos anteriormente pela inspeção visual, constatando a ocorrência de desenvolvimento de colônias

viáveis de microorganismos apenas nas placas referentes aos grupos controle (Figuras 18A e 18B).



FIGURA 18A- PLACA CORRESPONDENTE O GRUPO CONTROLE APÓS O PERÍODO DE INCUBAÇÃO.

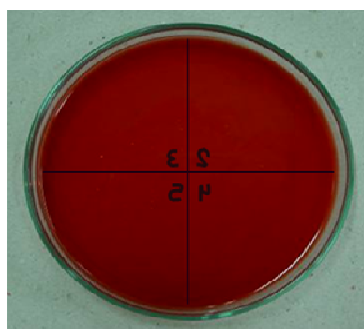


FIGURA 18B- PLACA CORRESPONDENTE O GRUPO IRRADIADO APÓS O PERÍODO DE INCUBAÇÃO.

Tabela 1 - Valores de média das contagens (ufc/mL) dos microorganismos para os grupos Controle e Irradiado, nas duas condições de incubação (n=20)

Grupo			
Controle		Irradiado	
aerobiose	anaerobiose	aerobiose	anaerobiose
422×10^6	566×10^6	0	0

* Os valores originais de ufc/mL encontram-se no Apêndice 1 (Tabela A1)

Tabela 2 - Valores de média ($\pm$ DP; n = 18) de microdureza superficial, perda mineral (ΔZ) e porcentagem de perda mineral (% ΔZ) dos grupos Controle e Irradiado

Grupo	Microdureza superficial (kg/mm ²)*	ΔZ (% vol. mineral $\times$ μm)**	% ΔZ (% vol. mineral $\times$ μm)***
Controle	279,39 $\pm$ 60,05	1249,63 $\pm$ 371,59	5,14 $\pm$ 1,56
Irradiado	286,98 $\pm$ 56,04	1193,93 $\pm$ 501,60	4,92 $\pm$ 1,93

Teste t Student: * $P=0,69$; ** $P=0,64$; *** $P=0,66$

Os resultados de microdureza superficial e porcentagem de perda mineral, apresentados na Tabela 2, indicaram que não ocorreu diferença estatisticamente significativa entre os valores obtidos pelos grupos Controle e Irradiado.

Os valores originais de microdureza superficial encontram-se no Apêndice 2.

Os valores originais de ΔZ encontram-se no Apêndice 3.

Os valores originais de % ΔZ encontram-se no Apêndice 4.

Discussão

6 DISCUSSÃO

Os dentes extraídos de origem humana são comumente considerados a fonte mais apropriada de substrato dental para a realização de estudos *in situ*^{55,89}. Entretanto, considerando a necessidade de padronização das amostras, a utilização dos dentes humanos extraídos apresenta algumas limitações^{55,72,89}. A sua composição não é uniforme e pode ser influenciada por condições ambientais (dieta, exposição ao flúor, experiência de cárie), idade e fatores genéticos, que dificultam a obtenção de uma amostra homogênea^{50,55,89}. O tamanho relativamente pequeno dos dentes humanos torna necessária a utilização de vários dentes para a obtenção de amostras, o que pode influenciar os resultados dos estudos^{55,89}. Além disso, a dificuldade de obtenção de dentes íntegros e em quantidade suficiente também dificulta a utilização do substrato de origem humana⁵⁵. A maioria dos dentes de origem humana utilizados em pesquisas é constituída por molares e pré-molares⁵⁵, que apresentam a maior parte de sua superfície convexa, o que dificulta a obtenção de amostras de esmalte com superfícies planas e espessura uniforme, necessárias para a realização de estudos que utilizam métodos de avaliação como a microdureza superficial^{21,55,78,89}.

Pesquisas realizadas *in situ* com a utilização de amostras de esmalte provenientes de dentes humanos são consideradas de grande relevância clínica⁸⁹. Entretanto, a escolha do substrato a ser utilizado nas pesquisas *in situ* deve levar em consideração sua disponibilidade, a necessidade de padronização das amostras, os métodos de análise utilizados e a reprodutibilidade dos resultados⁵⁵. Dessa forma, incisivos bovinos, cuja anatomia é semelhante àquela dos incisivos humanos, têm sido amplamente utilizados na obtenção de amostras de esmalte^{2-4,21,55,89} e, embora este procedimento não esteja isento de críticas, possui numerosas vantagens. Os incisivos bovinos são facilmente obtidos em grande

quantidade e boas condições^{55,78,89}. Considerando suas maiores dimensões e superfície relativamente plana, vários blocos de esmalte podem ser obtidos do mesmo dente^{21,50,55,89}, proporcionando a obtenção de grupos homogêneos^{3,21,55,72,89}. Os dentes bovinos apresentam composição química relativamente uniforme, menor concentração de flúor e não possuem lesões de cárie anteriores, o que diminui a variação na resposta ao tratamento e promove resultados mais coerentes. No entanto, os dentes bovinos apresentam maior porosidade que os dentes humanos e, consequentemente, desenvolvem lesões de cárie mais rapidamente^{21,55,72}. Apesar disso, esta característica não é considerada uma desvantagem nos estudos *in situ*, pois faz com que o tempo necessário de manutenção da amostra de esmalte na cavidade bucal dos pacientes seja menor²¹. Além disso, as lesões de cárie produzidas no esmalte bovino são as que apresentam maior semelhança com as lesões produzidas em esmalte humano, tanto na distribuição mineral quanto nas alterações estruturais⁵⁵.

Os estudos realizados *in vitro* limitam-se à utilização do substrato dental em procedimentos laboratoriais, que simulam as condições existentes na cavidade bucal. Os estudos *in vivo* utilizam dentes naturalmente presentes na cavidade oral dos pacientes como substrato. Já os estudos *in situ* utilizam amostras de esmalte provenientes de dentes extraídos, acopladas a dispositivos removíveis intra-orais ou fixadas diretamente nos dentes do paciente^{55,89}. Os estudos *in situ* têm o objetivo de mimetizar o desenvolvimento e a prevenção das lesões de cárie no ambiente oral^{55,72}. Dessa forma, os modelos *in situ* representam um estágio intermediário entre os modelos laboratoriais *in vitro*, altamente controlados, e as aplicações em situações clínicas^{72,89}. Entretanto, vírus, bactérias e esporos provenientes dos dentes extraídos podem ser transmitidos aos pacientes que participam dos estudos *in situ*². Dessa forma, a esterilização de amostras de esmalte, previamente a sua utilização em estudos *in situ*, é

considerada essencial, uma vez que este substrato constitui uma fonte de contaminação em potencial, expondo voluntários ao risco de contaminação^{2,12,14,20,50,75,83}. Para isso, é importante considerar a diferença entre esterilização e desinfecção. Esterilização é o processo pelo qual todas as formas de microorganismos são eliminadas. Desinfecção é a destruição da maioria, mas não necessariamente de todos os microrganismos, particularmente esporos microbianos altamente resistentes^{22,57}. Conseqüentemente, é desejável que os substratos de dentes extraídos com finalidades de pesquisa sejam esterilizados antes de sua utilização, principalmente aqueles destinados aos estudos in situ, onde as amostras de esmalte, provenientes de dentes extraídos, são posicionadas na cavidade oral dos pacientes. Além disso, o método de esterilização, além de ser eficaz, não deve comprometer a integridade estrutural das amostras de esmalte, nem influenciar o desenvolvimento das lesões de cárie produzidas in vitro e in situ².

No presente estudo, o desenvolvimento de microorganismos nos tubos de ensaio contendo o meio BHI, referentes às amostras dos grupos controle e irradiado, foi avaliado por meio de inspeção visual, onde a presença (turvação do meio) ou ausência de crescimento microbiológico foi observada. A quantificação dos microorganismos em ufc/mL foi efetuada por meio da semeadura em placas com o meio ágar sangue. No grupo controle, onde nenhuma das amostras de esmalte foi submetida à irradiação por microondas, foi observado crescimento microbiológico tanto em condições de aerobiose quanto em condições de anaerobiose. Os resultados obtidos por meio de inspeção visual foram confirmados pelas semeaduras em placas, estando de acordo com as observações de Amaecha et al.², em 1999 e Amaechi et al.³, em 1998, cujos resultados demonstraram, ainda, que os microorganismos identificados foram principalmente *Staphylococcus aureus* e *bacilli*²⁻⁴. Não foi observado crescimento microbiológico em nenhuma das

culturas referentes às amostras do grupo submetido à irradiação por microondas. Estes resultados demonstram que a irradiação por microondas por 3 minutos a 650 W resultou em esterilização de todas as amostras de esmalte bovino. Os resultados obtidos por outros estudos têm demonstrado que a irradiação por microondas é capaz de inativar diversos microorganismos, incluindo os indicadores de esterilização²² (*C. albicans*^{13,25,56,58,71,66-68,70,79,81}, *S. aureus*^{13,56,58,66-67,71,73,79,84,86}, *P. aeruginosa*^{13,49,56,58,67} e *B. subtilis*^{19,45,47,56,58,66,73,84}) e outros microorganismos patogênicos (*E. coli*^{13,49,67,69,79}, *S. epidermis*^{13,49,66}, *B. stearothermophilus*^{31,49,73,84}, *H. simplex*^{66-67,87} e *K. pneumoniae*^{49,66,69}).

Os mecanismos pelos quais as microondas promovem inativação dos microrganismos ainda não foram totalmente esclarecidos^{15,19,47}. Alguns autores consideram a existência de efeitos não térmicos sobre a atividade metabólica de diferentes microrganismos^{8,17,19,23,28,47,59,67-68,84}, enquanto outros sugerem efeitos térmicos^{31,38,45,79,86}. Os efeitos térmicos são aqueles induzidos por um movimento cinético associado ao aumento da temperatura, não sendo diretamente causados pelo campo eletromagnético das microondas^{17,31,45,86}. Os efeitos não térmicos resultariam da interação do campo eletromagnético com as moléculas das células, produzindo alterações celulares que não poderiam ser explicadas somente por uma ação térmica^{8,23,28,84}. Hiti et al.³⁸ relataram que as células com alto conteúdo de água possuem maior interação com o campo eletromagnético, o que explicaria a ocorrência da lise celular em uma temperatura menor que aquela encontrada em um processo puramente térmico³⁸. Em estudo recente, foi observado que a irradiação por microondas produziu alterações da integridade e permeabilidade da membrana e parede celular do microorganismo *C. albicans*, comprometendo o seu metabolismo ao ponto de causar morte celular¹⁵. Segundo Carrol, Lopez¹⁷, a energia gerada pelas microondas pode causar uma oscilação

muito rápida na célula microbiana e, conseqüentemente, o limite elástico da estrutura celular poderia ser excedido¹⁷. Em outro estudo, alterações ocasionadas à estrutura e/ou aos componentes moleculares de esporos de *B. subtilis* foram significativamente distintas daquelas atribuídas somente ao aumento da temperatura¹⁹. Dependendo do meio circundante dos microrganismos, algumas moléculas orgânicas no citoplasma celular poderiam ser aquecidas seletivamente pelas microondas, gerando no seu interior uma temperatura maior que no meio circundante, o que resultaria no efeito bactericida da irradiação por microondas¹⁵. Provavelmente, a combinação dos mecanismos acima mencionados promoveu a inativação dos microrganismos presentes nas amostras de esmalte bovino, durante a irradiação por microondas.

Dentre os métodos de desinfecção ou esterilização existentes, a imersão em soluções a base de hipoclorito de sódio, formol, iodine-povidine, glutaraldeído ou clorexidina, comumente utilizadas na esterilização de instrumentos quando os métodos físicos são incompatíveis, também são utilizadas para a esterilização de esmalte dental^{2-3,21,27,53}. No entanto, a imersão das amostras de esmalte nestas soluções apresenta eficácia compatível com um alto nível de desinfecção em lugar de verdadeiros resultados de esterilização²¹. A imersão por 24 h em solução de hipoclorito de sódio 12% ou de iodine-povidine 7,5% promoveu a esterilização de amostras de esmalte bovino²⁻³. No entanto, a imersão de dentes humanos em solução de hipoclorito de sódio 2,6% por 7 dias foi considerada ineficaz como método de esterilização ou desinfecção⁴⁸. O tratamento com solução de peróxido de hidrogênio 3% por 7 dias promoveu apenas desinfecção^{48,53}. Da mesma forma, a utilização do glutaraldeído e certos halógenos contra *Micobacterium tuberculosis* não demonstrou ser um método eficiente de desinfecção^{21,53}. Considerado eficiente para a esterilização de dentes utilizados por estudantes ou por pesquisadores, a imersão em solução de

formol é um método amplamente utilizado^{24,27,48,50,53}. A imersão em solução de formalina tem sido indicada como método de esterilização para os dentes que contenham restaurações de amálgama^{20,48}. Apesar da esterilização de dentes extraídos de origem humana ter sido obtida pela imersão em solução de formalina 10% por 7 dias^{27,48,53}, não existe uma padronização do tempo de armazenamento²⁴. Além disso, o formol é uma substância perigosa, irritante e possui potencial carcinogênico^{24,48,53}. É importante salientar, ainda, que alguns destes agentes de imersão podem ter um efeito direto sobre a superfície dos blocos de esmalte ou permanecer no interior das amostras e interferir na execução do experimento^{4,21}. Alterações morfológicas superficiais foram observadas nas amostras de esmalte esterilizadas por iodine-povidine (lesões brancas) e hipoclorito de sódio (clareamento). Da mesma forma, aumentos significativos da perda mineral e clareamento do esmalte e das lesões de cárie produzidas in vitro foram observados após a esterilização por meio de hipoclorito de sódio 12% por 24 h².

A utilização do óxido de etileno como método de esterilização de dentes extraídos tem sido relatada, tendo a concentração de 1% sido considerada efetiva para a esterilização de amostras de esmalte bovino⁷⁵. Sua forma de atuação é considerada de grande eficácia, considerando que o gás pode penetrar em locais relativamente inacessíveis. No entanto, a utilização do óxido de etileno como método de esterilização tem sido diminuída desde a década de 70, devido a sua alta toxicidade^{21,72}. Este gás é considerado altamente tóxico e sua mistura com ar, em grandes proporções, pode se tornar explosiva. A sequência de utilização normalmente envolve uma fase de pré-umidificação sob vácuo, e assim, uma câmara especial para criar um ambiente com alta umidade é necessária. Tal equipamento é raramente encontrado fora de grandes centros hospitalares e o processo de esterilização demanda muitas horas, além disso requer treinamento técnico especializado⁸³. Adicionalmente, o processo de esterilização com gás deve

ser realizado em etapas e exige um período para purificação/ retirada dos gases de no mínimo 72 h⁷⁵. Além disso, a utilização de óxido de etileno tem sido relatada como ineficaz para a esterilização de dentes contaminados com esporos de *Bacillus subtilis*^{24,83}. Em um estudo realizado em 1995, White, Hays⁸³ concluíram que o óxido de etileno não é um método confiável de esterilização de dentes humanos, pois a exposição ao óxido de etileno, sob condições consideradas de esterilização, não pode ser considerada capaz de esterilizar os tecidos internos dos dentes. Dessa forma, os autores sugerem que outros métodos de esterilização sejam utilizados para assegurar a eliminação dos patógenos de origem sanguínea que podem estar presentes nos dentes extraídos utilizados em pesquisas⁸³.

Considerando a importância da preservação da camada superficial do esmalte para a realização de testes de cariogenicidade, possíveis alterações sofridas nessa região em decorrência do processo de irradiação por microondas apresentam relevância e, dessa forma, este estudo realizou uma análise do seu efeito sobre a microdureza superficial de amostras de esmalte bovino. A avaliação por meio de microdureza de superfície é considerada uma técnica altamente sensível e que apresenta reprodutibilidade, sendo utilizada na avaliação dos estágios iniciais do processo de cárie em estudos de desmineralização de esmalte realizados *in vitro* e *in situ*^{7,30,64}. No entanto, os dados obtidos pela realização dos testes de microdureza de superfície não fornecem detalhes a respeito das alterações ocorridas abaixo da camada superficial de esmalte. Tais informações apresentam importância particularmente para os estudos que avaliam a dinâmica do desenvolvimento de cáries no ambiente intra-oral. Portanto, o presente estudo também avaliou as amostras de esmalte por meio de microdureza em secção longitudinal, visando determinar se a resistência à desmineralização das amostras poderia ser influenciada pela esterilização por microondas. Dentre os métodos de avaliação mineral

existentes, a microrradiografia transversal é considerada o padrão ouro, pois é capaz de fornecer dados precisos sobre as alterações no conteúdo mineral das amostras. No entanto, a análise das amostras de esmalte por meio de microrradiografias requer a destruição da amostra^{60,72,74} e impossibilita análises longitudinais, do tipo pré e pós-tratamento na mesma amostra. Sendo assim, técnicas indiretas de análise do conteúdo mineral têm sido utilizadas na avaliação das amostras submetidas a processos de desmineralização, abrangendo análises de microdureza superficial e longitudinal. Os testes de microdureza Knoop são considerados altamente sensíveis⁸⁹, e capazes de avaliar estágios iniciais da desmineralização esmalte-dentina ou remineralização do esmalte⁷ por meio de análises indiretas do conteúdo mineral. Os valores de volume mineral e microdureza apresentam uma relação linear⁷⁴ e os dados obtidos por meio de testes de microdureza podem ser convertidos em porcentagem de volume mineral³⁰, permitindo o cálculo da perda mineral (ΔZ), parâmetro utilizado em estudos envolvendo processos de desmineralização^{5,74}. Os resultados de microdureza superficial e porcentagem de perda mineral não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e irradiado, sugerindo que a esterilização por meio de irradiação por microondas não promoveu alterações no conteúdo mineral das amostras de esmalte bovino. Resultados contrastantes têm sido relatados para as amostras de esmalte esterilizadas por meio de autoclave^{2,21}. Este equipamento é acessível a todos os pesquisadores da área de odontologia e é considerado um método de esterilização de esmalte eficiente e rápido^{2-3,21,24,48}. Entretanto, quando realizado a 132°C por 15 minutos, uma diminuição da microdureza superficial do esmalte bovino foi relatada²¹. Aumento significativo na perda mineral e na profundidade das lesões de cárie produzidas in vitro também foi observado em amostras de esmalte esterilizadas em autoclave a 121°C por 15 minutos². Testes de microdureza, realizados antes e após a esterilização em autoclave,

sugerem que o calor úmido e a pressão podem ser responsáveis pelas modificações ocorridas nas amostras de esmalte²¹. O aumento da extensão das indentações foi amplamente significativo e, em alguns casos, as indentações foram tão extensas quanto àquelas esperadas após um experimento de desmineralização intra-oral²¹. Dessa forma, ao contrário da irradiação por microondas, o processo de esterilização de esmalte dental em autoclave pode causar efeitos como a redução da microdureza^{21,48,50,75-76} e alterações nas propriedades do esmalte, comprometendo os resultados dos estudos de remineralização^{21,75-76}, podendo esses efeitos influenciar, ainda, os resultados de adesão ao esmalte de sistemas adesivos⁵⁰. Durante a irradiação por microondas, as amostras são imersas em 200 mL de água que atinge a temperatura de ebulição após 90 segundos, permanecendo nesta temperatura até o final dos 3 minutos de irradiação⁷⁹. Assim, as variações ambientais a que as amostras são submetidas durante a irradiação por microondas não são tão severas quanto aquelas provocadas pelo processo de esterilização em autoclave, contribuindo para a ausência de efeitos nocivos sobre as propriedades do esmalte submetido à esterilização por microondas.

A irradiação gamma tem sido considerada o método mais apropriado para a esterilização de amostras de esmalte utilizadas em desafios cariogênicos^{2-4,21,65}. A radioesterilização é frequentemente utilizada para esterilizar itens hospitalares sensíveis ao calor^{2,21}. As propriedades nano-mecânicas do esmalte não foram alteradas após a esterilização por meio de irradiação gamma nas doses de 7 ou 35 kGy¹⁴. Da mesma forma, a utilização da dose de 25 kGy também não promoveu alterações na microdureza superficial das amostras de esmalte bovino²¹ ou de esmalte humano⁶⁵, além de não ter alterado a profundidade das lesões de cárie ou a perda mineral de amostras de esmalte³. Entretanto, tem sido sugerido que, apesar de não promover alterações na microdureza do esmalte, a radiação

ionizante pode influenciar a resposta do esmalte aos desafios cariogênicos⁴. Isso pode ser aceitável desde que todas as amostras de esmalte utilizadas no experimento tenham recebido um tratamento de irradiação idêntico, podendo, entretanto, invalidar as comparações com outros estudos em que as amostras de esmalte foram submetidas a doses diferentes de irradiação gamma²¹. Tem sido observado, ainda, que a irradiação gamma promoveu alterações na coloração das amostras e das lesões de cárie artificiais^{2-3,65}. As alterações na coloração do esmalte podem ter sido provocadas pela desnaturação dos componentes orgânicos presentes no esmalte, em decorrência do processo de irradiação². A preservação da cor do esmalte pôde ser obtida apenas com a redução na dose de irradiação gamma para 4,08 kGy². Além disso, os relatos de utilização da irradiação gamma abrangem diferentes tempos de exposição das amostras^{2-4,14,21,65}, mesmo quando a dose de irradiação utilizada é a mesma^{2-4,21,65}. Uma das limitações para utilização da irradiação gamma como método de esterilização de esmalte está relacionada ao fato dos equipamentos estarem disponíveis, geralmente, em grandes indústrias. Para a utilização deste método, normalmente, os pesquisadores enviam o material a ser esterilizado para uma empresa especializada, envolvendo custo de utilização. A empresa pode exigir uma quantidade mínima de material para que seja economicamente viável realizar o processo de esterilização²¹. Além disso, a esterilização por meio de irradiação gamma consiste em um processo longo, que pode variar de 15 a 200 horas para ser concluído^{2-4,14,65}. Se o processo de esterilização for realizado com cobalto, são necessárias 24 h adicionais²¹. Dessa forma, as limitações relatadas para esse método de esterilização podem constituir-se em fatores que inviabilizam a sua utilização pela maioria dos pesquisadores.

De acordo com os resultados do presente estudo, a esterilização de amostras de esmalte por microondas pode ser considerada

um método microbiologicamente efetivo, seguro, rápido, requer apenas um aparelho de microondas de uso doméstico e água, apresenta baixo custo e não utiliza fonte de energia radioativa. Apesar dos resultados favoráveis do presente estudo, são necessárias, ainda, outras análises para se determinar a influência da irradiação por microondas sobre a composição e microestrutura do esmalte dental, fatores fundamentais na aderência de microorganismos e formação de biofilme oral na sua superfície. Além disso, análises comparativas da irradiação por microondas com outros métodos efetivos de esterilização de esmalte devem ser realizadas nos estudos futuros.

Conclusão

7 CONCLUSÃO

Com base na metodologia do presente estudo, foi possível concluir que:

1. A irradiação por microondas a 650 W por 3 minutos foi efetiva na esterilização de amostras de esmalte bovino.
2. A microdureza superficial e a resistência à desmineralização das amostras de esmalte bovino não foram influenciadas pela irradiação por microondas a 650 W por 3 minutos.

Referências

8 REFERÊNCIAS*

1. Abuabara A, Santos AJS, Aguiar FHB, Lovadino JR. Evaluation of microleakage in human, bovine and swine enamels. *Braz Oral Res.* 2004;18:312-6.
2. Amaecha 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;27:313-6.
3. Amaechi BT, Higham SM, Edgar WM. Efficacy of sterilisation methods and their effect on enamel demineralisation. *Caries Res.* 1998;32:441-6.
4. 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;26:809-13.
5. Arends J, Ten Bosch JJ. Demineralization and remineralization evaluation techniques. *J Dent Res.* 1992;71(Spec No):924-8.
6. Arends J, Ruben JL, Inaba D. Major topics in quantitative microradiography of enamel and dentin: R parameter, mineral distribution visualization, and hyper-remineralization. *Adv Dent Res.* 1997;11:403-14.
7. Argenta RMO, Tabchoury CP, Cury JA. A modified pH-cycling model to evaluate fluoride effect on enamel demineralization. *Pesq Odontol Bras.* 2003;17:241-6.
8. Atmaca S, Akdag Z, Dasdag S, Celik S. Effect of microwaves on survival of some bacterial strains. *Acta Microbiol Immunol Hung.* 1996;43:371-8.
9. Attin T, Betke H, Schippan F, Wiegand A. Potential of fluoridated carbamide peroxide gels to support post-bleaching enamel re-hardening. *J Dent.* 2007;35:755-9.

*De acordo com o estilo Vancouver.

Disponível no site: [HTTP://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)

10. Banting DW, Hill SA. Microwave disinfection of dentures for the treatment of oral candidiasis. *Spec Care Dentist*. 2001;21:4-8.
11. Baysan A, Whiley R, Wright PS. Use of microwave energy to disinfect a long-term soft lining material contaminated with *Candida albicans* or *Staphylococcus aureus*. *J Prosthet Dent*. 1998;79:454-8.
12. Berrocal MIL, González JMM, Rodriguez MD Carriches CL. Sterilizing effects of the erbium: yag laser upon dental structures: an in vitro study. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2006;11:158-61.
13. Border BG, Rice-Spearman L. Microwaves in the laboratory: effective decontamination. *Clin Lab Sci*. 1999;12:156-60.
14. Brauer DS, Saeki K, Hilton JF, Marshall GW, Marshal SJ. Effect of sterilization by gamma radiation on nano-mechanical properties of teeth. *Dent Mater*. 2008;24:1137-40.
15. Campanha NH, Pavarina AC, Brunetti IL, Vergani CE, Machado AL, Spolidorio DM. *Candida albicans* inactivation and cell membrane integrity damage by microwave irradiation. *Mycoses*. 2007;50:140-7.
16. Campos GM. GMC 2002. Ribeirão Preto, School of Dentistry. Available at: <http://www.forp.usp.br/restauradora/gmc/gmc.html>.
17. Carrol DE, Lopez A. Lethality of radio-frequency energy upon microorganisms in liquid, buffered, and alcoholic food systems. *J Food Sci*. 1969;34:320-4.
18. Ccahuana-Vásquez RA, Tabchoury CPM, Tenuta LMA, Del Bel Cury AA, Vale GC, Cury JA. Effect of frequency of sucrose exposure on dental biofilm composition and enamel demineralization in the presence of fluoride. *Caries Res*. 2007;41:9-15.
19. Celandroni F, Longo I, Tosoratti N, Giannessi F, Ghelardi E, Salvetti S, et al. Effect of microwave radiation on *Bacillus subtilis* spores. *J Appl Microbiol*. 2004;97:1220-7.

20. Centers of Disease and Control and Prevention. Guidelines for infection control in dental health-care settings – 2003. MMWR. 2003;52(RR-17):1-76.
21. Chandler NP. Preparation of dental enamel for use in intraoral cariogenicity experiments. J Dent. 1990;18:54-8.
22. Cole EC, Robinson R. Test methodology for evaluation of germicides. In: Ascenzi JM editor. Handbook of disinfectants and antiseptics. New York: Marcel Dekker; 1996: p.1-13.
23. Culkin KA, Fung DY. Destruction of *Escherichia coli* and *salmonella typhimurium* in microwave-cooked soups. J Milk Food Technol. 1975;389:8-15.
24. DeWald JP. The use of extracted teeth for in vitro bonding studies: a review of infection control considerations. Dent Mater. 1997;13:74-81.
25. Dixon DL, Breeding LC, Faler TA. Microwave disinfection of denture base materials colonized with *Candida albicans*. J Prosthet Dent. 1999;81:207-14.
26. Doherty UB, Benson PE, Higham SM. Fluoride-releasing elastomeric ligatures assessed with the in situ carie models. Eur J Orthod. 2002;24:371-8.
27. Dominici JT, Eleazer PD, Clark SJ, Staat RH, Scheetz JP. Disinfection/sterilization of extracted teeth for dental student use. J Dent Educ. 2001;65:1278-80.
28. Dreyfuss MS, Chipley JR. Comparison of effects of sublethal microwave radiation and conventional heating on the metabolic activity of *Staphylococcus aureus*. Appl Environ Microbiol. 1980;39:13-6.
29. Featherstone JDB, O'Really MM, Shariati M, Brugler S. Enhancement of remineralization in vitro and in vivo, in Leach SA (ed): Factors relating to demineralization and remineralization of the teeth, Proceedings of a workshop 1985. Oxford, IRL Press. 1986;23-34.

30. Featherstone JD, Ten Cate JM, Shariati M, Arends J. Comparison of artificial caries-like lesions by quantitative microradiography and microhardness profiles. *Caries Res.* 1983;17:385-91.
31. Fitzpatrick JA, Kwao-Paul J, Massey J. Sterilization of bacteria by means of microwave heating. *J Clin Eng.* 1978;3:44-7.
32. Friedrich Jr. EG, Phillips LE. Microwave sterilization of *Candida* on underwear fabric. A preliminary report. *J Reprod Med.* 1988;33:421-2.
33. Gilgrass TJ, Creanor SL, Foye RH, Millett DT. Varnish or polymeric coating for the prevention of demineralization? An ex vivo study. *J Orthod.* 2001;28:291-5.
34. Gmür R, Giertsen E, van der Veen MH, de Josselin de Jong E, Ten Cate JM, Guggenheim B. In vitro quantitative light-induced fluorescence to measure changes in enamel mineralization. *Clin Oral Invest.* 2006;10:187-95.
35. Goodson LB, Glass RT, Bullard JW, Conrad RS. A statistical comparison of denture sanitation using a commercially available denture cleaner with and without microwaving. *Gen Dent.* 2003;51:148-51.
36. Gray JA. Kinetics of the dissolution of human dental enamel in acid. *J Dent Res.* 1962;41:633-45.
37. Griffith D, Nacey J, Robinson R, Delahunt B. Microwave sterilization of polyethylene catheters for intermittent self- catheterization. *Aust N Z J Surg.* 1993;63:203-4.
38. Hiti K, Walochnik J, Faschinger C, Haller-Schober EM, Aspöck H. Microwave treatment of contact lens cases contaminated with *Acanthamoeba*. *Cornea.* 2001;20:467-70.
39. Hoffman PN, Hanley MJ. Assessment of a microwave-based clinical waste decontamination unit. *J Appl Bacteriol.* 1994;77:607-12.
40. Hong SM, Park JK, Lee YO. Mechanisms of microwave irradiation involved in the destruction of fecal coliforms from biosolids. *Water Res.* 2004;38:1615-25.

41. Hume WR, Makinson OF. Sterilizing dental instruments: evaluation of lubricating oils and microwave radiation. *Oper Dent*. 1978;3:93-6.
42. Ikawa JY, Rossen JS. Reducing bacteria in household sponges. *J Environ Health*. 1999;62:1-5.
43. Isenberg, H. D. (ed.). 1992. *Clinical microbiology procedures handbook*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
44. Jasnow SB, Smith JL. Microwave sanitization of color additives used in cosmetics: feasibility study. *Appl Microbiol*. 1975;30:205-11.
45. Jeng DKH, Kaczmarek KA, Woodworth AG, Balasky G. Mechanism of microwave sterilization in the dry state. *Appl Environ Microbiol*. 1987;53:2133-7.
46. Kielbassa AM, Hellwig E, Meyer-Lueckel H. Effects of irradiation on in situ remineralization of human and bovine enamel demineralized in vitro. *Caries Res*. 2006;40:130-5.
47. Kim SY, Jo EK, Kim HJ, Bai K, Park JK. The effects of high-power microwaves on the ultrastructure of *Bacillus subtilis*. *Let Appl Microbiol*. 2008; 47:35-40.
48. Kumar M, Sequeira PS, Peter S, Bhat GK. Sterilisation of extracted human teeth for educacional use. *Indian J Med Microbiol*. 2005;23:256-8.
49. Latimer JM, Matsen JM. Microwave oven irradiation as a method for bacterial decontamination in a clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol*. 1977;6:340-2.
50. Lee JJ, Nettey-Marbell A, Cook A Jr, Pimenta LA, Leonard R, Ritter AV. Using extracted teeth for research. The effect of storage medium and sterilization on dentin bond strengths. *J Am Dent Assoc*. 2007;138:1599-603.
51. Lewinstein I, Fuhrer N, Churaru N, Cardash H. Effect of different peroxide bleaching regimens and subsequent fluoridation on the hardness of human enamel and dentin. *J Prosthet Dent*. 2004;92:337-42.

52. Lin JJ, Cameron SM, Runyan DA, Craft DW. Disinfection of denture base acrylic resin. *J Prosthet Dent.* 1999;81:202-6.
53. Lolayekar NV, Bhat VS, Bhat SS. Disinfection methods of extracted human teeth. *J Oral Health Comm Dent.* 2007;1:27-9.
54. Medeiros CL, González-López S, Bolaños-Carmona MV, Sanchez-Sanchez P, Bolaños-Carmona J. Effects of phosphoric acid on bovine enamel bleached with carbamide peroxide. *Eur J Oral Sci.* 2008;116:66-71.
55. Mellberg JR. Hard-tissue substrates for evaluation of cariogenic and anti-cariogenic activity in situ. *J Dent Res.* 1992;71(Spec No):913-9.
56. Mima EGO, Pavarina AC, Neppelenbroek KH, Spolidorio DMP, Machado AL, Vergani CE. Effect of different exposure times of microwave irradiation on the disinfection of a hard chairside reline resin. *J Prosthodont.* 2008;17: 312–7.
57. Molinari JA, Runnells RR. Role of disinfections in infection control. *Dent Clin North Am.* 1991;35:323-71.
58. Neppelenbroek KH, Pavarina AC, Spolidorio DM, Vergani CE, Mima EGO, Machado AL. Effectiveness of microwave sterilization on three hard chairside reline resins. *Int J Prosthodont.* 2003;16:616-20.
59. Olsen CM. Microwaves inhibit bread mold. *Food Eng.* 1965;37:51-3.
60. Pickwell E, Wallace VP, Cole BE, Ali S, Longbottom C, Lynch RJ, et al. A comparison of terahertz pulsed imaging with transmission microradiography for depth measurement of enamel demineralisation in vitro. *Caries Res.* 2007;41:49-55.
61. Pinto CF, Oliveira R, Cavalli V, Giannini M. Peroxide bleaching agent effects on enamel surface microhardness, roughness and morphology. *Braz Oral Res.* 2004;18:306-11.
62. Queiroz CS, Hara AT, Paes Leme AF, Cury JA. pH-Cycling models to evaluate the effect of low fluoride dentifrice on enamel de- and remineralization. *Braz Oral Res.* 2008;19:21-7.

63. Rios D, Honório HM, Magalhães AC, Delbem AC, Machado MA, Silva SM, et al. Effect of salivary stimulation on erosion of human and bovine enamel subjected or not to subsequent abrasion: an in situ/ex vivo study. *Caries Res.* 2006;40:218-23.
64. Rodrigues JA, Marchi GM, Ambrosano GM, Heymann HO, Pimenta LA. Microhardness evaluation of in situ vital bleaching on human dental enamel using a novel study design. *Dent Mater.* 2005;21:1059-67.
65. 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;46:215-20.
66. Rohrer MD, Bulard RA. Microwave sterilization. *J Am Dent.* 1985;110:194-8.
67. Rohrer MD, Terry MA, Bulard RA, Graves DC, Taylor EM. Microwave sterilization of hydrophilic contact lenses. *Am J Ophthalmol.* 1986;101:49-57.
68. Rosaspina S, Salvatorelli G, Anzanel D, Bovolenta R. Effect of microwave radiation on *Candida albicans*. *Microbios.* 1994;78(314):55-9.
69. Sanborn MR, Wan SK, Bulard R. Microwave sterilization of plastic tissue culture vessels for reuse. *Appl Environ Microbiol.* 1982;44:960-4.
70. Sanità PV, Vergani CE, Giampaolo ET, Pavarina AC, Machado AL. Growth of *Candida* species on complete dentures: effect of microwave disinfection. *Mycoses.* 2008;52:154-60.
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;19:288-93.
72. Sonju Clasen AB, Ogaard B. Experimental intra-oral caries models in fluoride research. *Acta Odontol Scand.* 1999;57:334-41.
73. Tarantino L, Tomassini E, Petti S, Simonetti D'Arca A. L'impiego di un apparecchio a microonde nella sterilizzazione di strumentario odontoiatrico: possibilità e limiti. *Minerva Stomatol.* 1997;46:561-6.

74. Ten Bosch JJ, Angmar-Mansson B. A review of quantitative methods for studies of mineral content of intra-oral incipient caries lesions. *J Dent Res.* 1991;70:2-14.
75. Thomas RZ, Ruben JL, Ten Bosh JJ. Effect of ethylene oxide sterilization on enamel and dentin demineralization in vitro. *J Dent.* 2007;35:547-51.
76. 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;34:246-53.
77. Vela GR, Wu JF. Mechanism of lethal action of 2,450-MHz radiation on microorganisms. *Appl Environ Microbiol.* 1979;37:550-3.
78. Vieira AE, Delbem AC, Sassaki KT, Rodrigues E, Cury JA, Cunha RF. Fluoride dose response in pH-cycling models using bovine enamel. *Caries Res.* 2005;39:514-20.
79. Watanabe K, Kakita Y, Kashige N, Miake F, Tsukiji T. Effect of ionic strength on the inactivation of microorganisms by microwave irradiation. *Lett Appl Microbiol.* 2000;31:52-6.
80. Watson PS, Sissons CH, Devine DA, Shore RC, Kirkham J, Nattress BR, et al. Minimizing prion risk without compromising the microbial composition of biofilms grown in vivo in a human plaque model. *Lett Appl Microbiol.* 2004;38:211-6.
81. Webb BC, Thomas CJ, Harty DW, Willcox MD. Effectiveness of two methods of denture sterilization. *J Oral Rehabil.* 1998;25: 416-23.
82. White JM, Goodis HE, Marshall SJ, Marshall GW. Sterilization of teeth by gamma radiation. *J Dent Res.* 1994;73:1560-7.
83. White RR, Hays GL. Failure of ethylene oxide to sterilize extracted human teeth. *Dent Mater.* 1995;11:231-3.
84. Wu Q. Effect of high-power microwave on indicator bacteria for sterilization. *IEEE Trans Biomed Eng.* 1996;43:752-4.

85. XL STAT – Statistical software for MS Excel. Available at: <http://www.xlstat.com>.
86. Yeo CB, Watson IA, Stewart-Tull DE, Koh VH. Heat transfer analysis of *Staphylococcus aureus* on stainless steel with microwave radiation. J Appl Microbiol. 1999;87:396-401.
87. 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;60:581-5.
88. Zaura E, Buijs MJ, Ten Cate JM. The effects of the solubility of artificial fissures on plaque pH. J Dent Res. 2002;81:567-71.
89. Zero DT. In situ caries models. Adv Dent Res. 1995;9:214-30.
90. Zero DT, Lussi A. Erosion-chemical and biological factors of importance to the dental practitioner. Int Dent J. 2005;55(4 Suppl 1):285-90.

Apêndices

APÊNDICE 1

Tabela A1 – Valores originais das contagens (ufc/mL $\times 10^6$) dos microrganismos para as amostras dos grupos Controles e Irradiados

Amostra	GRUPO			
	Controle		Irradiado	
	aerobiose	anaerobiose	aerobiose	anaerobiose
1	376	199	0	0
2	388	490	0	0
3	575	316	0	0
4	466	950	0	0
5	238	1016	0	0
6	440	1200	0	0
7	438	422	0	0
8	314	210	0	0
9	706	1200	0	0
10	416	678	0	0
11	336	321	0	0
12	356	594	0	0
13	272	213,8	0	0
14	420	476	0	0
15	260	600	0	0
16	362	361,6	0	0
17	988	1200	0	0
18	360	260,8	0	0
19	328	586	0	0
20	256	27,4	0	0

APÊNDICE 2

Tabela A2 – Valores originais de microdureza superficial (kg/mm²) das amostras dos grupos Controle e Irradiado

Amostra	GRUPO	
	Controle	Irradiado
1	282,88	194,16
2	184,62	277,02
3	294,5	171,12
4	217,32	259,88
5	339,28	274,6
6	194,5	262,4
7	197,62	226,94
8	318,76	332,325
9	254,04	281,32
10	348,04	351,4
11	244,68	370,95
12	312,42	311,8
13	365,08	267,34
14	340,2	293,4
15	356,18	264,54
16	211,72	338,62
17	284,54	376,825
18	282,62	311,04

APÊNDICE 3

Tabela A3 – Valores originais de perda mineral (% vol. mineral $\times$ μm) das amostras dos grupos Controle e Irradiado

Amostra	GRUPO	
	Controle	Irradiado
1	475,00	946,46
2	1494,90	820,39
3	964,22	699,13
4	966,04	1689,75
5	1487,83	2235,72
6	811,95	647,78
7	1485,24	805,55
8	1185,73	1375,98
9	1914,62	1284,08
10	759,26	884,14
11	1505,06	2219,92
12	1155,21	929,40
13	1719,05	1006,00
14	1603,46	1352,01
15	1344,56	1672,99
16	1167,15	703,88
17	1448,57	1460,21
18	1005,40	757,36

APÊNDICE 4

Tabela A4 – Valores originais de porcentagem de perda mineral (% ΔZ) das amostras dos grupos Controle e Irrradiado

Amostra	GRUPO	
	Controle	Irrradiado
1	2,4	4,9
2	6,6	3,7
3	4,4	3,2
4	5,1	7,0
5	5,6	8,6
6	2,9	2,6
7	5,7	3,4
8	4,4	6,2
9	8,7	5,5
10	3,4	3,9
11	6,0	8,9
12	4,2	3,5
13	6,7	3,9
14	6,5	5,3
15	5,2	6,4
16	4,6	3,0
17	6,3	5,8
18	3,8	2,8

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

PATRICIA GABRIELA SABINO VIANA
Araraquara, 27 de março de 2009.

Viana, Patrícia Gabriela Sabino

Esterilização de esmalte bovino por meio de irradiação por microondas. Efeito sobre a microdureza superficial e resistência à desmineralização / Patrícia Gabriela Sabino Viana. – Araraquara: [s.n.], 2009.

123 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Vergani

1. Esterilização	2. Microondas	3. Esmalte dentário
4. Desmineralização	5. Testes de dureza	I. Título