

**MARCOS UYEDA AIVAZOGLU**

**INFLUÊNCIA DE SOLUÇÕES DE ARMAZENAMENTO,  
MÉTODOS DE ESTERILIZAÇÃO E SUAS ASSOCIAÇÕES  
SOBRE A MICRODUREZA DENTINÁRIA RADICULAR EM  
DENTES HUMANOS: estudo *in vitro***



2009

**MARCOS UYEDA AIVAZOGLU**

**INFLUÊNCIA DE SOLUÇÕES DE ARMAZENAMENTO, MÉTODOS DE  
ESTERILIZAÇÃO E SUAS ASSOCIAÇÕES SOBRE A MICRODUREZA  
DENTINÁRIA RADICULAR EM DENTES HUMANOS:  
*estudo in vitro***

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA RESTAURADORA, Especialidade Endodontia.

Orientador: Prof. Dr. Claudio Antonio Talge Carvalho

São José dos Campos

2009

Apresentação gráfica e normalização de acordo com:  
Alvarez S, Coelho DCAG, Couto RAO, Durante APM. Guia prático para  
Normalização de Trabalhos Acadêmicos da FOSJC. São José dos  
Campos: FOSJC/UNESP; 2008.

A96i Aivazoglou, Marcos Uyeda.  
Influência de soluções de armazenamento, métodos de esterilização  
e suas associações sobre a microdureza dentinária radicular em dentes  
humanos: estudo *in vitro* / Marcos Uyeda Aivazoglou. \_\_ São José dos  
Campos : [s.n.], 2009.  
113.f. : il.

Dissertação (Mestrado em Odontologia Restauradora) – Faculdade  
de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual  
Paulista, 2009.  
Orientador: Prof. Dr. Claudio Antonio Talge Carvalho.

1.Exposição a agentes biológicos. 2. Esterilização. 3. Testes de  
dureza I. Carvalho, Claudio Antonio Talge. II. Universidade Estadual  
Paulista. Faculdade de Odontologia de São José dos Campos. III.  
Título.

tD24

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação  
da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP

## AUTORIZAÇÃO

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por  
qualquer meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte.

São José dos Campos, 10 de setembro de 2009.

Assinatura :

E-mail:

marcos.aivaz@gmail.com

## **BANCA EXAMINADORA**

**Prof. Dr. Claudio Antonio Talge Carvalho** (Orientador)

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos

Universidade Estadual Paulista – UNESP

**Dra. Samira Esteves Afonso Camargo**

Doutora pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia Restauradora  
da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos

Universidade Estadual Paulista – UNESP

**Prof. Dr. Carlos Rocha Gomes Torres**

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos

Universidade Estadual Paulista - UNESP

São José dos Campos, 20 de julho de 2009.

## DEDICATÓRIA

À minha família que, eu sei, estará sempre lá...

Aos grandes amigos que, eu sei, estarão sempre lá...

Aos filhos que um dia, com sorte, virão;

À mãe deles, também.

Enfim, a todos aqueles para os quais palavras de dedicação não  
bastam em dedicatórias.

## AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao meu orientador Prof. Dr. Claudio Antonio Talge Carvalho, pela tranqüilidade ímpar e confiança sempre depositada. Obrigado por me deixar sempre à vontade na relação orientador-orientando; Sua maneira de trabalhar possibilitou um importante desenvolvimento em minha autonomia enquanto ser pensante e investigador que aspira à carreira acadêmica.

## AGRADECIMENTOS

A todos os servidores da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP; pessoas que trabalham direta e indiretamente para a formação de profissionais acima da média nacional.

Ao Conselho da Pós-Graduação, representado pelo seu Coordenador, Prof. Adj. Clovis Pagani, por propiciar meu aprimoramento profissional e pessoal.

À Prof<sup>a</sup>. Adj. Marcia Carneiro Valera Garakis, pelo voto de confiança e o senso humano que sempre a acompanhou, além da experiência transmitida a cada contato.

À Prof<sup>a</sup>. Adj. Ana Paula Martins Gomes pelo carinho e presteza em ajudar e contribuir para meu crescimento, e também por ter aceito o convite de fazer parte do meu Exame Geral de Qualificação. Suas observações somaram para a melhoria na qualidade deste trabalho.

Ao Professor e “Mestre” José Benedito Oliveira Amorim, que desde a graduação despertou em mim a vontade de aprender sempre mais; agradeço-o também pelas contribuições assaz pertinentes quando fez parte da Banca do meu EGQ. Seguirá sendo um grande exemplo para mim.

Ao Tenente Torres (também conhecido como Prof. Dr. Carlos Rocha Gomes Torres), meu irmão-de-arms e exemplo de integridade e disciplina a ser seguido. Obrigado pelas informações preciosas e precisas que sempre forneceu, além de ajudar a utilizar os equipamentos do laboratório.

Ao professor e Diretor José Roberto Rodrigues pelo excelente trabalho que vem fazendo ao longo de sua gestão, além do humor inteligente e das palavras de motivação que sempre transmitiu, especialmente no crédito de redação científica.

Ao amigo-irmão-mais-velho-compadre Fábio José Condino Fugarra, pelo companheirismo, pela convivência, pelo apoio de sempre, e por me safar da maior onça dos tempos de Marinha! (quando servíamos juntos no Colégio Naval) Tenho certeza que nossa amizade perdurará por muito tempo!



A todo o pessoal do CEO (Centro de Especialidades Odontológicas) de Suzano: ao gerente e coordenador de Saúde Bucal Dr. Ricardo Zapata, pela flexibilidade e compreensão que me possibilitaram conciliar o trabalho e a pós-graduação, aos escriturários Déia e Thiago, a toda a equipe de cirurgiões-dentistas, às ACD (Creuza, Sula, Renata, Gislaine e Mariana), e à Juliana pelo suporte na limpeza e por seus dotes culinários... São pessoas de inestimável valor com as quais tenho o prazer de trabalhar todos os dias!

Ao querido Professor Ivan Balducci que, poucos sabem, foi meu treinador de xadrez dos 7 aos 12 anos de idade, e hoje em muito tem colaborado para o meu desenvolvimento, especialmente estatístico. O xadrez sem dúvida é um esporte que deveria ser mais praticado pelos jovens.

À Chefe do Departamento de Odontologia Restauradora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Filomena Huhtala, pelas consecutivas autorizações para uso do laboratório em horários “alternativos” (após as 23h e em sábados, domingos e feriados!). Muito obrigado!

Aos colegas de pós-graduação Alana, Aletéia, Lorraine, Kaizo, Marianna, Humberto (meus companheiros de mestrado), Alessandra Sverberi, Paula, Lilian, João, Daniel, Eron, Fernandinha Mollica (do doutorado) pelo conhecimento trocado e pela convivência, que rendeu muitas e boas risadas. Torço pelo sucesso contínuo de todos vocês!

Às técnicas do Departamento de Odontologia Restauradora, Josi, Fernanda e Clelia por me deixarem usar aquele laboratório, às vezes além da conta. Ainda na Restauradora, à Rosângela e D. Marinete, que estão sempre a sorrir e nos transmitir simpatia.

Às secretárias da Pós-Graduação, Erena, Cidinha, Rose e Lilian, sempre atentas aos nossos “deslizes”.

À CBE Embrarad pela realização da esterilização por radiação gama dos espécimes deste trabalho.

A todos que contribuíram para meu desenvolvimento ao longo do curso de pós-graduação, meus sinceros agradecimentos!

"Life is what happens to you while you're busy making other  
plans..."

John Winston Lennon

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	12
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	13
<b>LISTA DE QUADROS E TABELAS</b> .....	15
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	17
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	19
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	23
<b>2.1 Armazenamento e esterilização de dentes extraídos para estudos <i>in vitro</i></b> .....	23
2.1.1 Soluções de armazenamento.....	23
2.1.2 Métodos de desinfecção/esterilização.....	29
<b>2.2 Microdureza</b> .....	36
2.2.1 Definições.....	36
2.2.2 Microdureza em pesquisa odontológica.....	37
<b>3 PROPOSIÇÃO</b> .....	49
<b>4 MATERIAL E MÉTODO</b> .....	50
<b>4.1 Material utilizado</b> .....	50
<b>4.2 Método experimental</b> .....	53
4.2.1 Obtenção e seleção dos dentes.....	53
4.2.2 Preparo dos espécimes.....	54
4.2.3 Padronização para as leituras de microdureza.....	59
4.2.4 Estudo do fator armazenamento.....	63
4.2.5 Estudo do fator esterilização.....	64
4.2.6 Associação dos fatores armazenamento/esterilização....	65
<b>4.3 Delineamento estatístico</b> .....	67
4.3.1 Análise da influência exercida pelo armazenamento.....	68

4.3.2 Análise da influência exercida pela esterilização.....	69
4.3.3 Análise da associação armazenamento/esterilização.....	70
4.3.4 Validação do método estatístico adotado.....	73
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>75</b>
<b>5.1 Efeitos do armazenamento.....</b>	<b>77</b>
<b>5.2 Efeitos da esterilização.....</b>	<b>80</b>
<b>5.3 Efeitos da associação armazenamento/esterilização....</b>	<b>82</b>
<b>5.4 Validação do método estatístico adotado.....</b>	<b>86</b>
5.4.1 Independência.....	87
5.4.2 Homocedasticidade.....	88
5.4.3 Distribuição normal.....	89
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>91</b>
<b>6.1 Literatura e metodologia.....</b>	<b>91</b>
<b>6.2 Discussão dos resultados.....</b>	<b>93</b>
6.2.1 Armazenamento.....	93
6.2.2 Esterilização e associações.....	95
<b>7 CONCLUSÕES.....</b>	<b>98</b>
<b>8 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>99</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>109</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>113</b>

Aivazoglou MU. Influência de soluções de armazenamento, métodos de esterilização e suas associações sobre a microdureza dentinária radicular em dentes humanos: estudo *in vitro* [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP; 2009.

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a ação das soluções de armazenamento: água destilada (G1), solução de timol a 0,05%(G2), formalina a 10%(G3), e hipoclorito de sódio a 1%(G4), bem como os métodos de esterilização por autoclave (A) e radiação gama (B), e as associações dos dois fatores, sobre a microdureza da dentina radicular de terceiros molares extraídos. Os dados obtidos foram submetidos aos testes *t* de Student, ANOVA a 2 e 3 fatores, e teste de Tukey, todos com  $\alpha=0,05$ . Quanto ao armazenamento, o G1(nos dois períodos avaliados) foi o único grupo que não alterou significativamente a microdureza, sendo seguido pelos grupos G2 e G3 (7 dias), G2 e G3 (28 dias), e G4 (7 e 28 dias), tendo estes dois últimos subgrupos apresentado as maiores perdas de microdureza. Na análise da esterilização isoladamente, não houve diferença significativa para os 2 métodos quando comparadas as microdurezas iniciais e após a esterilização (autoclave:  $p=0,144$ ; raios gama:  $p=0,827$ ), apesar da esterilização por autoclave ter induzido diferenças significantes no grupo armazenado por 28 dias em água destilada. Entretanto, estudada a interação de todos os fatores, encontraram-se diferenças significantes quanto à solução empregada, método de esterilização e interações entre eles ( $p<0,05$ ). Com base nos dados analisados pôde-se concluir que o armazenamento em água destilada não alterou a microdureza dentinária radicular, e sua associação à esterilização por radiação gama foi o melhor método para o armazenamento e esterilização de dentes, no que diz respeito às influências sobre a variável estudada, sendo indicados para dentes extraídos a serem utilizados em pesquisa.

Palavras-chave: Exposição a Agentes Biológicos. Esterilização. Testes de Dureza. Dentina. Raiz Dentária.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Desenho esquemático da geometria do indentador tipo Vickers e a impressão por ele realizada (Modificado de Callister, WD. Materials science and engineering - an introduction. New York, 2007).....	37
Figura 2 - Desenho esquemático ilustrando o plano de secção para obtenção das duas metades de cada raiz, com a face média em comum.....	54
Figura 3 - Procedimento de corte dos dentes e molde de silicona utilizado para a inclusão das raízes em resina.....	55
Figura 4 - Raízes incluídas em resina acrílica, com a face média voltada para cima.....	56
Figura 5 - Fita adesiva colada ao centro da placa de vidro, com o molde de silicona em posição, detalhe da remoção da face externa da fita com auxílio de uma espátula de inserção nº 1, raízes devidamente posicionadas.....	57
Figura 6 - Segunda placa de vidro em posição, após a inserção da resina acrílica no conjunto.....	58
Figura 7 - Esquema da padronização para observações de microdureza.....	59
Figura 8 - Politriz circular DP-10 do Departamento de Odontologia Restauradora da FOSJC-UNESP.....	60
Figura 9 - Microdurômetro Microhardness Tester FM 700 do Departameto de Odontologia Restauradora da FOSJC-UNESP.....	61
Figura 10 - Desenho esquemático das indentações a 500 µm da luz do canal.....	61
Figura 11 - Disposição/destinação dos 16 blocos após sorteio.....	62

Figura 12 - Histograma obtido após teste de Kolmogorov-Smirnov, confirmando o caráter de normalidade para os valores de microdureza inicial (Md1) de todos os espécimes.....	72
Figura 13 - Gráfico tipo P-Plot da distribuição amostral em relação ao valor normal esperado.....	76
Figura 14 - Gráfico dos grupos experimentais quanto ao armazenamento.....	78
Figura 15 - Gráfico da interação dos fatores solução e período de armazenamento, obtido a partir da diferença [(MD1) – (MD2)].....	79
Figura 16 - Gráfico da interação dos 3 fatores após a esterilização.....	85
Figura 17 - Gráfico de dispersão dos resíduos na ANOVA a 2 fatores realizada após o armazenamento.....	87
Figura 18 - Gráfico de dispersão dos resíduos na ANOVA a 3 fatores realizada após a esterilização.....	88
Figura 19 - Gráfico mostrando distribuição normal dos resíduos para ANOVA a 2 fatores pós-armazenamento.....	90
Figura 20 - Gráfico mostrando distribuição normal dos resíduos da ANOVA 3 fatores pós-esterilização.....	90



## LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 - Material utilizado.....	50
Quadro 2 - Resumo do delineamento estatístico para análise dos efeitos do armazenamento.....	68
Quadro 3 - Resumo do delineamento estatístico para análise dos efeitos da esterilização.....	70
Quadro 4 - Resumo do delineamento estatístico para análise dos efeitos da associação armazenamento/esterilização...	71
Tabela 1 - Valores médios de microdureza e desvio-padrão observados nos diferentes grupos e subgrupos de cada análise.....	75
Tabela 2 - Teste t de Student após armazenamento.....	77
Tabela 3 - ANOVA a 2 fatores após o armazenamento.....	79
Tabela 4 - Análise do armazenamento. Distribuição dos conjuntos homogêneos após teste de Tukey.....	80
Tabela 5 - Teste t de Student para o fator esterilização.....	81
Tabela 6 - Teste t de Student para o método de esterilização por autoclave em diferentes períodos de armazenamento em água destilada.....	82
Tabela 7 - Teste t de Student para o método de esterilização por radiação gama em diferentes períodos de armazenamento em água destilada.....	82
Tabela 8 - Testes t de Student para o método de esterilização por autoclave.....	83
Tabela 9 - Testes t de Student para o método de esterilização por radiação gama.....	84

Tabela 10 - Teste ANOVA a 3 fatores realizado após as esterilizações.....	85
Tabela 11 - Resultado do teste de Tukey após ANOVA a 3 fatores.....	86
Tabela 12 - Resultado do teste de Levene para ANOVA a 2 fatores pós-armazenamento.....	89
Tabela 13 - Resultado do teste de Hartley-Cochran-Bartlett para ANOVA a 3 fatores pós-esterilização.....	89

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- $\mu\text{m}$  = Micrometro
- $\mu\text{N}$  = Micronewton
- AEAF = Água Eletrolítica Ácida Forte
- ANOVA = Análise de Variância
- $\text{Ca(OH)}_2$  = Hidróxido de Cálcio
- CDC = *Centers for Disease Control and Prevention*
- CDTA = Ácido Ciclohexano-1,2-Diamino Tetra-Acético
- DP = Desvio-Padrão
- EDTA = Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
- EDTAC = Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético com Cetavlon
- EGTA = Ácido Etileno Glicol Tetra-Acético
- EITF = Espectrometria Infra-Vermelha com Transformada de Fourier
- g = Grama
- G1 = Grupo 1 (Água Destilada)
- G2 = Grupo 2 (Solução de Timol a 0,05%)
- G3 = Grupo 3 (Solução de Formalina a 10%)
- G4 = Grupo 4 (Solução de Hipoclorito de Sódio a 1%)
- GI = Graus de Liberdade
- h = Hora
- $H_0$  = Lê-se “Agá zero” (Hipótese de Nulidade)
- $H_1$  = Lê-se “Agá um”
- $\text{H}_2\text{O}$  = Água
- $\text{H}_2\text{O}_2$  = Peróxido de Hidrogênio
- HV = *Vickers Hardness*
- ISO = *International Organization for Standardization*

JAC = Junção Amelocementária  
kg = Quilograma  
kgf/cm<sup>2</sup> = Quilograma-força por Centímetro Quadrado  
kGy = Quilogray  
krad = Quilorad  
M = Molar  
Md<sub>1</sub> = Microdureza Inicial  
Md<sub>2</sub> = Microdureza Pós-Armazenamento  
Md<sub>3</sub> = Microdureza Pós-Esterilização  
min = Minuto  
ml = Mililitro  
mm = Milímetro  
mN = Milinewton  
n = Número de Espécimes da Amostra  
NaF = Fluoreto de Sódio  
NaOCl = Hipoclorito de Sódio  
Ni-Ti = Níquel-Titânio  
Nm = Nanometro  
*Normal P-Plot* = *Normal Probability Plot*  
°C = Grau Celsius  
OSHA = *Occupational Safety and Health Administration*  
p = Fator “p” de Probabilidade em Estatística  
pH = Potencial Hidrogeniônico  
*P-Plot* = *Probability Plot*  
s = Segundo  
SSBH = Solução Salina Balanceada de Hank  
t = Fator “t” do Teste de Student  
VHN = *Vickers Hardness Number*

# 1 INTRODUÇÃO

Dentes extraídos são amplamente utilizados em trabalhos de pesquisa odontológica, seja em estudos microbiológicos (Fagrell et al.<sup>25</sup>, 2008; Fimple et al.<sup>27</sup>, 2008; Norrington et al.<sup>54</sup>, 2008; Shabahang et al.<sup>67</sup>, 2008), morfológicos (Catros et al.<sup>16</sup>, 2008; Esclassan Noirrit et al.<sup>24</sup>, 2008; Manjunath et al.<sup>44</sup>, 2008), biomecânicos (Barjau-Escribano et al.<sup>6</sup>, 2006; Burcak Cengiz et al.<sup>13</sup>, 2006; Soares et al.<sup>73</sup>, 2008), relativos a novos materiais (Alani et al.<sup>1</sup>, 2008; Coniglio et al.<sup>17</sup>, 2008) ou a novas técnicas (Gaggl et al.<sup>29</sup>, 2007; Sengun et al.<sup>66</sup>, 2008).

Tais dentes devem ser considerados infectantes e os agentes infecciosos a eles associados precisam ser eliminados, sendo desejáveis mínimas alterações estruturais e nas propriedades biomecânicas dos tecidos, ou, idealmente, que tais não ocorram durante este processo (Brauer et al.<sup>12</sup>, 2008; Moscovich et al.<sup>51</sup>, 1999; White et al.<sup>83</sup>, 1994).

De acordo com o “Center for Disease Control and Prevention” (CDC), dentes extraídos livres de amálgama devem ser esterilizados em autoclave por 40 minutos e os que contenham amálgama devem ser armazenados em solução de formalina a 10% por duas semanas antes de sua utilização, procedimento efetivo na desinfecção tanto das estruturas externas quanto internas dos dentes (Kohn et al.<sup>39</sup>, 2003).

Normalmente os dentes extraídos são armazenados em alguma solução após sua obtenção e antes da esterilização. Entretanto, o efeito das soluções de armazenamento e a esterilização sobre esmalte e dentina não está claro (Lee et al.<sup>41</sup>, 2007).

Diferentes meios de armazenamento e métodos de esterilização têm sido estudados, bem como suas implicações sobre

algumas propriedades do substrato dental, tendo sido encontrados resultados divergentes.

Segundo revisão realizada por DeWald<sup>21</sup> (1997) acerca da influência do armazenamento e esterilização de dentes em estudos de adesão, resultados muito variáveis foram atribuídos ao armazenamento em formalina 10%, enquanto a utilização de esterilização química com calor (*chemiclave*) e em autoclave produziram resultados mais próximos aos grupos controle. Ainda segundo esse estudo, a esterilização por óxido de etileno, mesmo tendo produzido resultados semelhantes aos grupos controle, foi provada como ineficiente na eliminação total dos microrganismos, afirmação última de acordo com estudo conduzido por WhiteHays<sup>84</sup> (1995).

Resultados diferentes foram encontrados por Lee et al.<sup>41</sup> (2007), que avaliaram os efeitos de meios de armazenamento e métodos de esterilização sobre a força adesiva na dentina de dentes bovinos, tendo concluído que a imersão em solução de formalina 10% representou a melhor opção tanto para armazenamento quanto para desinfecção dos dentes, e deveria ser indicada previamente a estudos de adesão. Segundo este autor, a esterilização em autoclave afetou negativamente a força adesiva na metade dos grupos testados.

Já segundo Zheng et al.<sup>89</sup> (2005), em estudo que utilizou diferentes meios de armazenamento em testes adesivos envolvendo micro-tração, apesar de não ter havido diferenças estatisticamente significantes entre o grupo armazenado em formalina 10% e o controle, o congelamento dos dentes a -20 °C e a solução de cloramina a 1% foram apontados como meios preferenciais de armazenamento quando não forem disponíveis dentes recém-extraídos em número suficiente para testes de força adesiva. Em adição, Brännström et al.<sup>11</sup> (1992), em trabalho no qual os dentes foram congelados ou armazenados em solução de cloramina a 1%, concluíram ser preferível a primeira

alternativa em relação à última quando da realização de estudos de infiltração e força adesiva.

No estudo de Pashley et al.<sup>60</sup> (1993), não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes na permeabilidade dentinária bem como na força adesiva em dentes submetidos a esterilização por óxido de etileno ou autoclave quando comparados ao grupo controle, não esterilizado.

Outro método de esterilização passível de aplicação em dentes extraídos é a radiação gama, que segundo estudos realizados não causa alterações morfológicas na dentina (DeWald<sup>21</sup>, 1997; Sperandio et al.<sup>75</sup>, 2001) nem no esmalte (Rodrigues et al.<sup>62</sup>, 2004) tendo como inconveniente o fato de não ser facilmente disponível e apresentar custo elevado quando comparado a outros métodos (Lee et al.<sup>41</sup>, 2007). A maior parte dos estudos com radiação gama em pesquisa odontológica utilizou a dose comumente empregada na esterilização de artigos médicos, que é de 25 kGy (Amaechi et al.<sup>2</sup>, 1998; Amaechi et al.<sup>3</sup>, 1999; Moscovich et al.<sup>51</sup>, 1999; Rodrigues et al.<sup>62</sup>, 2004).

Dentre as propriedades físicas da estrutura dental, a microdureza tem sido largamente estudada, tendo Panighi e G'Sell<sup>57</sup> (1993) encontrado uma forte correlação entre microdureza e força adesiva tanto para esmalte quanto para dentina.

Os sistemas adesivos continuam em franca evolução, com aplicação não apenas em dentística, mas também na cimentação de retentores intra-radulares livres de metal (Esclassan Noirrit et al.<sup>24</sup>, 2008; Wrbas et al.<sup>86</sup>, 2007) e inclusive na obturação de canais radiculares (Sly et al.<sup>72</sup>, 2007).

Deste modo, vários foram os trabalhos que estudaram as propriedades do esmalte e da dentina coronária, entretanto não foram encontrados trabalhos que tenham avaliado a ação de diferentes soluções de armazenamento e meios de esterilização, bem como a associação destes sobre a dentina radicular no que diz respeito à sua microdureza.

Esta dissertação visa a contribuir para o conhecimento relacionado ao contexto apresentado, uma vez que a maioria dos estudos em endodontia – especialmente no tocante à adesão dentinária radicular - é realizada por meio de testes *in vitro* utilizando dentes extraídos, nos quais não apenas fatores relacionados à adesão devem ser levados em consideração, como também as propriedades biomecânicas do remanescente radicular, dentre as quais enquadrando-se a microdureza dentinária.



## 2 REVISÃO DA LITERATURA

Por se tratar de um estudo voltado para a pesquisa odontológica em si, a revisão de literatura desta dissertação agrega uma gama de estudos envolvendo variadas metodologias. Visando a facilitar a leitura, encontra-se dividida nas seguintes seções primárias e secundárias:

- a) armazenamento e esterilização de dentes extraídos para estudos *in vitro*:
  - soluções de armazenamento;
  - métodos de desinfecção/esterilização;
- b) microdureza:
  - definições;
  - microdureza em pesquisa odontológica.

### **2.1 Armazenamento e esterilização de dentes extraídos para estudos *in vitro***

#### 2.1.1 Soluções de armazenamento

Brännström et al.<sup>11</sup> (1992) avaliaram o efeito do armazenamento de dentes e a limpeza da cavidade na formação de desadaptações em restaurações classe II confeccionadas com cimento de ionômero de vidro e resina composta. Foram utilizados o congelamento e o armazenamento em solução de cloramina a 1%, associados à limpeza das cavidades com solução contendo EDTA a 0,2% e NaF a 1%. Em todas as cavidades utilizaram-se os mesmos materiais de proteção (cimento de ionômero de vidro) e restauração (resina composta). Houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos: nos dentes armazenados em cloramina houve maior número de desadaptações e estas apresentaram maior tamanho, quando este grupo foi comparado aos dentes previamente congelados. Assim, os autores concluíram que em dentes a serem utilizados para estudos adesivos e de infiltração, deve ser preferível o congelamento ao armazenamento em solução de cloramina a 1%.

Miears et al.<sup>48</sup> (1995) avaliaram a influência da presença ou ausência de umidade antes da aplicação de um sistema adesivo, e diferentes períodos de pós-armazenamento em água destilada sobre a resistência adesiva ao cisalhamento na dentina de molares humanos extraídos. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes em nenhum dos grupos experimentais quanto às variáveis estudadas. Tanto a umidificação ou secagem do substrato antes da aplicação do sistema adesivo quanto o armazenamento dos espécimes em água destilada por períodos diferentes (24 h e 90 dias, a 37 °C) pareceram não exercer efeitos sobre a resistência adesiva ao cisalhamento.

Camps et al.<sup>15</sup> (1996) conduziram estudo com a finalidade de avaliar a influência da criopreservação e armazenamento na microinfiltração de dois sistemas adesivos. Para tanto foram utilizados dentes recém-extraídos nas seguintes condições: sem nenhum tratamento; criopreservados; e armazenados em solução de cloramina a

0,5% a 4 °C (refrigerados). A criopreservação é definida como a preservação de tecidos anatômicos a temperaturas muito baixas, por períodos variáveis, em vapor de nitrogênio líquido. Nesse estudo foram confeccionadas restaurações classe V em resina composta após os diferentes períodos de armazenamento nos diferentes meios. Os resultados revelaram não haver diferenças estatisticamente significantes na microinfiltração entre os grupos de dentes criopreservados, refrigerados (cloramina 0,5% a 4 °C) por 12 dias e os recém-extraídos. Entretanto, o armazenamento em solução de cloramina por 48 dias ou mais foi responsável por aumentar em 4 vezes os valores de microinfiltração em seus respectivos grupos. Ainda assim não foi encontrado nenhum tipo de correlação linear ou exponencial entre período de armazenamento e microinfiltração. Os autores concluíram que o armazenamento em solução de cloramina a 0,5% a 4 °C por 48 dias ou mais pode causar aumento na microinfiltração, enquanto a criopreservação por 13 semanas ou armazenamento na solução anterior por períodos inferiores não parece alterar os valores de microinfiltração.

Strawn et al.<sup>76</sup> (1996), se propuseram a determinar os efeitos do armazenamento sobre a dentina, por meio de uma análise espectroscópica. A partir de terceiros molares recém-extraídos foram obtidos discos de dentina de 0,75 mm de espessura (de secções paralelas ao plano oclusal dos dentes), os quais foram armazenados nas seguintes soluções: água destilada com timol a 0,02%; água purificada e filtrada; solução tampão de fosfato com 0,02% de timol; álcool a 70%; e solução de formalina a 10%. As análises foram realizadas utilizando-se a espectrometria infra-vermelha com transformada de Fourier (EITF), nos períodos de 0, 1, 2, 7, 14, 21 e 28 dias. Os resultados das análises no espectro infra-vermelho não mostraram diferenças significantes quanto às posições de pico referentes ao colágeno ou minerais para qualquer solução a qualquer período de armazenamento. Houve diferenças, entretanto, nas intensidades de pico da dentina armazenada em água

destilada, água purificada e filtrada, e solução tampão de fosfato ao longo do tempo. Concluíram os autores que mudanças na química superficial e nas propriedades ópticas da dentina ocorrem em função da solução e período de armazenamento, o que deve ser considerado quando se estuda a dentina.

Tonami et al.<sup>79</sup> (1996) submeteram dentes bovinos ao congelamento ou à água fervente antes de realizarem ensaios de resistência à tensão. Os tempos de congelamento foram de 7 dias, 4 semanas e 1 ano. O grupo no qual se utilizou água fervente foi submetido a este meio por 45 min. Os grupos experimentais foram comparados a controle composto de dentes recém-extraídos (menos de 8 h após extração). Os resultados encontrados pelos autores os permitiram concluir que o congelamento em todos os períodos não alterou significativamente a resistência à tensão, enquanto a fervura em água resultou em queda significativa nos valores da referida propriedade.

Em estudo complexo, Titley et al.<sup>77</sup> (1998) se propuseram a verificar a influência de 10 diferentes condições de armazenamento e da radiação gama sobre a resistência adesiva ao cisalhamento na dentina de incisivos bovinos, tendo encontrado resultados divergentes aos relatados em estudos congêneres. Segundo os autores, 4 dos 11 grupos experimentais (radiação gama, armazenamento em solução de timol, metanol e glutaraldeído) resultaram em resistências adesivas significativamente menores, sendo os menos recomendáveis para aplicação em dentes a serem submetidos a estudos de resistência adesiva ao cisalhamento. Além disso, os resultados mostraram não ter havido diferenças entre os grupos armazenados em água destilada congelada, soluções de formalina a 10%, NaOCl a 1%, cloramina-T a 0,5%, *homofix* (solução contendo 70 ml de água, 30 ml de glicerol e 4 g de fenol), e água destilada a 4 °C (por 2 meses).

Ghersel et al.<sup>30</sup> (2001), avaliaram a influência do método de armazenamento na microinfiltração em segundos molares decíduos

restaurados com diferentes sistemas adesivos. Os métodos de armazenamento estudados foram: o congelamento em solução fisiológica; meio hidratado (solução fisiológica em refrigerador); e meio desidratado (mantidos secos em recipiente aberto). Todos os dentes foram inicialmente autoclavados antes da divisão entre os grupos experimentais. Foram confeccionadas restaurações classe II nas duas faces proximais, utilizando diferentes sistemas adesivos em cada cavidade, sendo os espécimes submetidos à termociclagem e posterior análise da microinfiltração marginal. Foi concluído que não houve diferenças significantes entre os tipos de armazenamento, tendo sido constatada microinfiltração superior e estatisticamente significativa nas paredes cervicais quando comparadas às paredes axiais dos preparos.

Habelitz et al.<sup>33</sup> (2002) estudaram as propriedades nanomecânicas em esmalte e dentina de terceiros molares extraídos, após a utilização de diferentes substâncias de armazenamento (água deionizada, solução salina de cloreto de cálcio, e solução salina balanceada de Hank - SSBH) nos períodos de 1 e 2 semanas. Os dentes foram previamente esterilizados por baixa dose de radiação gama (não especificada pelos autores), e armazenadas em água destilada a 4 °C até sua utilização. Nanoindentações com cargas de 1500 e 750 µN foram realizadas (em esmalte e dentina, respectivamente), resultando em penetrações de 300 a 400 nm de profundidade. Os resultados encontrados mostraram que o armazenamento tanto em solução salina de cloreto de cálcio quanto em água deionizada alteraram significativamente o módulo de elasticidade do esmalte, enquanto o armazenamento em SSBH não o fez. Quanto à dureza do esmalte e dentina, foram verificados efeitos semelhantes. Os autores concluíram que, visando à manutenção das propriedades físicas dos tecidos dentais é recomendável seu armazenamento em SSBH.

A *International Organization for Standardization (ISO)*<sup>35</sup> (2003), em sua especificação técnica número 11405, segunda edição,

trata de testes de adesão à estrutura dental. Na referida especificação, é dada preferência à utilização de dentes recém-extraídos para este tipo de estudo. Contudo, na inviabilidade de se dispor de dentes nessa condição, a recomendação é que imediatamente após a extração, os dentes sejam lavados abundantemente em água corrente e que restos de sangue e tecidos aderidos sejam removidos. Em seguida, os dentes devem ser armazenados em água destilada ou solução de cloramina-T a 0,5% por, no máximo, uma semana, e depois armazenados definitivamente em água destilada a 4 °C ou congelados a pelo menos -5 °C. Não é recomendada a utilização de qualquer outro agente químico devido ao risco de ocorrer absorção deste pelo dente e conseqüentemente alterações na estrutura dental.

Em estudo de resistência adesiva à micro-tração, Zheng et al.<sup>89</sup> (2005) se propuseram a avaliar a influência exercida por diferentes meios de armazenamento. Utilizaram-se pré-molares humanos que, imediatamente após a extração, foram armazenados nos seguintes meios: solução de timol a 0,02%; solução de formalina a 10%; solução de cloramina a 1%; água destilada a 4 °C; e congelamento em água destilada a -20 °C. Os sistemas adesivos e restaurações em resina composta foram aplicados após os períodos de 10 e 90 dias de armazenamento. Os resultados mostraram diferenças significantes na resistência adesiva à micro-tração entre os grupos. Comparados aos dentes que não foram submetidos ao armazenamento, os grupos armazenados em água destilada a 4 °C e em solução de timol a 0,02% resultaram em valores significativamente menores da variável estudada. Os diferentes períodos de armazenamento não exerceram efeitos. Concluíram os autores que os meios e métodos de armazenamento de dentes podem influenciar a resistência adesiva à micro-tração. Recomendaram ainda a opção pelo congelamento ou armazenamento em cloramina a 1% quando não houver número suficiente de dentes recém-extraídos para se realizar estudo adesivo.

Utilizando dentes bovinos, Lee et al.<sup>41</sup> (2007) avaliaram a influência do armazenamento e esterilização sobre a resistência adesiva em dentina. Foram testadas as seguintes soluções de armazenamento: água destilada; solução de cloreto de sódio a 0,9%; solução de cloramina-T a 0,5%; solução de NaOCl a 5,25%; solução de glutaraldeído a 2%; e solução de formalina a 10%. Em todos os grupos o armazenamento se deu por 60 dias. Como métodos de esterilização foram utilizados a autoclave e o armazenamento em solução de formalina a 10% por 14 dias (sem exposição adicional a este meio para o grupo já armazenado na referida solução). Os resultados encontrados mostraram redução significativa na resistência adesiva dos espécimes armazenados na solução de NaOCl quando comparados aos demais grupos. A esterilização em autoclave afetou negativamente os grupos inicialmente armazenados em água destilada e formalina a 10%, enquanto a esterilização apenas em formalina não exerceu efeito significativo sobre a resistência adesiva.

### 2.1.2 Métodos de desinfecção/esterilização

White et al.<sup>83</sup> (1994), em estudo envolvendo radiação gama, tiveram como objetivos avaliar os efeitos de vários métodos de esterilização (radiação gama, autoclave, calor seco, e óxido de etileno) sobre a estrutura e função dentinária – em termos espectroscópicos e de micro-infiltração - bem como definir parâmetros de radiação gama para esterilização de dentes extraídos. Os dentes utilizados foram armazenados previamente em solução salina tampão de fosfato contendo 0,02% de timol (para controlar o crescimento bacteriano). Para determinação da dose efetiva de radiação gama para esterilizar os dentes, foi inoculada em reservatórios criados após o preparo

biomecânico (utilizando NaOCl a 5,25%) e obturação dos canais radiculares, a bactéria *B. subtilis*, comumente utilizada em estudos microbiológicos por sua conhecida resistência. Segundo os autores, com uma dose de 173 krad (o equivalente a 1,73 kGy), já foi conseguida a esterilização dos espécimes; além disso, as análises espectroscópicas não detectaram alterações quando da utilização deste método, enquanto todos os demais métodos de esterilização induziram algum tipo de alteração detectável. A radiação gama também não alterou as propriedades dentinárias com relação à permeabilidade.

No intuito de investigar a liberação de mercúrio quando realizada a esterilização, em autoclave, de dentes contendo restaurações de amálgama, Parsell et al.<sup>58</sup> (1996) submeteram a este método de esterilização uma quantidade de amálgama simulando a de 175 dentes restaurados com este material. Foi constatado que os vapores de mercúrio provenientes deste processo alcançaram níveis significativamente maiores do que os limites aceitos pela *Occupational Safety and Health Administration* (OSHA), contra-indicando este procedimento, que consiste em risco desnecessário à saúde dos profissionais de odontologia, uma vez que podem ser selecionados dentes que não contenham amálgama para posterior utilização em ensino/pesquisa.

Importante estudo de revisão foi realizado por DeWald<sup>21</sup> (1997), envolvendo considerações acerca do controle de infecção em dentes extraídos para utilização em estudos adesivos *in vitro*. Foram revisados artigos publicados que tratassem dos efeitos de diferentes métodos de desinfecção e esterilização sobre os dentes, como alterações estruturais e da permeabilidade dentinária e seus efeitos em estudos de adesão. Segundo o autor, os meios e métodos de desinfecção/esterilização mais estudados foram o armazenamento em formalina a 10%, esterilização química com calor, autoclave, óxido de etileno e radiação gama. Os resultados dos estudos empregando



armazenamento em formalina a 10% mostraram resultados controversos; os métodos por autoclave e esterilização química produziram resultados comparáveis aos controles utilizados nos estudos; a radiação gama não produziu alterações estruturais na dentina, mas teve seus efeitos sobre a adesão - até então - pouco estudados; e o óxido de etileno, embora produzindo resultados de adesão semelhantes aos controles, foi provado como ineficaz no tocante à esterilização de dentes propriamente dita. Concluiu o autor preconizando o uso dos métodos de esterilização química e por autoclave para prevenção de contaminação cruzada durante estudos *in vitro* envolvendo adesão.

Amaechi et al.<sup>2</sup> (1998) estudaram a eficácia de diferentes métodos de esterilização em dentes destinados a testes intra-orais de cariogenicidade, bem como suas influências sobre o processo de desmineralização do esmalte. Foram utilizados incisivos bovinos divididos entre o grupo controle e os seguintes métodos de esterilização: radiação gama (dose de 25 kGy); autoclave (121 °C por 15 min); solução de NaOCl a 12% por 24 h; e solução de iodopovidona a 7,5% por 24 h. Os procedimentos para contagem dos microrganismos viáveis após cada método de esterilização foram realizados após incubação dos espécimes por 24 h a 37 °C em ágar infusão de cérebro e coração e em ágar-sangue. Lesões artificiais de cárie foram produzidas utilizando-se solução ácida tamponada (pH 4,5). As perdas minerais e profundidade das lesões foram quantificadas micro-radiograficamente. Houve crescimento bacteriano apenas no grupo controle (em ambos os meios de cultura utilizados). Os autores relataram as seguintes alterações induzidas ao esmalte pelos diferentes métodos: a radiação gama provocou alteração de cor ("*cream discolouration*"); o NaOCl provocou clareamento; e a iodopovidona provocou lesões em forma de manchas brancas. Com relação às perdas minerais e profundidade das lesões não houve diferenças significantes entre os grupos experimentais e o controle, entretanto, depois do grupo controle, o grupo da radiação gama foi o que

mostrou menor perda mineral, tendo os autores concluído se tratar do método mais aceitável para esterilização de esmalte a ser utilizado em estudos de cariogenicidade intra-oral.

Em estudo subsequente, Amaechi et al.<sup>3</sup> (1999), avaliaram os efeitos da esterilização sobre a integridade estrutural das cáries artificiais produzidas para estudos de cariogenicidade intra-oral. Após a confecção de lesões de cárie artificiais em dentes bovinos, estes foram divididos em duas metades (uma servindo de controle e a outra submetida a um dos métodos de esterilização já descritos no trabalho anterior, dos mesmos autores). Após a esterilização, os espécimes dos grupos experimentais, bem como os do grupo controle (não esterilizado), foram incubados em meios de cultura por até 7 dias a 37 °C, sob condições de aerobiose e anaerobiose. A perda mineral e profundidade das lesões foram então quantificadas por meio de micro-radiografias transversas. Novamente o crescimento bacteriano ocorreu apenas no grupo controle, tendo os autores observado os mesmos fenômenos, sobre a coloração do esmalte, relatados no estudo anterior. A autoclavagem dos espécimes, bem como a exposição às soluções de NaOCl e iodopovidona resultaram em desmineralização adicional das lesões. Novamente foi apontada a esterilização por radiação gama como o método mais aceitável considerando-se os efeitos adversos dos outros métodos em estudo.

No estudo de Moscovich et al.<sup>51</sup> (1999), utilizou-se a radiação gama (dose de 25 kGy) como meio de esterilização de dentes humanos extraídos, tendo sido concluído que este processo - juntamente com o congelamento em água a -18 °C por 12 dias - não causou efeitos na microdureza da dentina coronária.

Dominici et al.<sup>22</sup> (2001) conduziram estudo com o objetivo de avaliar a eficácia de diferentes métodos de desinfecção/esterilização em dentes extraídos a serem utilizados para fins educacionais. O microrganismo utilizado neste estudo foi o *Bacillus stearothermophilus*,

uma bactéria resistente ao calor e frequentemente utilizada em estudos microbiológicos. Foram empregados dentes humanos hígidos armazenados em solução salina até o momento da utilização, os quais tiveram os tecidos pulpares removidos via acesso coronário e inoculados com o referido microrganismo no interior dos canais radiculares. Foram testados os seguintes métodos de desinfecção/esterilização: imersão em soluções de NaOCl em várias concentrações (1,3; 2,6 e 5,25%) por 7 dias; imersão em solução de formalina a 10% por diferentes períodos (2, 4 e 7 dias); imersão em amônio quaternário a 0,28% por 7 dias; imersão em glutaraldeído a 2% por 7 dias; ciclos de autoclavagem com diferentes durações (20 e 40 min); e imersão em solução salina por 7 dias (grupo controle). Os dois únicos grupos capazes de impedir a recuperação do microrganismo utilizado, após os processos de esterilização, foram a autoclavagem (ciclo de 40 min) e o armazenamento em formalina a 10% por uma semana.

Segundo trabalho de Sperandio et al.<sup>75</sup> (2001), no qual estudou-se o efeito da esterilização por radiação gama (25 kGy) sobre a morfologia dentinária e resistência adesiva em pré-molares humanos extraídos, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre o grupo controle e o submetido à radiação, tanto no tangente à morfologia dentinária (verificada por microscopia eletrônica de varredura), quanto à resistência adesiva ao cisalhamento. Os autores concluíram que a radiação gama não afetou as variáveis em estudo.

Uma compilação feita por Kohn et al.<sup>39</sup> (2003) resultou em documento publicado pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) com as diretrizes no tocante ao controle de infecção nas atividades relacionadas aos cuidados com a saúde bucal. Neste documento são dadas introdutoriamente definições acerca de vários conceitos envolvidos no tema, e posteriormente são desenvolvidas recomendações a serem seguidas. Foi incluída neste documento uma seção que trata do manuseio de dentes extraídos, com uma sub-seção a respeito do uso de dentes

extraídos para fins educacionais. Com relação a este tópico, o CDC recomenda a esterilização dos dentes em autoclave previamente à utilização. Dentes contendo amálgama não devem ser autoclavados devido ao risco relacionado aos vapores de mercúrio resultantes deste processo (como já mencionado no estudo de Parsell et al.<sup>58</sup>, 1996), devendo nesse caso ser utilizado o armazenamento em formalina a 10% por 14 dias, o que seria eficaz na desinfecção tanto da superfície externa quanto interna dos dentes. O documento em questão afirma que, para fins educacionais (especificamente no uso em atividades pré-clínicas em instituições de ensino odontológico), a esterilização em autoclave parece não induzir a alterações que prejudiquem o aprendizado dos alunos; entretanto não se sabe se este processo afeta a estrutura dental sob o ponto de vista de estudos em pesquisa odontológica.

Rodrigues et al.<sup>62</sup> (2004) objetivaram avaliar em seu estudo a influência da radiação gama sobre as propriedades mecânicas do esmalte e a desmineralização *in vitro*. Foram utilizados terceiros molares humanos hígidos divididos em 2 grupos: irradiados por 25 kGy de radiação gama; e não irradiados (controle). Sequencialmente à obtenção dos valores de microdureza (Knoop: 25 g por 5 s) de ambos os grupos, os espécimes foram submetidos à ciclagem de pH para obtenção dos dados referentes à perda mineral. Os autores chamaram a atenção para a mudança na coloração das estruturas dentais após a irradiação. Os resultados mostraram que não foram induzidas alterações nas propriedades mecânicas do esmalte por ação da radiação gama, uma vez que os valores de microdureza obtidos não apresentaram diferenças significantes. Da mesma maneira, a resistência à desmineralização *in vitro* não foi alterada.

Em outro estudo relacionado à utilização de dentes extraídos para fins educacionais, Kumar et al.<sup>40</sup> (2005) avaliaram os seguintes métodos de desinfecção/esterilização: imersão em formalina a 10% por 7 dias; imersão em peróxido de hidrogênio a 3% por 7 dias;

imersão em NaOCl a 2,6% por 7 dias; fervura em água a 100 °C por 20 min; autoclavagem (ciclo de 30 min); e imersão em solução salina fisiológica por 7 dias (grupo controle). Utilizaram-se dentes humanos extraídos por motivo periodontal. Após os tratamentos supracitados, os espécimes foram incubados em meio de cultura por 48 h. Os resultados mostraram que apenas a autoclavagem e o armazenamento em formalina a 10% foram eficazes na desinfecção/esterilização dos espécimes, tendo os autores concluído que tais métodos devem ser eficazes para este propósito.

No trabalho de Brauer et al.<sup>12</sup> (2008) também foi estudada a radiação gama como método de esterilização de dentes. Os autores utilizaram terceiros molares extraídos que foram armazenados em SSBH até o momento de sua utilização. As variáveis experimentais foram obtidas por meio de ensaios de dureza utilizando nanoindentadores tipo Berkovich com cargas de 400 e 2000  $\mu$ N, respectivamente em dentina e esmalte, que forneceram valores relativos ao módulo de elasticidade e dureza dos espécimes. Neste estudo os grupos foram divididos em: controle (não esterilizado); submetido a dose de 7 kGy; e submetido a dose de 35 kGy. Os resultados permitiram concluir não haver associação entre as propriedades nano-mecânicas dos dentes e a dose de radiação gama utilizada na esterilização, constituindo-se este método como útil na esterilização de dentes extraídos, uma vez que as alterações por ele impostas são mínimas.

## 2.2 Microdureza

### 2.2.1 Definições

A dureza é uma propriedade mecânica que consiste na medida da resistência de um material a uma deformação plástica localizada. Existem vários tipos de ensaios mecânicos de dureza, dentre os quais os ensaios Brinell, Rockwell, Knoop e Vickers (os dois últimos permitindo a realização de ensaios de microdureza, quando utilizados indentadores de tamanho diminuto e cargas pequenas, segundo Callister<sup>14</sup>, 2007).

O ensaio de dureza Vickers foi proposto em 1925 por Smith e Sandland. O indentador (penetrador) é uma pirâmide de diamante, de base quadrada, com um ângulo de 136° entre as faces opostas (Figura 1). No ensaio de microdureza utiliza-se carga menor que 1 kg, a qual produz uma impressão microscópica em forma de losango regular com a base quadrada (Callister<sup>14</sup>, 2007; Ferreira<sup>26</sup>, 2004).

A unidade de dureza Vickers (HV) é uma função da carga aplicada ( $P$ ) e da diagonal ( $d_1$ ) da impressão deixada na superfície do material, conforme a equação abaixo:

$$HV = \frac{1,854P}{d_1^2}$$

Onde  $P$  é dada em kg, e  $d$  em mm (Callister<sup>14</sup>, 2007; Moraes<sup>50</sup>, 2004).

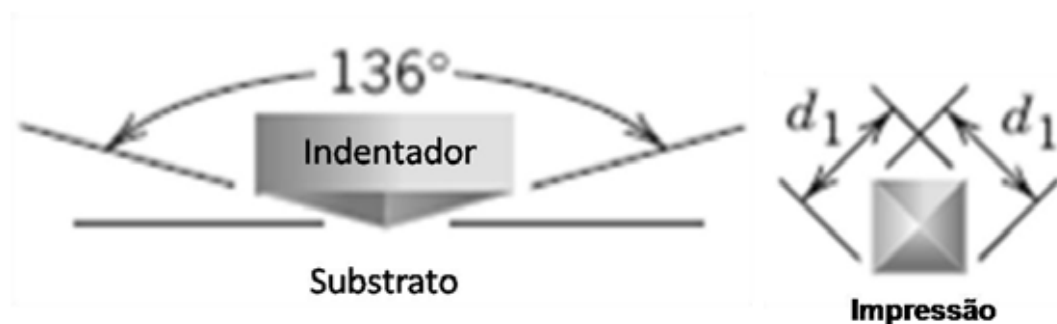


Figura 1- Desenho esquemático da geometria do indentedor tipo Vickers e a impressão por ele realizada. (Modificado de Callister, WD. Materials science and engineering - an introduction. New York, 2007.)

### 2.2.2 Microdureza em pesquisa odontológica

A microdureza dos tecidos dentais tem sido alvo de muitas investigações dentro da pesquisa odontológica.

Craig et al.<sup>18</sup> (1959) realizaram um dos primeiros estudos sobre o assunto, objetivando encontrar uma correlação entre microdureza e diferenças na estrutura dental. Esses autores obtiveram as medidas de microdureza a partir de secções transversais distantes entre si de 1 a 2 mm, retirando entre elas secções mais finas (0,1 mm) que foram coradas histologicamente pela técnica do tricrômio de Pollak modificada. A partir desta técnica, áreas contendo maior quantidade de matéria orgânica apresentam coloração de roxo escuro a azul, enquanto áreas mais calcificadas coram-se de rosa a magenta. Deste modo as medidas de microdureza das secções foram baseadas na coloração das secções finas adjacentes coradas. Foi utilizada a microdureza Knoop, tendo os autores utilizado cargas de 2 a 25 g por 15 s. Quanto à dentina radicular, foram encontrados valores menores de microdureza nas áreas mais próximas à luz do canal, entretanto relataram os autores terem encontrado valores

semelhantes aos da dentina coronária (terço médio da coroa) quando tomadas medidas a 0,5 mm da luz do canal e 0,5 mm da junção amelo-cementária, respectivamente. Segundo os autores, comparações de microdureza entre regiões dentais diferentes devem ser realizadas no mesmo dente, uma vez que a microdureza dentinária pode variar consideravelmente em regiões similares de dentes diferentes.

Biven et al.<sup>8</sup> (1972) estudaram os efeitos do eugenol e de cimentos endodônticos contendo eugenol sobre a microdureza da dentina radicular. Foram utilizados dentes humanos permanentes recém-extraídos, seccionados ao nível do terço médio das raízes, tendo sido os fragmentos incluídos em resina, de maneira que os 4 mm a partir da face média ficassem fora da inclusão. As porções radiculares receberam o tratamento com cimentos à base de eugenol, enquanto as porções coronárias receberam o tratamento com o eugenol. O controle constituiu-se de 2 espécimes que foram preparados da mesma maneira, entretanto ficando apenas em estufa a 37 °C e 90% de umidade relativa. Foi utilizada a microdureza Knoop, com carga de 10 g por 15 s. Encontraram-se valores maiores de microdureza após a aplicação dos fatores experimentais, tendo os autores concluído que a microdureza da dentina submetida a eugenol e cimentos contendo essa substância aumenta significativamente, tendendo tal aumento a atingir os valores máximos em um período de 3 semanas.

Grajower et al.<sup>31</sup> (1977), em estudo da microdureza da dentina esclerótica (transparente), compararam esta à dentina opaca adjacente. A análise destes autores foi realizada em dentes humanos unirradiculados, tanto em cortes transversais como em cortes longitudinais, tendo sido empregado o ensaio de microdureza Vickers, com carga de 200 g. Foram encontrados valores de microdureza superiores na dentina esclerótica quando comparada à dentina opaca adjacente, esta apresentando valores maiores do que a dentina em



regiões mais distantes da esclerótica e mais apicalmente. Os autores também afirmaram que a dentina apical é menos dura que a dentina próxima à coroa antes da ocorrência da obliteração dos túbulos por material calcificado.

Com a proposição de determinar uma possível correlação entre microdureza dentinária e densidade de túbulos dentinários em dentes humanos permanentes, Pashley et al.<sup>59</sup> (1985) realizaram leituras seriais de microdureza e densidade tubular nos mesmos grupos de túbulos, começando próximos à junção amelodentinária e progredindo em direção à polpa. Os resultados confirmaram haver uma significativa correlação inversa entre as variáveis estudadas; a densidade tubular aumenta em direção à câmara pulpar, simultaneamente ao decréscimo nos valores de microdureza. Segundo os autores, este fenômeno presumivelmente ocorre devido à redução na quantidade de dentina intertubular e ao aumento no diâmetro individual dos túbulos quando se caminha neste sentido.

Panighi e G'Sell<sup>56</sup> (1992), conduziram um estudo em duas etapas, no qual inicialmente foram caracterizadas superfícies dentinárias quanto à microdureza Vickers e a composição em termos de cálcio e fósforo. Na segunda fase do mencionado estudo, os autores compararam a microdureza dos espécimes à capacidade de molhamento de um adesivo dentinário. Estabeleceu-se uma correlação positiva entre os seguintes parâmetros: grau de mineralização, dureza e capacidade de molhamento do adesivo.

Os mesmos autores (Panighi, G'Sell<sup>57</sup>, 1993), em investigação para testes de força adesiva de um compósito dental, caracterizaram a microestrutura da dentina e do esmalte segundo a topologia de superfície, a concentração de elementos minerais (por sonda microeletrônica), e a microdureza Vickers. Relataram os autores existir

uma forte correlação entre força adesiva e microdureza através de uma equação linear simples, válida tanto para esmalte quanto para dentina. Por sua vez, a microdureza apresenta correlação com a concentração de cálcio através de duas relações lineares distintas (esmalte e dentina). Foi concluído que os mecanismos de adesão tanto para esmalte quanto para dentina são afetados pelo conteúdo mineral e a topologia da superfície do substrato dental.

Meredith et al.<sup>47</sup> (1996) calcularam a microdureza e módulo de Young em esmalte e dentina coronária. Foi utilizada a dureza Knoop, sendo o módulo de Young calculado a partir de comparações das medidas das diagonais maior e menor do losango em diferentes momentos (as diferenças nas medidas ocorrem devido a alterações elásticas). Na dentina, os valores de microdureza encontrados foram maiores conforme maior distância da junção amelo-dentinária, o mesmo ocorrendo para o módulo de Young.

No trabalho já mencionado de Moscovich et al.<sup>51</sup> (1999), foram investigados os efeitos em curto prazo da irradiação por raios gama e do congelamento em água sobre a dureza da dentina coronária. Foi utilizada a dureza Vickers, com carga de 30 g por 20 s. Os espécimes foram divididos aleatoriamente em 3 grupos: congelamento em água a -18 °C por 12 dias; exposição a dose única de radiação gama; e armazenamento em água a 20 °C por 12 dias (controle). As indentações foram realizadas antes e após a aplicação dos fatores experimentais. Os resultados encontrados pelos autores mostraram que ambos os processos não exerceram alterações na microdureza dentinária dos espécimes.

O efeito de diferentes soluções irrigadoras sobre a dentina radicular nos terços cervical, médio e apical foi estudado por Saleh e Ettman<sup>64</sup> (1999). Utilizaram-se como soluções irrigadoras o peróxido de

hidrogênio a 3% alternado com hipoclorito de sódio a 5%, e o EDTA a 17%. O ensaio utilizado foi o de microdureza Knoop, com carga de 100 g por 15 s. Diferenças nos valores de microdureza foram relacionadas ao local das indentações, com valores menores conforme maior proximidade à luz dos canais. Houve redução significativa na microdureza dos espécimes após o tratamento nos dois grupos, tendo sido a redução no grupo do EDTA maior e estatisticamente diferente do grupo peróxido de hidrogênio/hipoclorito de sódio.

Mahoney et al.<sup>42</sup> (2000) realizaram estudo da dureza e módulo de elasticidade de esmalte e dentina em molares decíduos através de um sistema computadorizado de ultra-micro-indentações, empregando indentador tipo Berkovitch com carga máxima de 50 mN. Os autores, utilizando uma análise de regressão linear, encontraram forte correlação entre dureza e módulo de elasticidade, tanto para esmalte quanto para dentina.

A ação de três soluções quelantes sobre a microdureza da dentina radicular foi estudada por Cruz-Filho et al.<sup>20</sup> (2001). Os autores testaram as soluções de EDTAC a 15%, CDTA a 1% e EGTA a 1%, tendo como controle um grupo submetido à água destilada. Foi utilizado o ensaio de microdureza Vickers, com carga de 50 g por 15 s. Apesar de não ter sido encontrada diferença entre as três soluções testadas, todas elas ocasionaram redução estatisticamente significativa da microdureza dentinária radicular.

Com metodologia semelhante, Cruz-Filho et al.<sup>19</sup> (2002) avaliaram a influência de concentrações diferentes de EGTA sobre a microdureza da dentina radicular, também utilizando o ensaio Vickers com carga de 50 g por 15 s. Os autores concluíram que todas as concentrações estudadas reduziram significativamente a microdureza dentinária quando comparadas ao grupo controle (água destilada),

havendo diferenças também entre elas. Os grupos em ordem decrescente de microdureza foram: grupo controle, EGTA a 1%, EGTA a 3% e EGTA a 5%.

Slutzky-Goldberg et al.<sup>70</sup> (2002) compararam o efeito de dois tipos de instrumentação (manual com limas de aço inoxidável convencionais, e rotatória com limas de Ni-Ti), ambas associadas à solução de NaOCl a 2,5%, sobre a microdureza da dentina radicular, realizando leituras a 500 e 1000  $\mu\text{m}$  de distância à luz dos canais. Os autores utilizaram o ensaio tipo Vickers, com carga de 300 g por 10 s. Concluíram que houve redução da microdureza dentinária em todos os grupos experimentais, sendo a redução a 500  $\mu\text{m}$  maior que a 1000  $\mu\text{m}$ , isto somado ao fato de ter a instrumentação manual com limas de aço inoxidável ocasionado uma maior redução na microdureza quando comparada à instrumentação rotatória com limas de Ni-Ti. Ainda, este último grupo não diferiu do grupo submetido apenas à mesma solução irrigadora, porém sem instrumentação.

Utilizando o mesmo sistema de ultra-micro-indentações empregado no já mencionado estudo de Mahoney et al.<sup>42</sup> (2000), Angker et al.<sup>4</sup> (2003) também estudaram molares decíduos quanto à dureza e módulo de elasticidade, utilizando entretanto uma carga máxima de 25 mN, tanto para esmalte quanto para dentina. Estes autores reiteraram como evidente o fato de haver uma redução gradual nos valores de dureza e módulo de elasticidade com a proximidade à polpa, tendo os espécimes mostrado uma tendência similar, a despeito das variações nos valores de ambas as variáveis. Também foi relatada uma correlação linear significativa entre ambas.

Ari et al.<sup>5</sup> (2004) realizaram estudo da influência de diferentes soluções irrigadoras sobre a microdureza e rugosidade da dentina radicular, com o propósito de avaliar a viabilidade de utilização de

uma solução de gluconato de clorexidina. Foram utilizadas as soluções de NaOCl a 5%, NaOCl a 2,5%, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 3%, EDTA a 17%, gluconato de clorexidina a 0,2% e água destilada (grupo controle). Novamente o ensaio de microdureza empregado foi o Vickers, tendo sido utilizada carga de 300 g por 20 s para a obtenção dos dados. Os resultados mostraram que todas as soluções teste com exceção da clorexidina alteraram negativamente a microdureza da dentina radicular, o mesmo ocorrendo com relação à rugosidade de superfície, a qual não foi alterada pela clorexidina nem pela solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 3%. Concluíram os autores consistir a mencionada solução de clorexidina em uma substância viável para irrigação de canais radiculares.

Visando a avaliar a resistência à tensão e a microdureza dentinária após diferentes pré-tratamentos, Fuentes et al.<sup>28</sup> (2004) submeteram espécimes a: EDTA 0,5 M, NaOCl 5%, EDTA 0,5 M seguido de infiltração por sistema adesivo, e NaOCl 5% seguido de infiltração por sistema adesivo, comparando-os à dentina normalmente mineralizada. Foi realizado teste de resistência à tensão, tendo sido o ensaio de microdureza (Knoop) efetuado nas linhas de fratura. Ambas as substâncias afetaram negativamente a resistência à tensão e a microdureza. Os grupos que foram submetidos à infiltração de sistema adesivo mostraram valores maiores das duas variáveis, entretanto não atingindo os valores da dentina originalmente mineralizada. Os autores concluíram alertando para o fato de que a utilização das mencionadas substâncias previamente a procedimentos restauradores adesivos pode produzir um substrato dental mais frágil na interface dente/restauração, por sua vez podendo levar a falhas prematuras.

Em estudo que avaliou o efeito de diferentes concentrações e períodos de aplicação de soluções de NaOCl como irrigantes (2,5 e 6% por 5, 10, e 20 min) sobre a microdureza Vickers da dentina radicular de dentes bovinos, Slutzky-Goldberg et al.<sup>71</sup> (2004),

chegaram às seguintes conclusões: após 10 min de aplicação das soluções de NaOCl houve redução significativa da microdureza dentinária, de tal maneira sendo aconselhável, segundo esses autores, limitar-se o período de irrigação a um máximo de 10 min, a fim de não prejudicar as propriedades físicas da dentina; a 500  $\mu$ m da luz dos canais a redução da microdureza foi maior quando utilizada a solução de NaOCl 6%, sugerindo os autores que se evite o uso de soluções fortemente concentradas no interior dos canais radiculares.

Yoldas et al.<sup>87</sup> (2004) investigaram a ação de duas preparações à base de  $\text{Ca(OH)}_2$  (associado à glicerina e associado à água destilada) sobre a microdureza Knoop da dentina radicular, após 24 h, 3 e 7 dias. As indentações foram realizadas com carga de 100 g por 15 s. Houve redução estatisticamente significativa nos valores de microdureza, para ambas as preparações, apenas após 3 dias, sendo a redução ocasionada pela preparação de glicerina maior e estatisticamente diferente da ocasionada pela preparação com água destilada. Concluíram os autores que o uso de medicações intra-canais à base de  $\text{Ca(OH)}_2$  pode amolecer o tecido dental e causar alterações na superfície dentinária radicular.

Eldeniz et al.<sup>23</sup> (2005) estudaram o efeito do ácido cítrico a 19% e EDTA a 17% sobre a microdureza e rugosidade da dentina radicular. Utilizaram o ensaio Vickers, com carga de 300 g por 20 s para cada indentação. Em ambos os grupos experimentais foi realizada uma última irrigação com NaOCl a 2,5%. Os resultados revelaram aumento significativo na rugosidade superficial quando comparados os grupos experimentais ao controle (irrigados apenas com água destilada), sendo o grupo do ácido cítrico o que causou maior aumento de rugosidade (diferença estatisticamente significativa em comparação ao grupo do EDTA). Com relação à microdureza, os grupos se comportaram de maneira similar ao ocorrido com a rugosidade.

Toledano et al.<sup>78</sup> (2005) realizaram estudo para verificar se a microdureza da dentina superficial ou profunda seria afetada por diferentes pré-tratamentos químicos realizados em procedimentos adesivos. Utilizaram terceiros molares humanos dos quais foram obtidos discos a partir das dentinas superficial e profunda. Os discos foram então apenas polidos (grupo controle); submetidos a condicionamento com ácido fosfórico a 37% por 15 s; submetidos ao mesmo condicionamento e infiltrados por sistema adesivo; polidos, condicionados e tratados com solução de NaOCl a 5% por 2 min, e; infiltrados por sistema adesivo após condicionamento ácido e tratamento com NaOCl. O ensaio de microdureza utilizado foi o Knoop, com carga de 20 g por 5 s. Os resultados encontrados foram a redução da microdureza das dentinas tanto superficial quanto profunda após condicionamento ácido. A aplicação da solução de NaOCl após o condicionamento ácido não afetou a microdureza da dentina superficial, entretanto o fez na dentina profunda. Os sistemas adesivos aplicados aumentaram a microdureza dentinária, entretanto sem que fossem atingidos os valores do grupo controle.

Em 2005, Vieira et al.<sup>80</sup> (2005) estudaram a influência da concentração de flúor nos dentes e da severidade de fluorose na microdureza e no processo de mineralização. Os autores utilizaram terceiros molares inclusos com indicação de exodontia e raízes com formação completa ou quase completa, provenientes de pacientes de 3 regiões diferentes: Montreal e Toronto, no Canadá; e Fortaleza, no Brasil (localidades com níveis ótimos ou sub-ótimos de flúor na água de abastecimento). Os dentes foram avaliados quanto à severidade de fluorose, concentração de flúor na dentina e no esmalte, microdureza e mineralização dentinárias. Quanto à microdureza, foi utilizado o ensaio Vickers, com carga de 100 g por 10 s. Os autores, considerando a severidade de fluorose como um exemplo de fator genético, concluíram que estes associados a fatores locais (como a concentração de flúor nos

dentos) influenciaram as propriedades mecânicas (microdureza), enquanto apenas os fatores locais influenciaram a mineralização. Os dentes provenientes de Fortaleza foram considerados mais duros e, controversamente, menos mineralizados, apresentando maior concentração de flúor na dentina. Os dentes provenientes de Montreal apresentaram menores níveis de severidade de fluorose quando comparados aos provenientes das demais localidades.

Bechtold<sup>7</sup> (2006) realizou estudo com o objetivo de avaliar o comportamento da dentina radicular bovina frente à aplicação de diferentes concentrações de NaOCl (a 0,5 e 2,5%) e a aplicação das mesmas soluções seguidas pelo cimento fosfato de zinco. Utilizou-se o ensaio Knoop (carga de 100 g por 15 s), sendo as indentações realizadas em duas distâncias à luz do canal (100 e 300  $\mu\text{m}$ ) em dois momentos (antes e após a aplicação dos fatores experimentais). A autora concluiu que os valores de microdureza a 300  $\mu\text{m}$  foram significativamente maiores que a 100  $\mu\text{m}$  da luz dos canais, tendo o grupo controle (submetido a solução fisiológica apenas) apresentado redução nos valores de microdureza em relação aos demais grupos experimentais (de maneira significativa quando comparado aos grupos tratados com NaOCl a 2,5% e NaOCl a 2,5% seguido de cimento de fosfato de zinco, nas duas distâncias, e ao grupo tratado com solução fisiológica seguida de cimento de fosfato de zinco, a 300  $\mu\text{m}$  da luz dos canais).

Em estudo realizado por Qing et al.<sup>61</sup> (2006), foi avaliada a influência da irrigação dos canais com uma solução de água eletrolítica ácida forte (AEAF, também conhecida por água ativada eletroquimicamente, ou água com potencial oxidativo) - uma substância originalmente utilizada para fins de desinfecção em agricultura - sobre a limpeza das paredes dentinárias e sua microdureza. A referida solução foi comparada ao NaOCl a 5,25%, ao  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 3% e ao EDTA a 14,3%. Para o ensaio de microdureza foi utilizada carga de 50 g por 15 s (Vickers). Os



autores concluíram que sob vibração ultra-sônica, o efeito de limpeza do uso combinado de AEAF e NaOCl foi equivalente ao grupo da associação NaOCl e EDTA, e que quando a AEAF foi utilizada como solução irrigadora por 1 min sob vibração ultra-sônica, não foi observado decréscimo nos valores de microdureza dentinária.

Oliveira et al.<sup>55</sup> (2007) avaliaram a ação de agentes clareadores internos - associados ou não à clorexidina - sobre a microdureza dentinária. Os grupos estudados foram o do perborato de sódio + água; perborato de sódio + gel de clorexidina a 2%; perborato de sódio + solução de peróxido de hidrogênio a 30%; e gel de peróxido de carbamida + gel de clorexidina a 2%. O ensaio de microdureza utilizado foi do tipo Knoop, com indentações de 25 g por 15 s. Concluiu-se que a maior perda de microdureza ocorreu no grupo tratado pela associação perborato de sódio + peróxido de hidrogênio a 30%; não foram encontradas diferenças entre os grupos de perborato de sódio + água e perborato de sódio + clorexidina, tendo os autores relatado que o gel de clorexidina a 2% não afetou negativamente a microdureza dentinária quando associado aos agentes clareadores.

Visando a avaliar a ação da clorexidina e do NaOCl, enquanto soluções irrigadoras, sobre a microdureza dentinária radicular, Oliveira et al.<sup>55</sup> (2007) utilizaram o ensaio de microdureza Vickers, com carga de 50 g por 10 s após a aplicação das diferentes soluções (tendo como controle um grupo irrigado com solução salina). Os canais foram irrigados com 1 ml de cada solução, que permaneceu em contato com a dentina radicular por 15 min. Os autores concluíram que ambas as soluções experimentais (clorexidina a 2% e NaOCl a 1%) reduziram a microdureza da dentina radicular a 500 e a 1000  $\mu\text{m}$  de distância à luz dos canais.

A microdureza e a liberação de fluoretos por materiais restauradores em diferentes soluções de armazenamento foi estudada por Silva et al.<sup>68</sup> (2007). Os materiais testados foram: um cimento de ionômero de vidro convencional; dois cimentos ionoméricos modificados por resina; e duas resinas compostas modificadas por poliácidos. Os meios de armazenamento foram a água destilada (controle) e soluções utilizadas para a ciclagem de pH (uma solução desmineralizadora e outra remineralizadora). As substâncias, inclusive do grupo controle, eram trocadas a cada 6 e 18 h (respectivamente as durações dos ciclos de desmineralização e remineralização), sendo as soluções retiradas avaliadas quanto à concentração de fluoretos. Os espécimes permaneceram nas soluções por um período total de 15 dias. Para a avaliação das microdurezas inicial e final foi empregado o ensaio Knoop com aplicação de carga perpendicular de 100 g por 5 s. Concluiu-se que ambas as variáveis foram influenciadas pelos meios nos quais os espécimes foram armazenados. O maior valor de microdureza foi constatado no grupo composto pelo cimento ionomérico convencional submetido à ciclagem de pH.

### **3 PROPOSIÇÃO**

A proposta deste trabalho foi avaliar a influência de diferentes soluções de armazenamento (água destilada, solução de timol a 0,05%, solução de formalina a 10%, e solução de hipoclorito de sódio a 1%, nos períodos de 7 e 28 dias), métodos de esterilização (por autoclave e radiação gama) e suas respectivas associações sobre a microdureza dentinária radicular humana.

## 4 MATERIAL E MÉTODO

Este estudo foi aprovado pelo comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP, sob o protocolo nº 075/2008-PH/CEP (ANEXO A).

Para facilitar a compreensão das etapas englobadas na execução da presente dissertação, este capítulo desenvolve-se em diferentes seções.

### 4.1 Material utilizado

Todo o material e os equipamentos utilizados neste estudo estão elencados no Quadro 1 abaixo.

Quadro 1- Material utilizado (continua).

MATERIAL	INFORMAÇÕES
192 metades radiculares obtidas a partir de 76 terceiros molares humanos extraídos	Pacientes e cirurgiões-dentistas doadores/colaboradores assinaram termo de doação de material biológico (conforme Anexos B e C)

Quadro 1- Material utilizado (continuação).

MATERIAL	INFORMAÇÕES
Água destilada	5 litros (Byofórmula, São José dos Campos, SP, Brasil)
Solução de timol a 0,05%	5 litros (Byofórmula, São José dos Campos, SP, Brasil)
Solução de formalina a 10%	5 litros (Byofórmula, São José dos Campos, SP, Brasil)
Solução de hipoclorito de sódio a 1%	5 litros (Byofórmula, São José dos Campos, SP, Brasil)
Recipiente de vidro com tampa rosqueável	9 unidades, 590ml de volume (CIV Companhia Industrial de Vidros, Recife, PE, Brasil)
Caixa de isopor	600 X 400 X 300 mm
Régua endodôntica milimetrada	JON, São Paulo, SP, Brasil
Disco de aço diamantado dupla-face	KG Sorensen, Barueri, SP, Brasil
Broca <i>carbide</i> esférica nº 4	KG Sorensen, Barueri, SP, Brasil
Micro-motor com peça de mão acoplada	INTRAmatic 181, Kavo, Joinville, SC, Brasil
Fita adesiva dupla-face	Adelbras, São Paulo, SP, Brasil
Molde de silicona para inclusão dos espécimes em resina acrílica	Confeccionado especificamente para o estudo (Clássico, São Paulo, SP, Brasil)

Quadro 1- Material utilizado (continuação).

MATERIAL	INFORMAÇÕES
Resina acrílica autopolimerizável	Clássico, Campo Limpo Paulista, SP, Brasil
Espátula nº 36	Duflex SS White, São Paulo, SP, Brasil
Espátula de inserção nº 1	Duflex SS White, São Paulo, SP, Brasil
Pinça clínica	Duflex SS White, São Paulo, SP, Brasil
Placas de vidro	250 X 200 mm
Pote de vidro para manipulação de resina acrílica	JON, São Paulo, SP, Brasil
Politriz circular	DP-10, Struers-Panambrá, São Paulo, SP, Brasil
Lixas de carbetto de silício de granulações sequenciais para politriz circular	Números 400, 600, 800, 1200 e 4000 (Norton Abrasivos Brasil, São Paulo, SP, Brasil)
Papel absorvente	Melitta, São Paulo, SP, Brasil
Microdurômetro	Microhardness Tester FM 700, Future Tech Corp., Tokyo, Japan

Quadro 1- Material utilizado (conclusão).

MATERIAL	INFORMAÇÕES
Autoclave	1,8 kgf / cm <sup>2</sup> ; 128-130 °C por 40 min (Vitale 12, Cristófoli, Campo Mourão, PR, Brasil).
Embalagens auto-adesivas para esterilização	150 mm X 250 mm (Medstéril, São Paulo, SP, Brasil).

## 4.2 Método experimental

### 4.2.1 Obtenção e seleção dos dentes

Para este estudo foram utilizados terceiros molares que apresentavam indicação de exodontia, cujos doadores assinaram termo de doação de material biológico (ANEXO B). Os profissionais cirurgiões-dentistas colaboradores na obtenção dos referidos dentes também preencheram e assinaram termo específico (ANEXO C).

Os dentes colhidos foram mantidos em água destilada (Byofórmula, São José dos Campos, SP, Brasil) a 4 °C até sua utilização. Foram excluídos terceiros molares cuja formação radicular não estivesse completa ou que não fossem hígidos.

#### 4.2.2 Preparo dos espécimes

Inicialmente, as raízes tiveram seus comprimentos - da junção amelocementária (JAC) ao ápice - medidos com auxílio de régua milimetrada para endodontia (JON, São Paulo, SP, Brasil), sendo demarcados os limites para que se realizassem secções ao nível médio e ao nível da JAC (separando-as das coroas), com uso de disco de aço diamantado dupla-face (KG Sorensen, Barueri, SP, Brasil) montado em micromotor de baixa rotação (INTRAMatic 181, Kavo, Joinville, SC, Brasil) e sob refrigeração a água, conforme as Figuras 2 e 3. Foi aproveitado o maior número possível de raízes de cada dente, desde que viáveis ao corte.

Desta forma foram obtidas 192 metades radiculares - a partir de 76 terceiros molares - com a face média em comum, duas a duas.

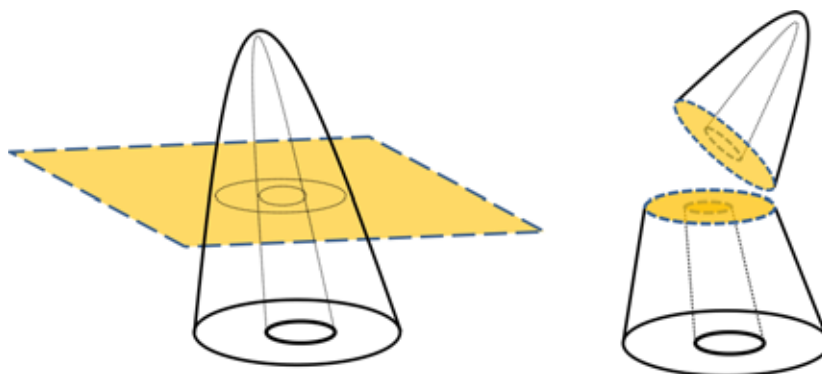


Figura 2- Desenho esquemático ilustrando o plano de secção para obtenção das duas metades de cada raiz, com a face média em comum.



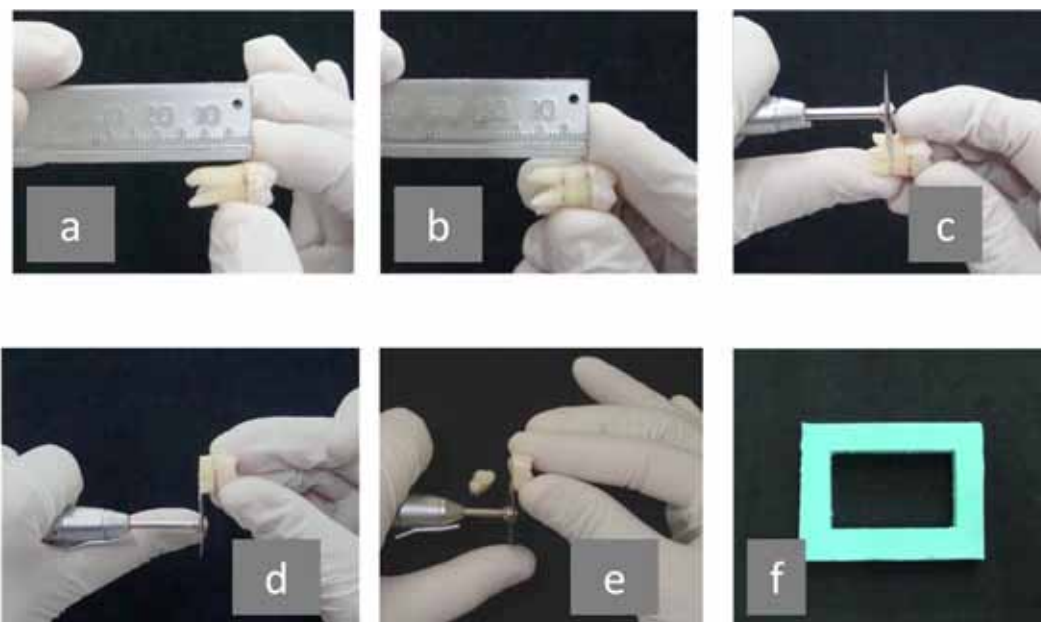


Figura 3- Procedimento de corte dos dentes (a, b, c, d, e) e molde de silicone utilizado para a inclusão das raízes em resina (f).

As 192 metades assim obtidas foram aleatoriamente divididas em grupos de 12, e incluídas em blocos de resina acrílica autopolimerizável (JET, Clássico, Campo Limpo Paulista, SP, Brasil), utilizando-se molde previamente confeccionado em silicone (Clássico, São Paulo, SP, Brasil) - Figura 3 - de modo que a face média das metades ficasse livre e voltada para cima após a desinclusão, como ilustrado na Figura 4.

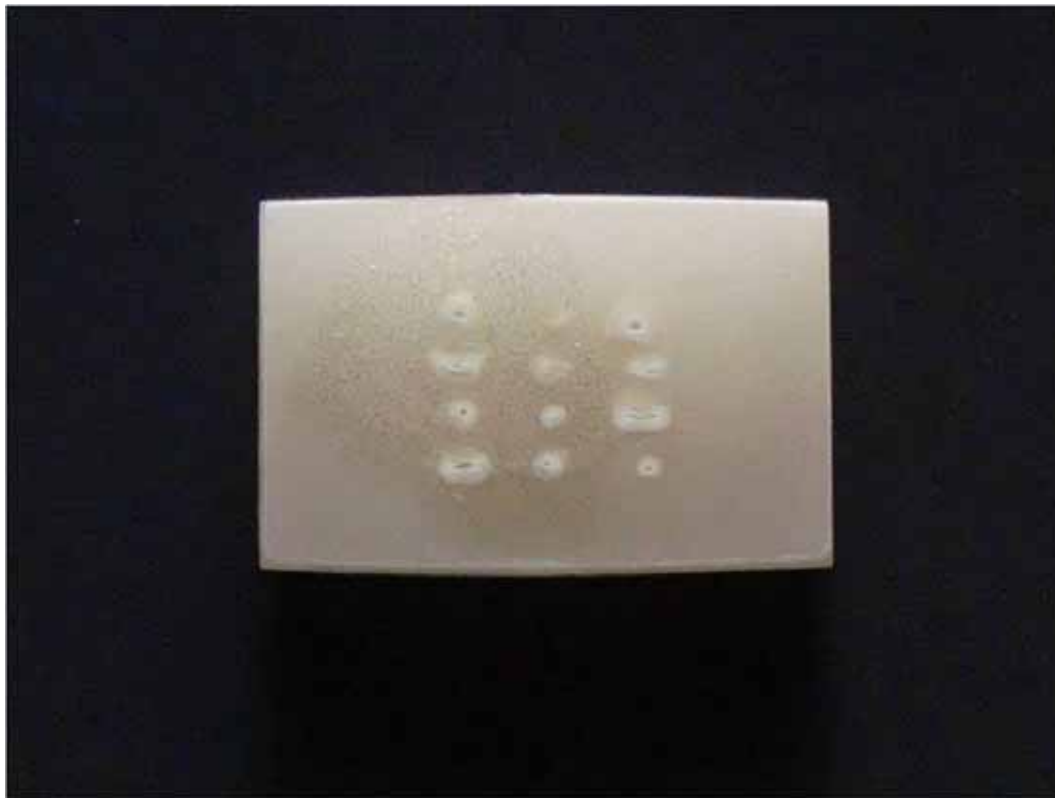


Figura 4- Raízes incluídas em resina acrílica, com a face média voltada para cima.

Para que a inclusão ocorresse sem o deslocamento das metades radiculares durante a inserção da resina acrílica no molde, foi utilizada fita adesiva dupla-face (Adelbras, São Paulo, SP, Brasil) que, colada ao centro de uma placa de vidro, permitia o correto posicionamento e a fixação dos espécimes de maneira adequada (Figura 5). A resina era então vertida no interior do molde contendo as metades radiculares em posição, e outra placa de vidro era posicionada sobre o conjunto (Figura 6).

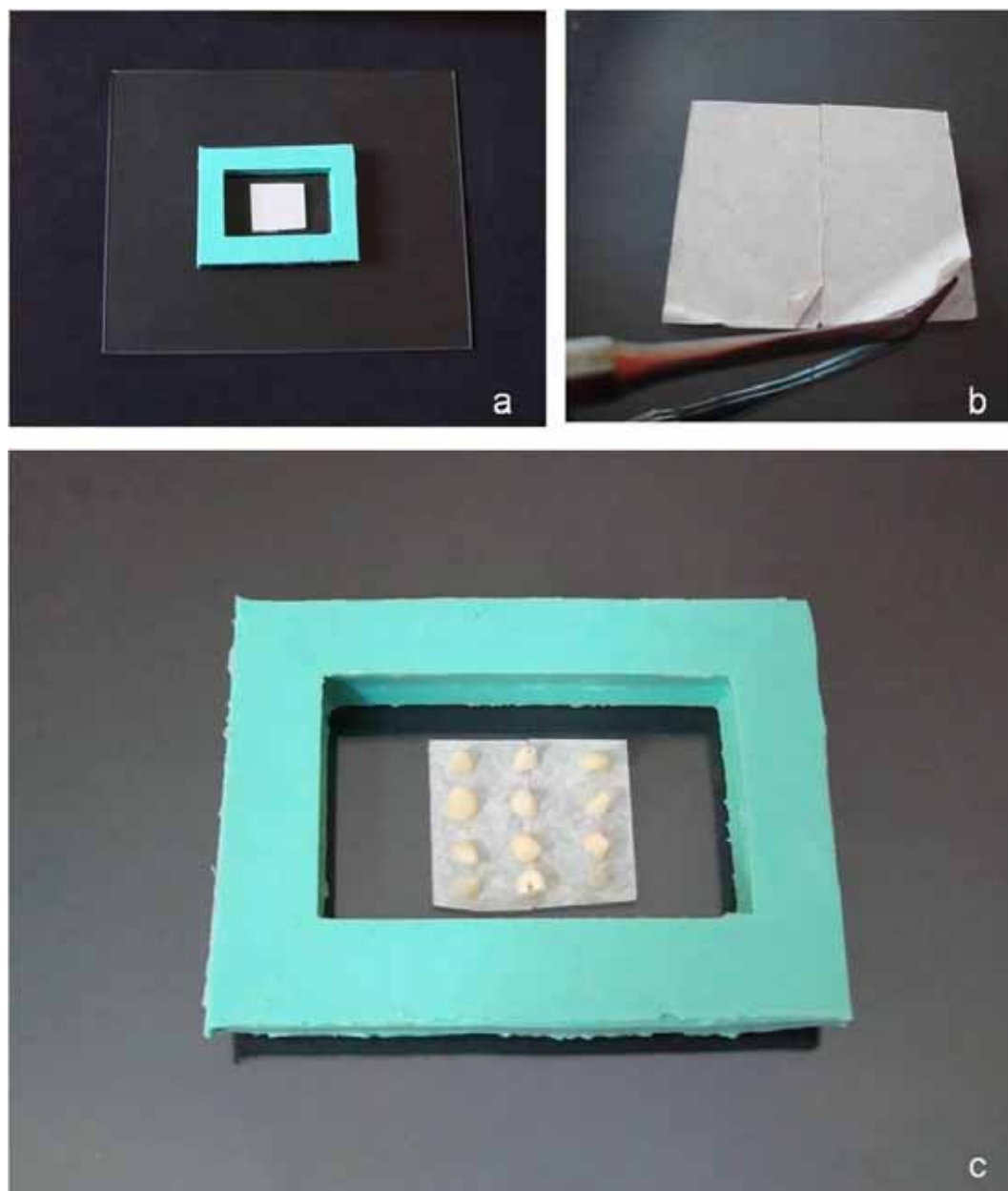


Figura 5- Fita adesiva colada ao centro da placa de vidro, com o molde de silicona em posição (a), detalhe da remoção da face externa da fita com auxílio de uma espátula de inserção nº 1 (b), raízes devidamente posicionadas (c).

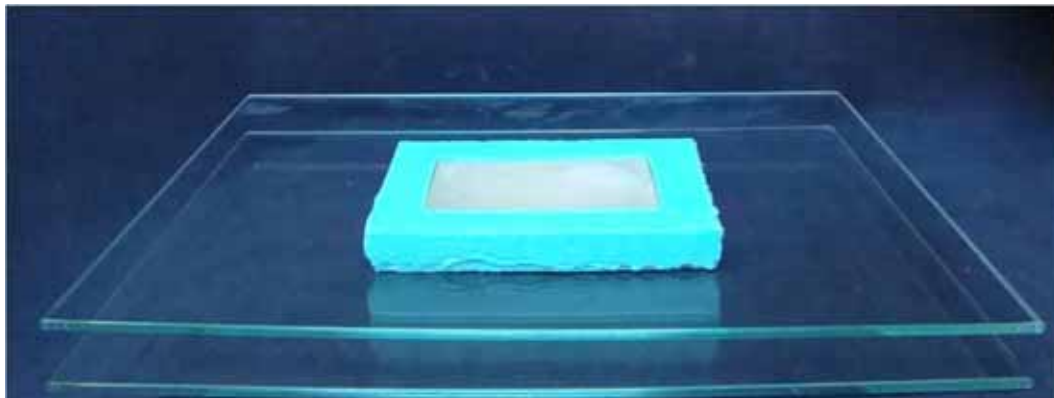


Figura 6- Segunda placa de vidro em posição, após a inserção da resina acrílica no conjunto.

Ao início da reação exotérmica de polimerização da resina, os blocos eram imersos em água destilada à temperatura ambiente, visando a evitar possíveis danos aos espécimes por ação do calor liberado.

Concluída a polimerização final, os blocos de resina foram identificados por números sequenciais, de 01 a 16, gravados em suas faces laterais com broca *carbide* esférica em baixa rotação.

Finalizada a etapa de inclusão em resina, os blocos tiveram a superfície de interesse polida em politriz circular (DP-10, Struers-Panambra, São Paulo, SP, Brasil) – Figura 8 - por lixas de carbetto de silício em uma seqüência da granulação mais grossa para a mais fina (Norton Abrasivos Brasil, São Paulo, SP, Brasil). O polimento foi realizado utilizando-se a lixa de granulação 400 por 40 s, seguida pelas lixas 600 e 800 por 60 s cada, finalizando-se com as lixas 1200 e 4000 por 90 s cada. Os blocos foram lavados com água destilada e secos com papel absorvente (Mellita, São Paulo, SP, Brasil).

#### 4.2.3 Padronização para as leituras de microdureza

A fim de permitir comparações entre as medidas de microdureza dos mesmos espécimes em diferentes momentos, houve a necessidade de se criar uma padronização de localização e posicionamento dentro dos respectivos blocos de resina.

Assim, cada bloco teve um de seus ângulos demarcados para referência de posição, e aos espécimes foi atribuída uma ordem topográfica a ser seguida nas leituras, como ilustrado na Figura 7.

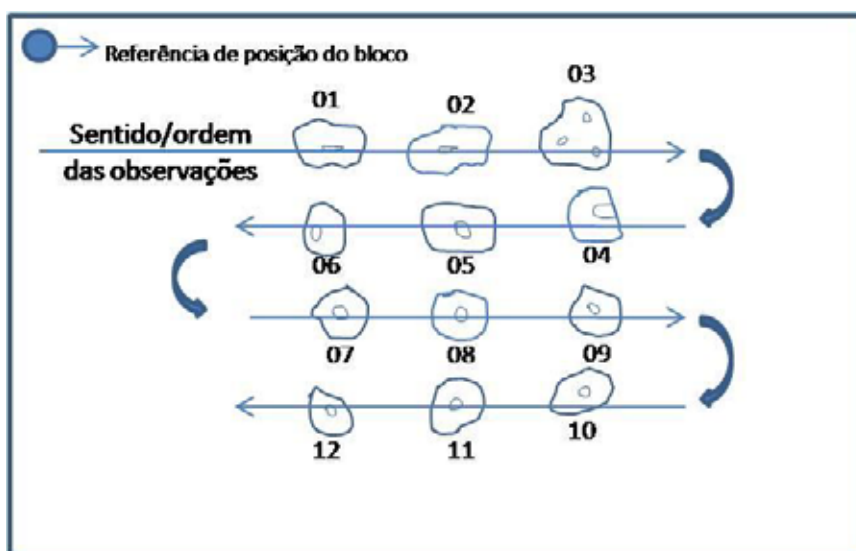


Figura 7- Esquema da padronização para observações de microdureza.

Foram então realizadas as medidas da microdureza inicial ( $Md_1$ ). Para tanto os blocos foram levados ao microdurômetro (Microhardness Tester FM 700, Future Tech Corp., Tokyo, Japan) – Figura 9 – sendo obtidos valores de microdureza na unidade *Vickers Hardness Number* (VHN).

Duas indentações foram efetuadas para cada espécime a 500  $\mu\text{m}$  da luz do canal radicular (Figura 10), utilizando-se carga

perpendicular de 50 g por 10 s. Cada indentação teve as diagonais medidas por três vezes, obtendo-se um valor médio das três. Considerou-se a média dos valores de microdureza das duas indentações para cada espécime.



Figura 8- Politriz circular DP-10 do Departamento de Odontologia Restauradora da FOSJC-UNESP.

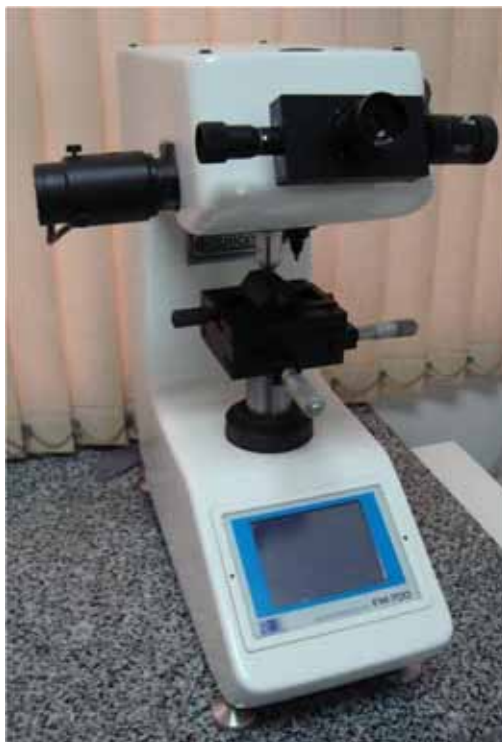


Figura 9- Microdurômetro Microhardness Tester FM 700 do Departamento de Odontologia Restauradora da FOSJC-UNESP.

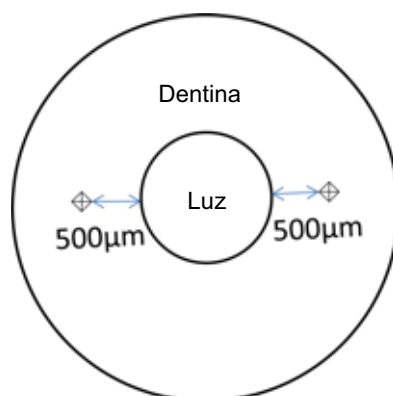


Figura 10- Desenho esquemático das indentações a 500 µm da luz do canal.

Em seguida os 16 blocos foram aleatoriamente divididos entre as diferentes soluções e períodos de armazenamento aos quais seriam submetidos, bem como os métodos de esterilização que seriam utilizados, de acordo com o esquema da Figura 11.

<b>BLOCO 05</b> H <sub>2</sub> O destilada 7 dias Autoclave	<b>BLOCO 09</b> H <sub>2</sub> O destilada 28 dias Autoclave	<b>BLOCO 08</b> H <sub>2</sub> O destilada 7 dias Radiação Gama	<b>BLOCO 11</b> H <sub>2</sub> O destilada 28 dias Radiação Gama
<b>BLOCO 07</b> Timol 0,05% 7 dias Autoclave	<b>BLOCO 16</b> Timol 0,05% 28 dias Autoclave	<b>BLOCO 03</b> Timol 0,05% 7 dias Radiação Gama	<b>BLOCO 10</b> Timol 0,05% 28 dias Radiação Gama
<b>BLOCO 06</b> Formalina 10% 7 dias Autoclave	<b>BLOCO 12</b> Formalina 10% 28 dias Autoclave	<b>BLOCO 02</b> Formalina 10% 7 dias Radiação Gama	<b>BLOCO 15</b> Formalina 10% 28 dias Radiação Gama
<b>BLOCO 04</b> NaOCl 1% 7 dias Autoclave	<b>BLOCO 14</b> NaOCl 1% 28 dias Autoclave	<b>BLOCO 01</b> NaOCl 1% 7 dias Radiação Gama	<b>BLOCO 13</b> NaOCl 1% 28 dias Radiação Gama

Figura 11- Disposição/destinação dos 16 blocos após sorteio.

Uma vez que a proposta desta dissertação envolveu a análise da atuação de dois fatores experimentais (armazenamento e esterilização) tanto isolada quanto associadamente, os grupos e subgrupos foram atribuídos de acordo com cada análise, a partir dos 16 blocos de resina contendo 12 metades radiculares cada.

Todas as análises envolveram a comparação de médias de microdureza dentre os mesmos espécimes, em momentos distintos.



#### 4.2.4 Estudo do fator armazenamento

Para esta análise, foram considerados os seguintes grupos experimentais:

- a) grupo 1 (G1): Água destilada (Byofórmula, São José dos Campos, SP, Brasil) (n=48);
- b) grupo 2 (G2): Solução de timol a 0,05% (Byofórmula, São José dos Campos, SP, Brasil) (n=48);
- c) grupo 3 (G3): Solução de formalina a 10% (Byofórmula, São José dos Campos, SP, Brasil) (n=48);
- d) grupo 4 (G4): Solução de hipoclorito de sódio a 1% (Byofórmula, São José dos Campos, SP, Brasil) (n=48).

Cada grupo foi subdividido em:

- a) subgrupo 1: período de 7 dias de armazenamento (n=24; 2 blocos);
- b) subgrupo 2: período de 28 dias de armazenamento (n=24; 2 blocos).

Assim, os blocos foram introduzidos em frascos de vidro com tampa rosqueável contendo as soluções em estudo, de maneira que cada frasco contivesse 1 subgrupo (portanto 2 blocos de resina). Os 8 frascos de vidro utilizados (CIV Companhia Industrial de Vidros, Recife, PE, Brasil) apresentavam 590ml de volume e tampas coloridas de 4 cores diferentes, para facilitar a visualização de cada grupo. Foram

aconicionados ao abrigo da luz e do calor (em caixa de isopor), permanecendo desta forma até que se atingissem os períodos pré-determinados de armazenamento. Nos subgrupos armazenados por 28 dias, as soluções foram renovadas semanalmente.

Findos os períodos de armazenamento, novo polimento foi realizado (apenas com a lixa de granulação 4000, por 60 s, visando à remoção de possíveis resíduos das soluções) bem como nova lavagem em água destilada e secagem em papel absorvente.

As leituras de microdureza posteriores às iniciais foram realizadas em regiões próximas às primeiras, respeitando-se uma distância mínima de 100  $\mu\text{m}$  entre elas e a distância de 500  $\mu\text{m}$  em relação à luz dos canais.

A coleta dos valores de microdureza deu-se da mesma maneira que inicialmente, seguindo a ordem topográfica já mencionada, sendo obtidos valores a partir de duas indentações para cada espécime, considerada a média entre os dois (microdureza pós-armazenamento =  $Md_2$ ).

#### 4.2.5 Estudo do fator esterilização

Esta parte do trabalho propôs-se a analisar e comparar os efeitos dos dois métodos de esterilização sobre a microdureza dentinária radicular. Como o objetivo aqui foi estudar a influência exercida apenas pela esterilização, foram levados em consideração somente os blocos armazenados em água destilada, considerada inócua para a variável microdureza. Portanto, a amostra foi reduzida nesta etapa a 48 metades radiculares (blocos 05, 08, 09 e 11, conforme já ilustrado na Figura 11).

Desta forma, foram considerados os seguintes grupos experimentais:

- a) grupo A: esterilização em autoclave (blocos 05 e 09; n= 24);
- b) grupo B: esterilização por radiação gama (blocos 08 e 11; n= 24).

Cada grupo foi subdividido em:

- a) subgrupo a: armazenados em água destilada por 7 dias (n= 12);
- b) subgrupo b: armazenados em água destilada por 28 dias (n= 12).

#### 4.2.6 Associação dos fatores armazenamento/esterilização

Nesta etapa foi estendida a análise explicitada na seção anterior para os grupos das outras soluções de armazenamento (no mesmo formato descrito acima), e, em seguida, outra análise foi conduzida considerando-se os mesmos grupos da avaliação do fator armazenamento (seção 4.2.4), entretanto subdividindo-se cada um em 4 subgrupos:

- a) subgrupo 1: período de 7 dias de armazenamento, esterilização em autoclave (n=12);

- b) subgrupo 2: período de 7 dias de armazenamento, esterilização por radiação gama (n=12);
- c) subgrupo 3: período de 28 dias de armazenamento, esterilização em autoclave (n=12);
- d) subgrupo 4: período de 28 dias de armazenamento, esterilização por radiação gama (n=12).

Para os processos de esterilização, os blocos foram acondicionados em embalagens próprias, auto-adesivas, de dimensões 150 mm X 250 mm (Medstéril, São Paulo, SP, Brasil).

A autoclavagem foi realizada num ciclo sob pressão de 1,8 kgf/cm<sup>2</sup> e temperatura entre 128 e 130 °C por 40 min sendo os blocos retirados antes do processo de secagem, ainda úmidos (Autoclave Vitale 12, Cristófoli, Campo Mourão, PR, Brasil).

Já a esterilização por radiação gama foi realizada pela empresa CBE Embrarad (Cotia, SP, Brasil), tendo sido os blocos de resina acondicionados da mesma maneira. Foi utilizada dose de 25 kGy (conforme certifica o ANEXO D).

Após os processos de esterilização, tomaram-se os mesmos procedimentos de polimento, lavagem e secagem realizados após o armazenamento, bem como os parâmetros para a realização das indentações. Assim foram obtidos os valores de microdureza pós-esterilização (Md<sub>3</sub>).

### 4.3 Delineamento estatístico

Os 576 dados obtidos (192 metades radiculares X 3 momentos) foram analisados de acordo com a metodologia descrita nesta seção.

Inicialmente estudou-se o comportamento da distribuição amostral, e para isso os dados preliminares da microdureza inicial de todos os espécimes foram submetidos a teste de normalidade (Kolmogorov-Smirnov), para se assegurar de que se tratava de uma amostra normalmente distribuída (Figura 12).

Após a obtenção de todos os dados experimentais, a análise estatística foi dividida nas seguintes fases:

- a) análise da influência exercida pelo armazenamento:
  - interação entre soluções e períodos de armazenamento;
- b) análise da influência exercida pela esterilização;
- c) análise da influência exercida pela associação armazenamento/esterilização:
  - interação entre soluções, períodos de armazenamento e métodos de esterilização.

#### 4.3.1 Análise da influência exercida pelo armazenamento

Esta análise objetivou verificar a ação de cada solução de armazenamento sobre a microdureza dos espécimes. Inicialmente, a variável em estudo foi a microdureza, uma variável quantitativa contínua.

Foi utilizado o teste  $t$  de Student para amostras dependentes, utilizando-se os valores absolutos de  $Md_1$  e  $Md_2$ . Analisaram-se separadamente as soluções nos dois tempos de armazenamento (sub-análise 1).

Determinada a ação isolada de cada solução sobre a microdureza, passou-se a uma nova etapa, visando ao estabelecimento da possível interação existente entre solução e período de armazenamento, bem como à comparação entre os diferentes grupos.

Nesta fase a variável estudada foi a diferença entre os dois valores de microdureza  $[(Md_1) - (Md_2)]$ . Foram conduzidos os testes de Análise de Variância (ANOVA) a 2 fatores (solução X período de armazenamento) e teste de Tukey, ambos com  $\alpha = 0,05$  (sub-análise 2).

Abaixo encontram-se resumidos os dados do delineamento estatístico desta etapa (Quadro 2).

Quadro 2- Resumo do delineamento estatístico para análise dos efeitos do armazenamento (continua).

Unidade experimental	<ul style="list-style-type: none"> <li>metades radiculares incluídas em resina acrílica.</li> </ul>
Variável em análise	<ul style="list-style-type: none"> <li>microdureza (VHN) – sub-análise 1;</li> <li>diferenças de microdureza – sub-análise 2.</li> </ul>

Quadro 2- Resumo do delineamento estatístico para análise dos efeitos do armazenamento (conclusão).

Tratamentos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 4 níveis: diferentes soluções de armazenamento (H<sub>2</sub>O destilada, Timol a 0,05%, Formalina a 10%, e NaOCl a 1%);</li> <li>• 2 sub-níveis: diferentes períodos de armazenamento (7 e 28 dias).</li> </ul>
Repetições/réplicas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 12 em cada sub-nível.</li> </ul>
H <sub>0</sub>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Não há diferenças entre os tratamentos.</li> </ul>
H <sub>1</sub>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Há diferenças entre os tratamentos.</li> </ul>
Testes estatísticos utilizados	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Teste <i>t</i> de Student para amostras dependentes (sub-análise 1);</li> <li>• Análise de Variância (ANOVA) a 2 fatores seguida de teste de Tukey (sub-análise 2).</li> </ul>
nível de significância ( $\alpha$ )	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 0,05.</li> </ul>

#### 4.3.2 Análise da influência exercida pela esterilização

Para a avaliação dos efeitos dos métodos de esterilização foi conduzido o teste *t* de Student comparando-se os valores de microdureza após o armazenamento em água destilada com os valores colhidos – dos mesmos espécimes- após os procedimentos de esterilização (Md<sub>2</sub> e Md<sub>3</sub>, respectivamente). Foram feitas análises separadas para cada período de armazenamento. O resumo deste delineamento encontra-se no Quadro 3.

Quadro 3- Resumo do delineamento estatístico para análise dos efeitos da esterilização.

Unidade experimental	<ul style="list-style-type: none"> <li>• metades radiculares incluídas em resina acrílica</li> </ul>
Variável em análise	<ul style="list-style-type: none"> <li>• microdureza (VHN)</li> </ul>
Tratamentos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2 níveis: diferentes métodos de esterilização (autoclave e radiação gama);</li> <li>• 2 sub-níveis: diferentes períodos de armazenamento prévio em água destilada (7 e 28 dias).</li> </ul>
Repetições/réplicas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 12 para cada sub-nível.</li> </ul>
$H_0$	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Não há diferenças entre os tratamentos.</li> </ul>
$H_1$	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Há diferenças entre os tratamentos.</li> </ul>
Testes estatísticos utilizados	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Teste <math>t</math> de Student.</li> </ul>
nível de significância ( $\alpha$ )	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 0,05.</li> </ul>

#### 4.3.3 Análise da associação armazenamento/esterilização

Nesta fase foram realizados os testes  $t$  de Student para verificar a ação dos métodos de esterilização sobre os grupos das demais soluções de armazenamento, em ambos os períodos. Para tanto foram levados em consideração os valores absolutos de  $Md_2$  e  $Md_3$  (sub-análise 1).

Em seguida, visando a avaliar a influência da associação dos fatores armazenamento e esterilização, procedeu-se a uma ANOVA a 3 fatores (solução de armazenamento X período de armazenamento X método de esterilização). A variável utilizada, à semelhança da análise de



interação das soluções e períodos de armazenamento, foi uma diferença entre valores de microdureza  $[(Md_1) - (Md_3)]$ . Na sequência foi aplicado o teste de Tukey, para localizar as possíveis diferenças entre os grupos (sub-análise 2).

Todos os testes foram realizados em um intervalo de confiança de 95% (ou seja, com significância para  $p < 0,05$ ), utilizando-se o *software* Statistica 8.0 (Stat Soft Inc., Tulsa, OK, EUA).

Os dados do delineamento estatístico desta etapa do trabalho encontram-se resumidos no Quadro 4.

Quadro 4- Resumo do delineamento estatístico para análise dos efeitos da associação armazenamento/esterilização (continua).

Unidade experimental	<ul style="list-style-type: none"> <li>metades radiculares incluídas em resina acrílica</li> </ul>
Variável em análise	<ul style="list-style-type: none"> <li>microdureza (VHN) (sub-análise 1);</li> <li>diferenças de microdureza (sub-análise 2).</li> </ul>
Tratamentos	<ul style="list-style-type: none"> <li>6 níveis: diferentes soluções de armazenamento (H<sub>2</sub>O destilada, Timol a 0,05%, Formalina a 10%, e NaOCl a 1%) e diferentes métodos de esterilização (autoclave e radiação gama);</li> <li>2 sub-níveis: diferentes períodos de armazenamento (7 e 28 dias).</li> </ul>
Repetições/réplicas	<ul style="list-style-type: none"> <li>12 para cada sub-nível.</li> </ul>
H <sub>0</sub>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Não há diferenças entre os tratamentos.</li> </ul>
H <sub>1</sub>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Há diferenças entre os tratamentos.</li> </ul>

Quadro 4- Resumo do delineamento estatístico para análise dos efeitos da associação armazenamento/esterilização (conclusão).

Testes estatísticos utilizados	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Teste <i>t</i> de Student (sub-análise 1);</li> <li>• ANOVA a 3 fatores seguida por teste de Tukey (sub-análise 2).</li> </ul>
nível de significância ( $\alpha$ )	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 0,05.</li> </ul>

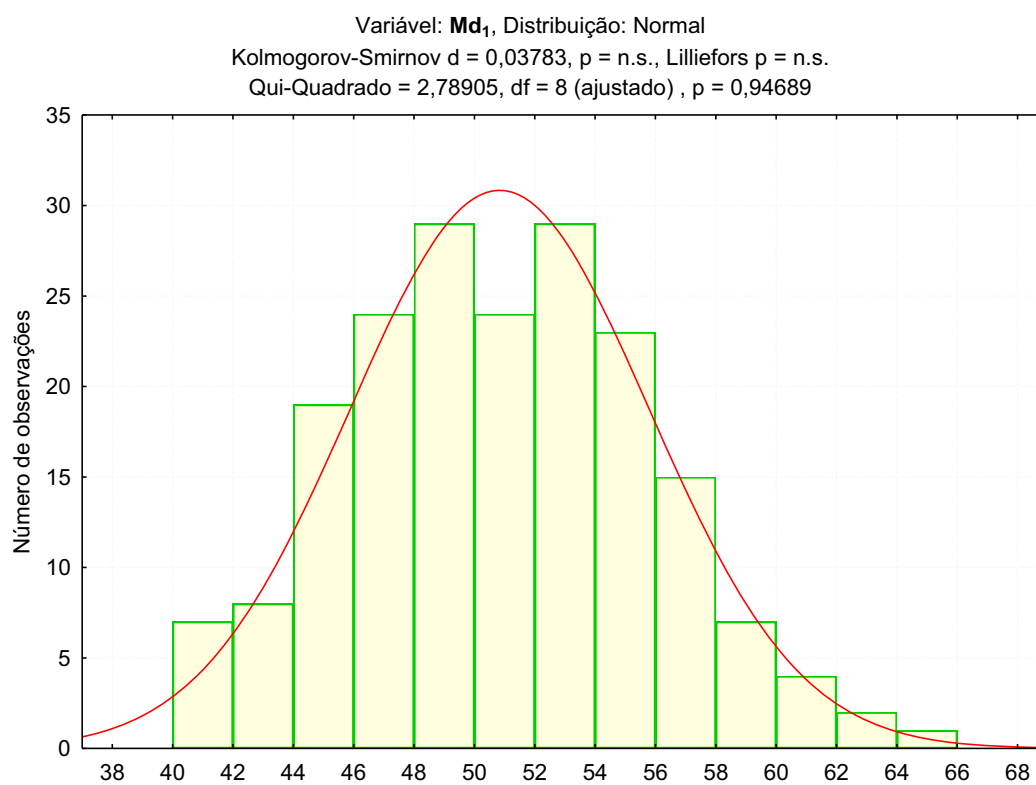


Figura 12 - Histograma obtido após teste de Kolmogorov-Smirnov, confirmando o caráter de normalidade para os valores de microdureza inicial ( $Md_1$ ) de todos os espécimes.

#### 4.3.4 Validação do método estatístico adotado

O embasamento teórico desta seção terciária foi retirado de Vieira<sup>81</sup> (2006).

Quando se utilizam métodos estatísticos comparando diversos grupos experimentais por meio de Análise de Variância, faz-se necessário o atendimento a algumas pressuposições. Segundo a referida autora, uma ANOVA só deveria ser aplicada se fossem satisfeitas as pressuposições de:

- a) independência;
- b) homocedasticidade;
- c) normalidade.

Por independência entende-se que os dados - e também os erros - encontrados devem ser variáveis aleatórias independentes. Em estudos nos quais as unidades experimentais são observadas em sequência, ou seja, na presença de correlação serial (como é o caso deste estudo), não seria razoável pressupor independência. Daí a necessidade de se analisar os resíduos (que são estimativas de erro). Tal análise é feita graficamente. Para que a pressuposição de independência seja satisfeita, os resíduos devem ficar dispersos em torno de zero, sem padrão definido.

A homocedasticidade refere-se à constância nas variâncias. Afinal devem ser esperadas diferenças nas médias entre os grupos (tratamentos), mas não em suas variâncias. Existem algumas regras empíricas para se constatar a homocedasticidade. Para alguns

autores, ela é considerada presente quando a maior variância não exceder a menor em mais do que três vezes. Porém existem testes específicos para se fazer esta análise, como os testes de Cochran, Hartley, Bartlett e Levene, que são conhecidos como testes de homogeneidade de variâncias.

Quanto à normalidade, entende-se que os dados (e consequentemente os erros) devam apresentar uma distribuição normal, o que pode ser verificado também por meio de gráficos.

Foram conduzidas todas essas análises, tendo sido empregado novamente o *software* Statistica 8.0 (Stat Soft Inc., Tulsa, OK, EUA).

## 5 RESULTADOS

Os valores médios de microdureza e respectivos valores de desvio-padrão encontrados nos diferentes grupos e momentos são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1- Valores médios de microdureza e desvio-padrão observados nos diferentes grupos e subgrupos de cada análise.

Grupo	Período (dias)	Microdureza (VHN) $\pm$ desvio-padrão			
		Md <sub>1</sub>	Md <sub>2</sub>	Md <sub>3</sub>	
				Autoclave	Radiação gama
G1	7	49,2 $\pm$ 5,2	48,2 $\pm$ 4,0	46,7 $\pm$ 5,8	49,5 $\pm$ 5,1
	28	51,0 $\pm$ 4,9	51,1 $\pm$ 5,6	46,3 $\pm$ 4,5	53,9 $\pm$ 5,1
G2	7	50,7 $\pm$ 5,0	46,6 $\pm$ 4,8	40,6 $\pm$ 5,9	47,8 $\pm$ 7,6
	28	51,6 $\pm$ 4,8	45,5 $\pm$ 3,3	42,5 $\pm$ 6,9	45,3 $\pm$ 6,1
G3	7	51,1 $\pm$ 6,0	45,8 $\pm$ 5,7	45,0 $\pm$ 4,2	47,0 $\pm$ 5,7
	28	51,9 $\pm$ 3,9	45,4 $\pm$ 4,6	46,0 $\pm$ 4,3	47,4 $\pm$ 5,1
G4	7	50,8 $\pm$ 5,1	21,7 $\pm$ 1,8	15,7 $\pm$ 2,2	20,8 $\pm$ 1,7
	28	50,0 $\pm$ 4,4	13,1 $\pm$ 2,7	20,8 $\pm$ 1,7	16,0 $\pm$ 4,0

G1: H<sub>2</sub>O / G2: timol / G3: formalina / G4: NaOCl ; VHN: *Vickers Hardness Number*.

Como mencionado anteriormente, os valores de  $Md_1$  de todos os espécimes foram submetidos ao teste de Kolmogorov-Smirnov para se averiguar a normalidade de sua distribuição. No referido teste, o valor  $d$  encontrado foi menor que o valor  $d$  crítico calculado para a amostra, tornando aceita a  $H_0$  – hipótese de nulidade (neste caso, a não existência de diferenças entre a distribuição amostral com relação à distribuição normal). Isto pode ser visualizado no gráfico tipo *Normal P-Plot* da Figura 13.

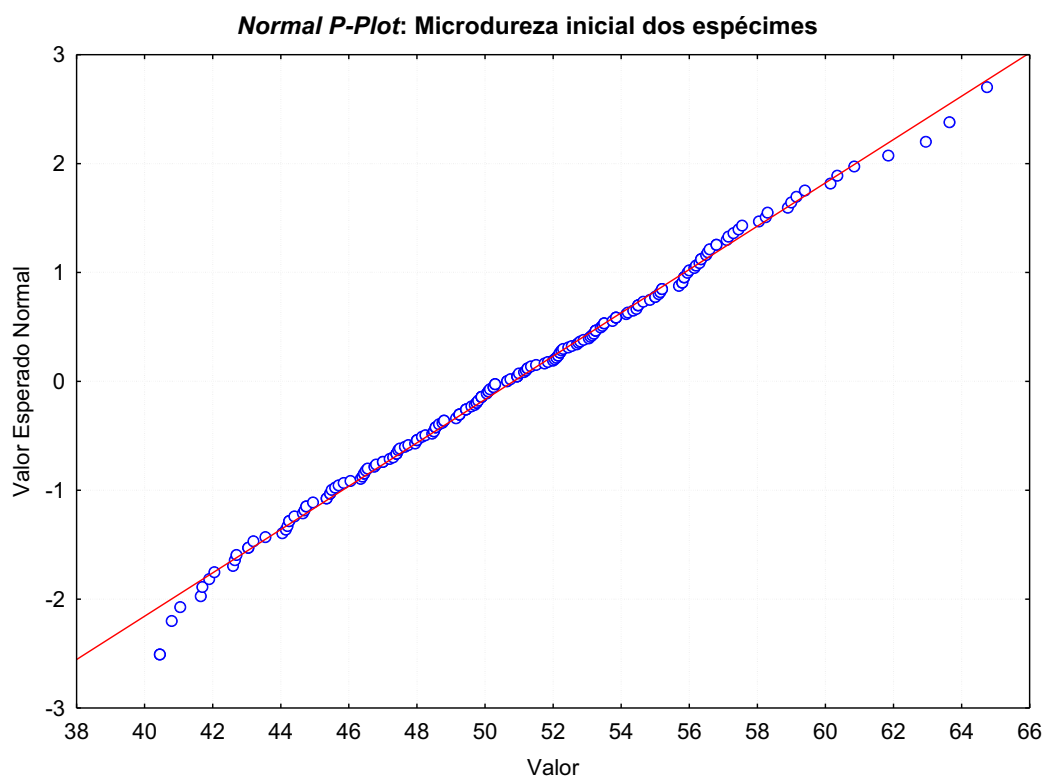


Figura 13- Gráfico tipo *P-Plot* da distribuição amostral em relação ao valor normal esperado.

### 5.1 Efeitos do armazenamento

Os testes *t* de Student para amostras dependentes foram realizados para todas as soluções e tempos de armazenamento, utilizando-se os pares das medidas obtidas de cada espécime ( $Md_1$  e  $Md_2$ ). O resultado deste teste encontra-se na Tabela 2.

Tabela 2- Teste *t* de Student após armazenamento; diferenças significantes para  $p < 0,05$ .

Grupo;subgrupo / Momento	Md média (VHN)	DP	n	( $Md_1 - Md_2$ )	t	Gl	p	
G1;a	I	49,2	5,2	24	0,995	1,241	23	0,226
	II	48,2	4,0					
G1;b	I	51,0	4,9	24	-0,070	-0,101	23	0,920
	II	51,1	5,6					
G2;a	I	50,6	4,0	24	4,066	2,971	23	0,006*
	II	46,6	4,8					
G2;b	I	51,6	4,8	24	6,137	6,654	23	0,000*
	II	45,5	3,3					
G3;a	I	51,1	6,08	24	5,235	3,757	23	0,001*
	II	45,8	5,7					
G3;b	I	51,9	3,95	24	6,470	5,339	23	0,000*
	II	45,4	4,66					
G4;a	I	50,8	5,1	24	29,145	29,219	23	0,000*
	II	21,7	1,8					
G4;b	I	50,0	4,4	24	36,886	33,461	23	0,000*
	II	13,1	2,7					

G1: H<sub>2</sub>O / G2: timol / G3: formalina / G4: NaOCl; a: 7 dias; b: 28 dias; I: inicial; II: após armazenamento; Md: microdureza; DP: desvio-padrão; \*: significância estatística.

Apenas os subgrupos da água destilada (G1) não ocasionaram diferenças significantes de microdureza. As demais soluções em ambos os períodos de armazenamento influenciaram negativamente a variável estudada (Figura 14).

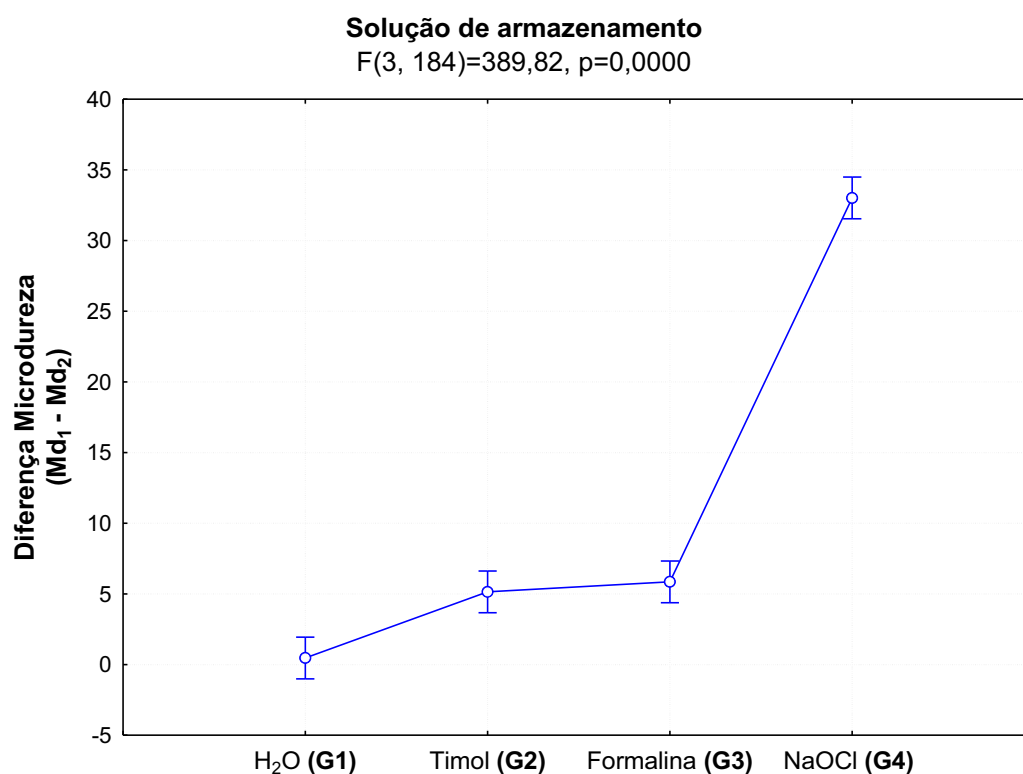


Figura 14- Gráfico dos grupos experimentais quanto ao armazenamento.

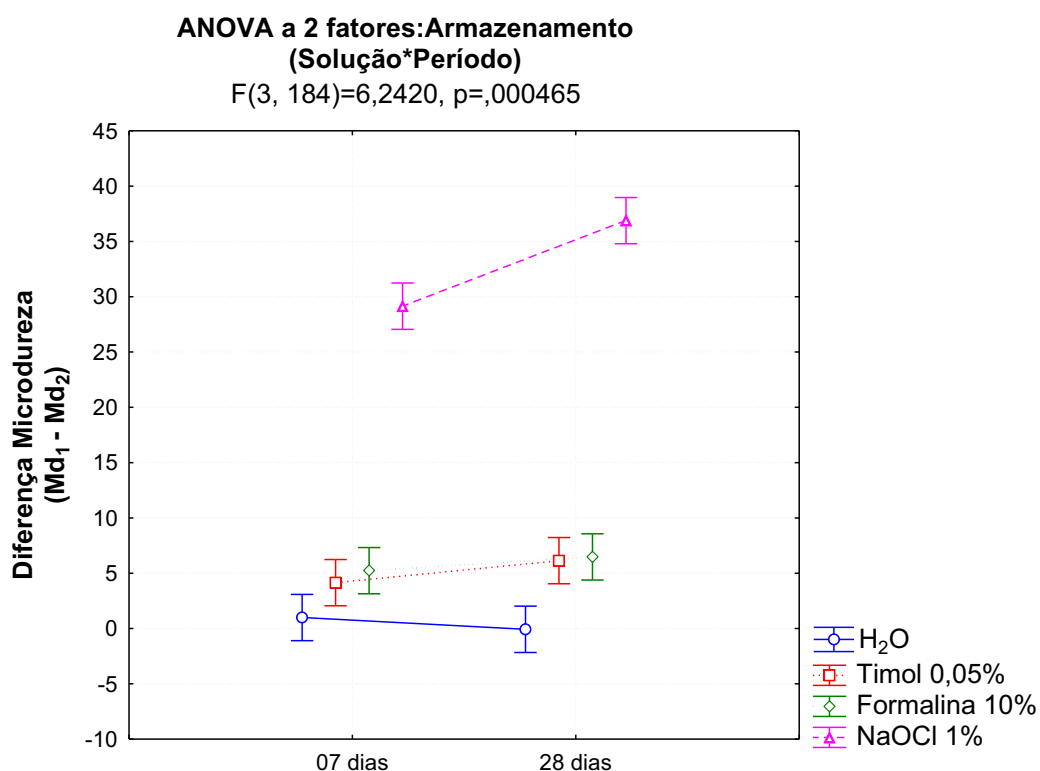
O teste ANOVA a 2 fatores (Tabela 3), para se estabelecer os efeitos das diferentes soluções, períodos de armazenamento e sua interação, revelou diferenças estatisticamente significantes para todos os fatores (solução:  $p=0,00000$ ; período:  $p=0,00000$ ; interação solução X período:  $p=0,00047$ ), originando o gráfico da Figura 15.



Tabela 3- ANOVA a 2 fatores após o armazenamento ( $\alpha=0,05$ ).

	SS	GI	MS	F	p
Soluções	31505,58	3	10501,86	389,8153	0,000000*
Períodos	293,41	1	293,41	10,8911	0,001160*
Soluções*Períodos	504,49	3	168,16	6,2420	0,000465*

\* Significância estatística

Figura 15- Gráfico da interação dos fatores solução e período de armazenamento, obtido a partir da diferença [(MD<sub>1</sub>) - (MD<sub>2</sub>)].

O teste de Tukey, aplicado neste momento, permitiu a identificação das diferenças através dos subgrupos, bem como a distribuição dos conjuntos homogêneos verificados na Tabela 4.

O subgrupo que menos causou alterações na microdureza dos espécimes (menor diferença Md<sub>1</sub>-Md<sub>2</sub>) foi o da água destilada por 28 dias, tendo o subgrupo do NaOCl a 1% por 28 dias causado as maiores alterações.

Tabela 4- Análise do armazenamento. Distribuição dos conjuntos homogêneos após teste de Tukey ( $\alpha=0,05$ ).

Grupo (n=24)	Período (dias)	Média (Md <sub>1</sub> -Md <sub>2</sub> )	Conjuntos homogêneos*
G1	28	-0,07083	B
G1	07	1,00000	B C
G2	07	4,15000	A B C
G3	07	5,23542	A C
G2	28	6,13750	A
G3	28	6,47083	A
G4	07	29,14583	D
G4	28	36,88333	E

\* Letras iguais denotam grupos homogêneos entre si; Md<sub>1</sub>: microdureza inicial; Md<sub>2</sub>: microdureza pós-armazenamento; G1: H<sub>2</sub>O / G2: timol / G3: formalina / G4: NaOCl.

## 5.2 Efeitos da esterilização

Como explicitado no capítulo anterior, para se analisar os efeitos da esterilização, como fator isolado, foi realizado teste *t* de Student com base nos valores Md<sub>3</sub> e Md<sub>2</sub> dos blocos submetidos ao armazenamento em água destilada.

Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa nos valores de microdureza antes e após a aplicação dos dois métodos de esterilização, (autoclave:  $p=0,144$ ; radiação gama:  $p=0,827$ ) – Tabela 5 - tornando aceita a hipótese de nulidade (segundo a qual não há diferença entre as médias antes e após a introdução deste fator experimental).

Entretanto, ao se separar a mesma análise entre os períodos de armazenamento distintos, observa-se que a esterilização por autoclave levou a alteração estatisticamente significativa nos valores de microdureza do bloco armazenado em água destilada por 28 dias. Já a radiação gama mostrou melhor resultado, não ocasionando diferenças significantes em nenhum dos períodos (Tabelas 6 e 7).

Tabela 5- Teste  $t$  de Student para o fator esterilização; diferenças significantes para  $p<0,05$ .

Grupo/ Momento		Md média (VHN)	DP	n	(Md <sub>2</sub> - Md <sub>3</sub> )	t	Gl	p
A	II	47,7	4,1	24	1,172	1,509	23	0,144
	III	46,5	5,1					
B	II	51,6	5,2	24	-0,095	-0,220	23	0,827
	III	51,7	5,4					

A: autoclave; B: radiação gama; II: após armazenamento; III: após esterilização; Md: microdureza; VHN: *Vickers Hardness Number*; DP: desvio-padrão; \*: significância estatística.

Tabela 6- Teste *t* de Student para o método de esterilização por autoclave em diferentes períodos de armazenamento em água destilada; diferenças significantes para  $p < 0,05$ .

Grupo/ subgrupo	n	(Md <sub>2</sub> – Md <sub>3</sub> )	t	Gl	p
A / a (bloco 05)	12	0,479167	0,350120	11	0,732861
A / b (bloco 09)	12	1,866667	2,481685	11	0,030482*

a: 7 dias; b: 28 dias; \*: significância estatística.

Tabela 7- Teste *t* de Student para o método de esterilização por radiação gama em diferentes períodos de armazenamento em água destilada; diferenças significantes para  $p < 0,05$ .

Grupo/ subgrupo	n	(Md <sub>2</sub> – Md <sub>3</sub> )	t	Gl	p
B / a (bloco08)	12	-0,325000	-0,493097	11	0,631640
B / b (bloco 11)	12	0,133333	0,227535	11	0,824181

a: 7 dias; b: 28 dias.

### 5.3 Efeitos da associação armazenamento/esterilização

Os resultados dos testes *t* para estudo da influência dos métodos de esterilização sobre a microdureza, nas demais soluções e em ambos os períodos de armazenamento, podem ser visualizados nas Tabelas 8 e 9 (autoclave e radiação gama, respectivamente).

Em seguida, para estudar o efeito de todos os fatores sobre a microdureza dos espécimes após as esterilizações, procedeu-se ao teste ANOVA a 3 fatores (solução de armazenamento, período de armazenamento e método de esterilização) - Figura 16 - sendo

encontradas diferenças estatisticamente significantes, como mostra a Tabela 11.

Tabela 8- Testes *t* de Student para o método de esterilização por autoclave; diferenças significantes para  $p < 0,05$ .

Grupo/ subgrupo	n	(Md <sub>2</sub> – Md <sub>3</sub> )	t	Gl	p
G1/1	12	0,479167	0,350120	11	0,732861
G1/3	12	1,866667	2,481685	11	0,030482*
G2/1	12	6,962500	2,701334	11	0,020608*
G2/3	12	3,404167	1,681420	11	0,120821
G3/1	12	0,295833	0,243421	11	0,812159
G3/3	12	-0,033333	-0,021424	11	0,983291
G4/1	12	5,812500	9,394012	11	0,000001*
G4/3	12	-7,94167	-8,67881	11	0,000003*

G1: H<sub>2</sub>O / G2: timol / G3: formalina / G4: NaOCl Subgrupo 1: 7 dias; subgrupo 3: 28 dias; \* significância estatística.

Tabela 9- Testes *t* de Student para o método de esterilização por radiação gama; diferenças significantes para  $p < 0,05$ .

Grupo/ Período (dias)	n	(Md <sub>2</sub> – Md <sub>3</sub> )	t	Gl	p
G1/2	12	-0,325000	-0,493097	11	0,631640
G1/4	12	0,133333	0,227535	11	0,824181
G2/2	12	-2,19167	-1,46331	11	0,171364
G2/4	12	-0,241667	-0,180377	11	0,860137
G3/2	12	-0,558333	-0,620561	11	0,547530
G3/4	12	-2,61250	-2,44540	11	0,032510*
G4/2	12	-2,61250	-2,44540	11	0,032510*
G4/4	12	1,158333	1,499819	11	0,161804

G1: H<sub>2</sub>O / G2: timol / G3: formalina / G4: NaOCl Subgrupo 2: 7 dias; subgrupo 4: 28 dias; \* significância estatística.

Tabela 10- Teste ANOVA a 3 fatores realizado após as esterilizações ( $\alpha=0,05$ ).

FATORES	SS	GI	MS	F	p
Solução	28545,04	3	9515,01	297,9442	0,000000*
Período	0,00	1	0,00	0,0001	0,990843
Esterilização	130,68	1	130,68	4,0920	0,044600*
Solução*Período	29,97	3	9,99	0,3128	0,816084
Solução*Esterilização	414,64	3	138,21	4,3279	0,005685*
Período*Esterilização	39,24	1	39,24	1,2288	0,269163
Solução*Período*Esterilização	262,65	3	87,55	2,7415	0,044772*

\* Significância estatística

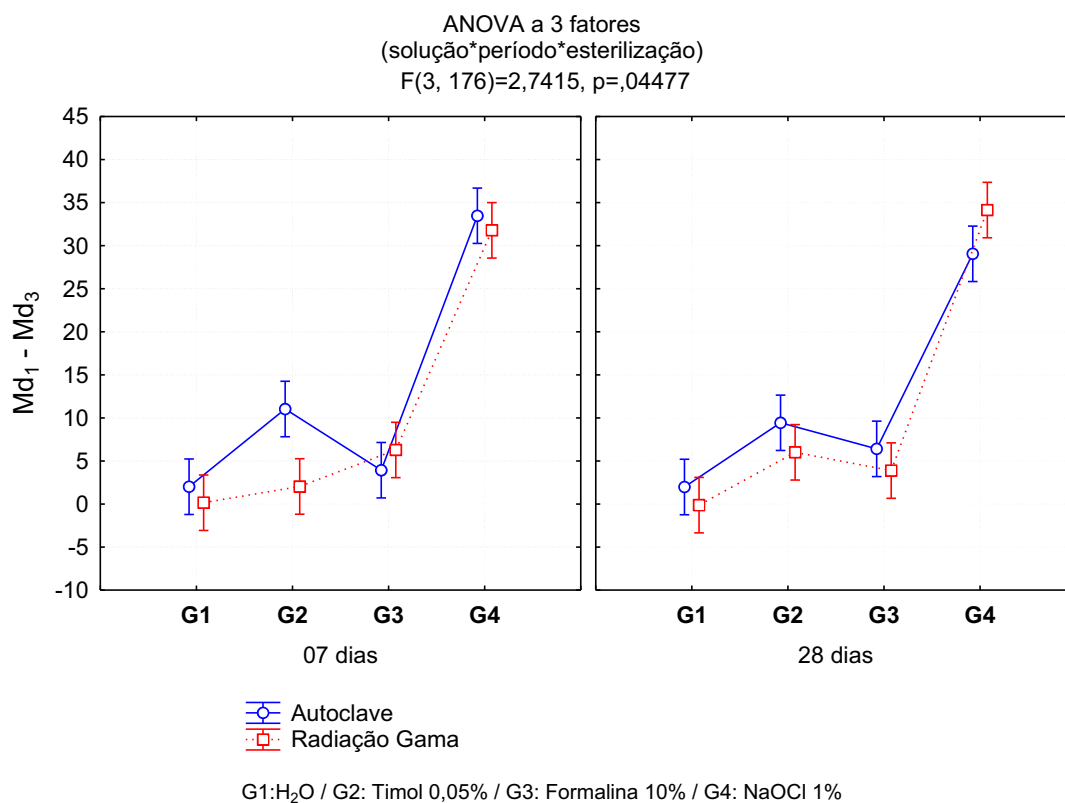


Figura 16- Gráfico da interação dos 3 fatores após a esterilização.

O teste de Tukey foi realizado em seguida para que fossem localizadas as diferenças entre os grupos experimentais. Após o teste verificou-se a formação dos conjuntos homogêneos, que podem ser visualizados na Tabela 11.

Tabela 11- Resultado do teste de Tukey após ANOVA a 3 fatores ( $\alpha=0,05$ ).

Solução	Período	Esterilização	Média (Md <sub>1</sub> -Md <sub>3</sub> )	Conjuntos homogêneos*		
H2O	28 dias	Radiação	-0,12500	A		
H2O	07 dias	Radiação	0,15417	A		
H2O	28 dias	Autoclave	1,98333	A	B	C
H2O	07 dias	Autoclave	2,01250	A	B	C
Timol 0,05%	07 dias	Radiação	2,03333	A	B	C
Formalina 10%	28 dias	Radiação	3,88750	A	B	C
Formalina 10%	07 dias	Autoclave	3,93333	A	B	C
Timol 0,05%	28 dias	Radiação	6,00417	A	B	C
Formalina 10%	07 dias	Radiação	6,27500	A	B	C
Formalina 10%	28 dias	Autoclave	6,40833	A	B	C
Timol 0,05%	28 dias	Autoclave	9,43333		B	C
Timol 0,05%	07 dias	Autoclave	11,03750			C
NaOCl 1%	28 dias	Autoclave	29,05833			D
NaOCl 1%	07 dias	Radiação	31,78333			D
NaOCl 1%	07 dias	Autoclave	33,47917			D
NaOCl 1%	28 dias	Radiação	34,13333			D

\* A presença de letras iguais denota grupos homogêneos entre si; Md<sub>1</sub>: microdureza inicial; Md<sub>3</sub>: microdureza pós-esterilização.

#### 5.4 Validação do método estatístico adotado

Para validação do método estatístico adotado, foram cheçadas todas as análises realizadas para se verificar a independência, homocedasticidade e normalidade.



### 5.4.1 Independência

Para esta análise foram estudados os resíduos encontrados. A análise dos resíduos para as duas ANOVA conduzidas no estudo (para determinação dos efeitos do armazenamento segundo os períodos, e para determinação dos efeitos associados das soluções, períodos de armazenamento e métodos de esterilização) revelou uma dispersão ao redor de zero, sem padrão definido, sugerindo independência, conforme pode ser visto nas Figuras 17 e 18, respectivamente.

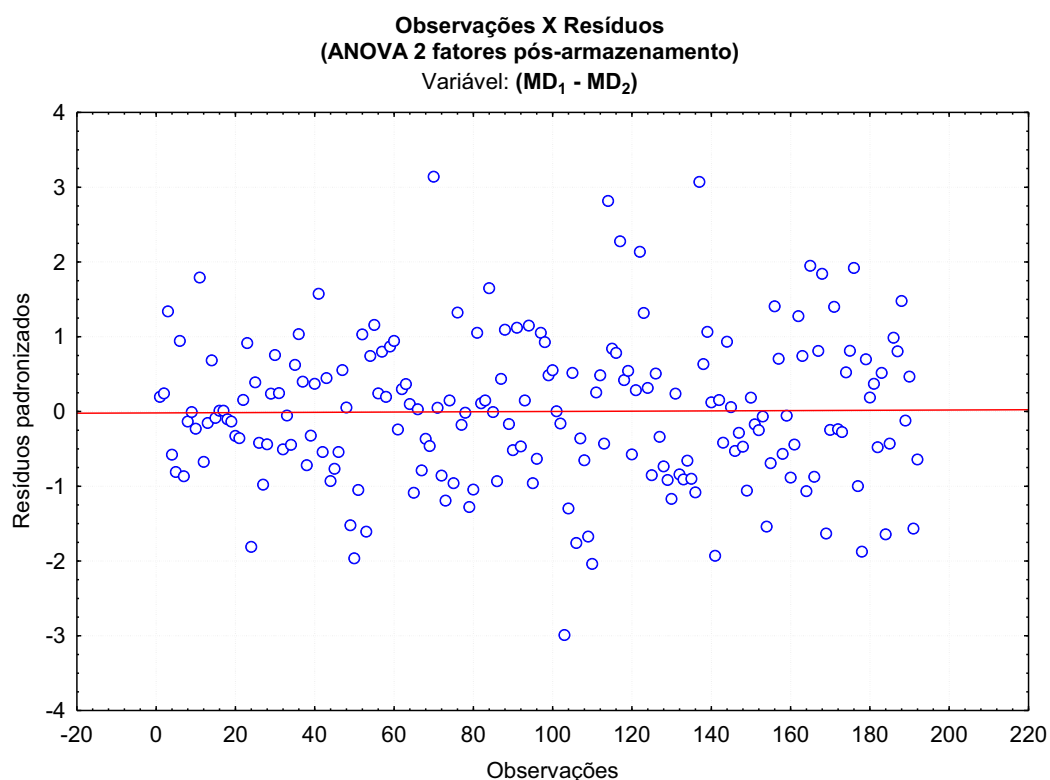


Figura 17- Gráfico de dispersão dos resíduos na ANOVA a 2 fatores realizada após o armazenamento.

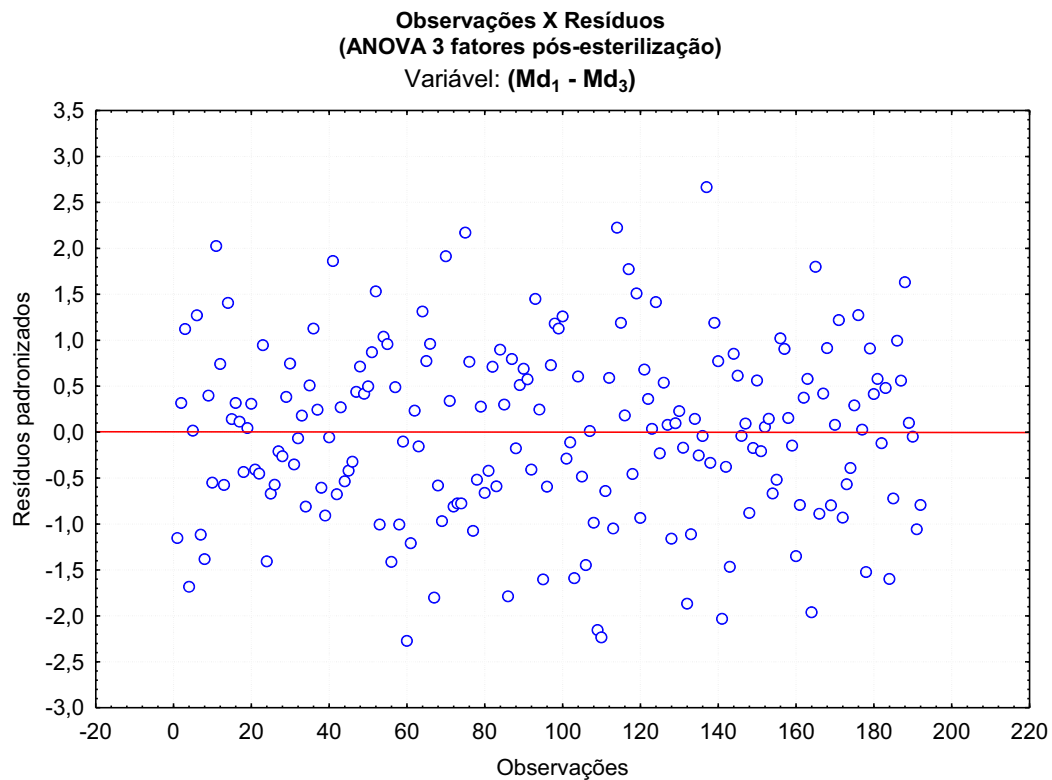


Figura 18- Gráfico de dispersão dos resíduos na ANOVA a 3 fatores realizada após a esterilização.

#### 5.4.2 Homocedasticidade

Para esta análise foram utilizados os testes de Levene e Hartley-Cochran-Bartlett, respectivamente para as ANOVA a 2 e 3 fatores conduzidas neste trabalho, tendo os resultados revelado a homogeneidade das variâncias, como mostram as Tabelas 12 e 13.

Tabela 12- Resultado do teste de Levene para ANOVA a 2 fatores pós-armazenamento ( $\alpha = 0,05$ ).

	MS	MS	F	p
(Md <sub>1</sub> – Md <sub>2</sub> )	17,35424	9,979832	1,738931	0,102367

Tabela 13- Resultado do teste de Hartley-Cochran-Bartlett para ANOVA a 3 fatores pós-esterilização ( $\alpha = 0,05$ ).

	Hartley	Cochran	Bartlett	GI	p
(Md <sub>1</sub> – Md <sub>3</sub> )	7,313701	0,138589	20,85228	15	0,141616

#### 5.4.3 Distribuição normal

Novamente os resíduos foram analisados, desta vez para verificar se apresentavam uma distribuição normal. Foram construídos gráficos tipo *normal p-plot*, revelando que os resíduos apresentaram distribuição normal em ambos os casos (ANOVA a 2 e 3 fatores). Os referidos gráficos podem ser vistos nas Figuras 19 e 20.

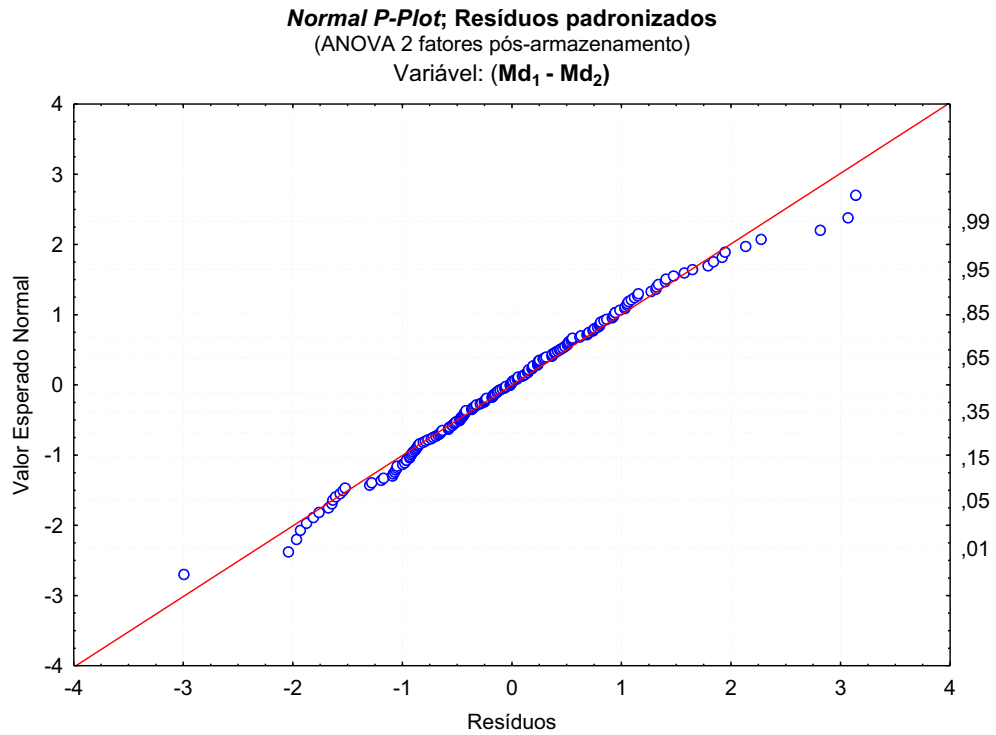


Figura 19- Gráfico mostrando distribuição normal dos resíduos para ANOVA a 2 fatores pós-armazenamento.

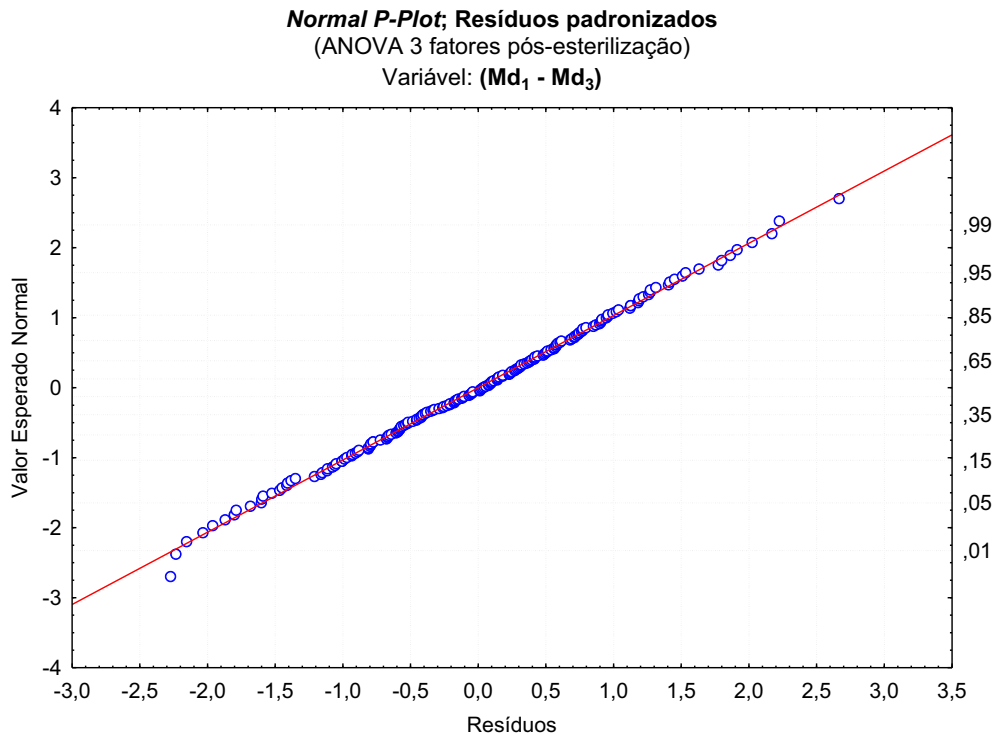


Figura 20- Gráfico mostrando distribuição normal dos resíduos da ANOVA 3 fatores pós-esterilização.

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 Literatura e metodologia

Dentes extraídos ainda são utilizados na maioria dos estudos *in vitro* em pesquisa odontológica, seja em endodontia (Bodrumlu et al.<sup>9</sup>, 2007; Matherne et al.<sup>46</sup>, 2008; Solano et al.<sup>74</sup>, 2005), prótese (Boschian Pest et al.<sup>10</sup>, 2002; Kalkan et al.<sup>36</sup>, 2006; Karapanou et al.<sup>37</sup>, 1996; Wrbas et al.<sup>86</sup>, 2007), dentística (Ghersel et al.<sup>30</sup>, 2001; Miranda et al.<sup>49</sup>, 2005; Muench et al.<sup>52</sup>, 2000), e até ortodontia (Manfrin et al.<sup>43</sup>, 2009).

Ainda que existam recomendações de órgãos de saúde como o CDC norte-americano (Kohn et al.<sup>39</sup>, 2003), e especificações técnicas como a da ISO, grande parte dos trabalhos científicos publicados não cita o meio de desinfecção ou esterilização utilizado (exceção feita aos estudos de Ghersel et al.<sup>30</sup>, 2001, e Habelitz et al.<sup>33</sup>, 2002), que utilizaram a autoclave e a radiação gama, respectivamente). No mais das vezes, não são citados sequer os meios de armazenamento empregados previamente aos experimentos.

Talvez muitos pesquisadores, em dúvida sobre estarem criando ou não mais uma variável para seus estudos, optem por não realizar os procedimentos recomendados, o que, do ponto de vista ético, pode ser considerada atitude reprovável.

A microdureza das estruturas dentais tem sido estudada já há muito dentro da pesquisa odontológica. Consiste em uma propriedade inerente à constituição física do dente, que, dentre as vantagens, possibilita estudos em modelos experimentais utilizando ensaios não-destrutivos, nos quais podem ser feitas observações antes e depois da aplicação de tratamentos experimentais.

Além disso, já foram estabelecidas correlações importantes entre a microdureza e outras propriedades dentais, como a densidade tubular (Pashley et al.<sup>59</sup>, 1985), grau de mineralização (Panighi, G'Sell<sup>56</sup>, 1992) e a resistência adesiva (Panighi, G'Sell<sup>57</sup>, 1993).

Sob esta ótica, a escolha da microdureza como variável a ser observada neste estudo visou ao afastamento ou minimização dos possíveis efeitos de condições individuais dos espécimes, já que os valores obtidos foram sempre associados a um mesmo espécime, apenas em momentos diferentes. Soma-se a isso o fato da existência das correlações supracitadas entre microdureza e outras propriedades dos dentes, bem como o de testes de dureza se constituírem métodos relativamente simples, baratos e reproduzíveis (Willems et al.<sup>85</sup>, 1993).

Optou-se pelo o ensaio Vickers, ao invés do Knoop, levando-se em consideração trabalhos de outros autores, nos quais foi apontada uma adequação maior daquele em relação a este, além do ensaio tipo Vickers se mostrar mais apropriado para estudos das variações de propriedades mecânicas de um material anisotrópico como a dentina (Ari et al.<sup>5</sup>, 2004; Vieira et al.<sup>80</sup>, 2005).

Quanto à utilização de terceiros molares, trata-se de um procedimento comumente observado em pesquisas odontológicas *in vitro* (Kinney et al.<sup>38</sup>, 1996; Marending et al.<sup>45</sup>, 2007; Nakajima et al.<sup>53</sup>, 2000; Sauro et al.<sup>65</sup>, 2009; Strawn et al.<sup>76</sup>, 1996; Toledano et al.<sup>78</sup>, 2005), sendo recomendado na especificação técnica da ISO referente aos estudos envolvendo adesão, que sugere a utilização de terceiros molares de pacientes entre 14 e 40 anos de idade (ISO<sup>35</sup>, 2003). Na presente

dissertação pôde-se constatar a adequação destes dentes para estudos de microdureza, quando da verificação da distribuição normal dos valores de microdureza inicial dos 192 espécimes.

A aplicação da radiação gama na esterilização de dentes tem mostrado resultados promissores, uma vez que este método de esterilização parece não alterar a estrutura dental, tendo sido mais frequentemente utilizada a dose de 25 kGy (Amaechi et al.<sup>2</sup>, 1998; Amaechi et al.<sup>3</sup>, 1999; Brauer et al.<sup>12</sup>, 2008; DeWald<sup>21</sup>, 1997; Moscovich et al.<sup>51</sup>, 1999; Sperandio et al.<sup>75</sup>, 2001), embora White et al.<sup>83</sup> (1994) tenha conseguido a esterilização de dentes com uma dose inferior (1,73 kGy). Encontrou-se apenas o estudo de Titley et al.<sup>77</sup> (1998) mostrando resultados negativos relacionados a este método. Segundo estes autores, a radiação gama e outros meios de armazenamento/esterilização (timol, metanol e glutaraldeído) foram responsáveis pelos menores valores de resistência adesiva ao cisalhamento.

## **6.2 Discussão dos resultados**

### **6.2.1 Armazenamento**

Quando analisada a ação isolada de cada solução de armazenamento, utilizando-se o teste *t* de Student (Tabela 2), verificou-se que apenas a água destilada não causou alterações significantes na microdureza dos espécimes ( $p=0,226$  a 7 dias;  $p=0,920$  a 28 dias). Todas as demais soluções produziram efeitos estatisticamente significantes. Após a ANOVA a 2 fatores para avaliar a interação das soluções e

períodos de armazenamento, chamou atenção o comportamento do grupo NaOCl (G4), que foi responsável por reduções de microdureza nos espécimes da ordem de até 70% em média (subgrupo de 28 dias de armazenamento, Tabela 2). Também é possível visualizar, no gráfico da Figura 14, a magnitude da diferença existente entre o G4 e os demais grupos, tendo os grupos G2 (timol) e G3 (formalina) apresentado valores de diferenças ( $Md_1 - Md_2$ ) semelhantes, porém discretamente superiores aos do G1 (água destilada). Isso é confirmado pela análise da Tabela 4, na qual são observados os conjuntos homogêneos formados. Note-se a discrepância dos subgrupos do G4 em relação à proximidade dos outros subgrupos entre si.

Esses resultados coadunam com os de outros estudos nos quais utilizaram-se soluções de NaOCl sobre a dentina (Oliveira et al.<sup>55</sup>, 2007; Sim et al.<sup>69</sup>, 2001; Slutzky-Goldberg et al.<sup>70</sup>, 2002; Slutzky-Goldberg et al.<sup>71</sup>, 2004; Toledano et al.<sup>78</sup>, 2005).

Quanto à ação do NaOCl sobre o tecido dentinário, vários outros autores também relataram alterações estruturais. White et al.<sup>82</sup> (2002) observaram enfraquecimento da dentina quando exposta por longos períodos ao hipoclorito. Grigoratos et al.<sup>32</sup> (2001), Sim et al.<sup>69</sup> (2001) e Mareending et al.<sup>45</sup> (2007) relataram redução no módulo de elasticidade e resistência flexural quando empregadas soluções de NaOCl de diferentes concentrações (3, 5, e 9%). Slutzky-Goldberg et al.<sup>71</sup> (2004) relataram redução na microdureza de dentes irrigados endodonticamente com NaOCl em diferentes concentrações, descrevendo uma ação concentração-dependente.

Embora a maior parte dos estudos defenda uma ação focal do hipoclorito apenas no conteúdo orgânico da dentina (Inaba et al.<sup>34</sup>, 1996; Mareending et al.<sup>45</sup>, 2007; Zehnder et al.<sup>88</sup>, 2003), estudo de Sakae et al.<sup>63</sup> (1988) utilizando dentes bovinos, detectou perda de íons magnésio



e carbono da estrutura cristalina da dentina após exposição ao NaOCl a 10%.

Cabe ressaltar que dentro desta análise, quando observado o período de 7 dias de armazenamento, houve a formação de apenas 2 conjuntos homogêneos: um formado pelos grupos 1 a 3 (água destilada, timol a 0,05% e formalina a 10%) e outro formado pelo grupo 4 (NaOCl a 1%). Passando-se para o período de 28 dias de armazenamento, foram notados 3 conjuntos homogêneos: os grupos da água destilada e do NaOCl ficaram cada um em uma extremidade, situando-se entre eles o conjunto formado pelos grupos do timol e da formalina, o que denota a influência do período de armazenamento na ação das diferentes soluções sobre os resultados obtidos.

#### 6.2.2 Esterilização e associações

Quanto à esterilização, os resultados mostraram que, quando analisados isoladamente - tendo sido tal análise realizada no grupo armazenado em água destilada - os métodos de esterilização não causaram alterações significantes na microdureza dentinária, embora tenham sido observados resultados mais consistentes no grupo esterilizado pela radiação gama. Em relação aos diferentes períodos, a esterilização por autoclave causou diferenças significantes na microdureza do subgrupo armazenado por 28 dias, enquanto a esterilização por radiação gama não causou diferenças em nenhum dos períodos.

Quando analisada a esterilização nos demais grupos – análise conduzida pelo teste *t* de Student estendido a todos os grupos experimentais- foi notado um comportamento diferente entre os métodos de esterilização. Enquanto a autoclave causou diferenças estatisticamente significantes em 4 subgrupos ( água destilada a 28 dias, timol a 7 dias, e NaOCl a 7 e 28 dias), a radiação gama o fez apenas em 2 (formalina a 28 dias e NaOCl a 7 dias), sendo que as diferenças de microdureza observadas para esta última foram de amplitude menor do que para a primeira. Além disso, os grupos da formalina a 28 dias e do NaOCl a 7 dias apresentaram diferença negativa dos valores de microdureza, ou seja, mostraram valores de  $Md_3$  maiores do que os de  $Md_2$ , quando submetidos à radiação gama.

Outro aspecto importante foi notado quanto ao comportamento da esterilização por autoclave sobre os subgrupos armazenados em formalina a 10%. Nestes grupos foi alcançado o melhor resultado deste método de esterilização, sem ocorrência de diferenças estatisticamente significantes após sua aplicação, e com as menores diferenças. Este resultado discorda do relatado por Lee et al.<sup>41</sup> (2007). Entretanto, há concordância entre os dois estudos quanto à associação do armazenamento em água destilada seguido da esterilização em autoclave, o que, em ambos, foi mostrado como prejudicial (o referido estudo avaliou a resistência adesiva).

Os resultados da ANOVA a 3 fatores mostraram significância para os fatores: solução de armazenamento ( $p= 0,000000$ ), método de esterilização ( $p= 0,044600$ ), interação solução de armazenamento X método de esterilização ( $p= 0,005685$ ) e interação solução de armazenamento X período de armazenamento X método de esterilização ( $p= 0,044772$ ).

Verificando-se os gráficos da Figura 16, destaca-se o comportamento da solução de timol. Quanto ao subgrupo armazenado por 7 dias, é possível observar uma maior distância entre as curvas azul (autoclave) e vermelha (radiação gama), o que sugere que a diferença estatística encontrada nesse caso tenha se dado mais às expensas desta solução, no referido período. Reforçando esta idéia, pode-se notar a formação de conjuntos homogêneos contendo muitos subgrupos, ou seja, a diferença estatística verificada parece ter sido influenciada pelo comportamento diferencial deste subgrupo (armazenamento por 7 dias seguido de esterilização por autoclave), enquanto os demais mantiveram-se próximos entre si. No estudo de Titley et al.<sup>77</sup> (1998) também foi encontrado resultado negativo associado ao armazenamento em solução de timol quando avaliada a força adesiva.

Quando analisados os conjuntos homogêneos formados após o teste de Tukey pós-esterilização, foi notada heterogeneidade dos subgrupos H<sub>2</sub>O/radiação gama apenas em relação aos subgrupos do timol expostos à autoclave e aos subgrupos do NaOCl (todos os períodos e métodos de esterilização). A associação do armazenamento em timol a 0,05% seguido da esterilização em autoclave (tanto a 7 quanto a 28 dias) mostrou-se prejudicial quanto aos valores de microdureza dentinária neste estudo.

Em todas as análises conduzidas neste trabalho, os melhores resultados foram atribuídos ao armazenamento em água destilada seguido da radiação gama como método de esterilização.

## 7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, e nos limites da proposição deste estudo, foi possível concluir que:

- a) o armazenamento de dentes em água destilada por até 28 dias não alterou as propriedades físicas do substrato dental em termos de microdureza dentinária radicular;
- b) o NaOCl a 1% reduziu a microdureza dentinária da ordem de até 70% em média (em 28 dias de armazenamento), não sendo recomendado seu uso para dentes a serem utilizados em pesquisa;
- c) a esterilização tanto em autoclave quanto por radiação gama não alterou a microdureza dentinária de forma significativa quando aplicada isoladamente, embora interações com soluções previamente utilizadas para o armazenamento tenham sido encontradas;
- d) a esterilização por radiação gama após o armazenamento em água destilada mostrou-se o melhor método a ser utilizado em terceiros molares extraídos, no que diz respeito à microdureza dentinária.

## 8 REFERÊNCIAS\*

- 1 Alani A, Knowles J, Ng YL, et al. Ion release characteristics, precipitate formation and sealing ability of a potential new root canal filling material. *Int Endod J*. 2008;41(9):817-8.
- 2 Amaechi BT, Higham SM, Edgar WM. Efficacy of sterilisation methods and their effect on enamel demineralisation. *Caries Res*. 1998;32(6):441-6.
- 3 Amaechi BT, Higham SM, Edgar WM. Effect of sterilisation methods on the structural integrity of artificial enamel caries for intra-oral cariogenicity tests. *J Dent*. 1999;27(4):313-6.
- 4 Angker L, Swain MV, Kilpatrick N. Micro-mechanical characterisation of the properties of primary tooth dentine. *J Dent*. 2003;31(4):261-7.
- 5 Ari H, Erdemir A, Belli S. Evaluation of the effect of endodontic irrigation solutions on the microhardness and the roughness of root canal dentin. *J Endod*. 2004;30(11):792-5.
- 6 Barjau-Escribano A, Sancho-Bru JL, Forner-Navarro L, et al. Influence of prefabricated post material on restored teeth: fracture strength and stress distribution. *Oper Dent*. 2006;31(1):47-54.
- 7 Bechtold P. Avaliação in vitro da microdureza dentinária radicular em dentes bovinos após aplicação de diferentes tratamentos com hipoclorito de sódio, associado ou não ao cimento de fosfato de zinco [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo - USP; 2006.

---

\* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: US National Library of Medicine, 2009.

- 8 Biven GM, Bapna MS, Heuer MA. Effect of eugenol and eugenol-containing root canal sealers on the microhardness of human dentin. *J Dent Res.* 1972;51(6):1602-9.
- 9 Bodrumlu E, Tunga U, Alacam T. Influence of immediate and delayed post space preparation on sealing ability of resilon. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007;103(6):e61-4.
- 10 Boschian Pest L, Cavalli G, Bertani P, et al. Adhesive post-endodontic restorations with fiber posts: push-out tests and SEM observations. *Dent Mater.* 2002;18(8):596-602.
- 11 Brännström M, Coli P, Blixt M. Effect of tooth storage and cavity cleansing on cervical gap formation in Class II glass-ionomer/composite restorations. *Dent Mater.* 1992;8(5):327-31.
- 12 Brauer DS, Saeki K, Hilton JF, et al. Effect of sterilization by gamma radiation on nano-mechanical properties of teeth. *Dent Mater.* 2008;24(8):1137-40.
- 13 Burcak Cengiz S, Stephan Atac A, Cehreli ZC. Biomechanical effects of splint types on traumatized tooth: a photoelastic stress analysis. *Dent Traumatol.* 2006;22(3):133-8.
- 14 Callister WD. Mechanical properties of metals. In: *Materials science and engineering - an introduction.* New York: John Wiley & Sons; 2007. p.131-173.
- 15 Camps J, Baudry X, Bordes V, et al. Influence of tooth cryopreservation and storage time on microleakage. *Dent Mater.* 1996;12(2):121-6.
- 16 Catros S, Pothuaud L, Dard M, et al. Collagen fibrils of human acellular extrinsic fiber cementum. *J Periodontol.* 2008;79(6):1095-100.

- 17 Coniglio I, Magni E, Goracci C, et al. Post space cleaning using a new nickel titanium endodontic drill combined with different cleaning regimens. *J Endod.* 2008;34(1):83-6.
- 18 Craig RG, Gehring PE, Peyton FA. Relation of structure to the microhardness of human dentin. *J Dent Res.* 1959;38(3):624-30.
- 19 Cruz-Filho AM, Paula EA, Pecora JD, et al. Effect of different EGTA concentrations on dentin microhardness. *Braz Dent J.* 2002;13(3):188-90.
- 20 Cruz-Filho AM, Sousa-Neto MD, Saquy PC, et al. Evaluation of the effect of EDTAC, CDTA, and EGTA on radicular dentin microhardness. *J Endod.* 2001;27(3):183-4.
- 21 DeWald JP. The use of extracted teeth for in vitro bonding studies: a review of infection control considerations. *Dent Mater.* 1997;13(2):74-81.
- 22 Dominici JT, Eleazer PD, Clark SJ, et al. Disinfection/sterilization of extracted teeth for dental student use. *J Dent Educ.* 2001;65(11):1278-80.
- 23 Eldeniz AU, Erdemir A, Belli S. Effect of EDTA and citric acid solutions on the microhardness and the roughness of human root canal dentin. *J Endod.* 2005;31(2):107-10.
- 24 Esclassan Noirrit E, Gregoire G, Cournot M. Morphological study of fiber-reinforced post-bonding system-root dentin interface by evaluation of two bonding systems. *J Dent.* 2008;36(3):204-13.
- 25 Fagrell TG, Lingstrom P, Olsson S, et al. Bacterial invasion of dentinal tubules beneath apparently intact but hypomineralized enamel in molar teeth with molar incisor hypomineralization. *Int J Paediatr Dent.* 2008;18(5):333-40.
- 26 Ferreira MC. Preparo de amostras para realização do teste de microdureza [apostila]. Florianópolis: Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina; 2004.

- 27 Fimple JL, Fontana CR, Foschi F, et al. Photodynamic treatment of endodontic polymicrobial infection in vitro. *J Endod*. 2008;34(6):728-34.
- 28 Fuentes V, Ceballos L, Osorio R, et al. Tensile strength and microhardness of treated human dentin. *Dent Mater*. 2004;20(6):522-9.
- 29 Gaggl A, Weiglein A, Kahr H, et al. Apical capping as a new technique for retrograde treatment of an infected root apex: introduction and first results. *J Craniomaxillofac Surg*. 2007;35(4-5):212-7.
- 30 Ghersel EL, Guedes-Pinto AC, Ciamponi AL. [Effect of the storage method on microleakage of primary teeth restored with different bonding systems: in vitro study]. *Pesqui Odontol Bras*. 2001;15(1):29-34.
- 31 Grajower R, Azaz B, Bron-Levi M. Microhardness of sclerotic dentin. *J Dent Res*. 1977;56(4):446.
- 32 Grigoratos D, Knowles J, Ng YL, et al. Effect of exposing dentine to sodium hypochlorite and calcium hydroxide on its flexural strength and elastic modulus. *Int Endod J*. 2001;34(2):113-9.
- 33 Habelitz S, Marshall GW, Jr., Balooch M, et al. Nanoindentation and storage of teeth. *J Biomech*. 2002;35(7):995-8.
- 34 Inaba D, Ruben J, Takagi O, et al. Effect of sodium hypochlorite treatment on remineralization of human root dentine in vitro. *Caries Res*. 1996;30(3):218-24.
- 35 International Organization for Standardization. Technical Specification. ISO/TS 11405. Dental Materials - Testing of adhesion to tooth structure. Geneva, Suíça; 2003.
- 36 Kalkan M, Usumez A, Ozturk AN, et al. Bond strength between root dentin and three glass-fiber post systems. *J Prosthet Dent*. 2006;96(1):41-6.



- 37 Karapanou V, Vera J, Cabrera P, et al. Effect of immediate and delayed post preparation on apical dye leakage using two different sealers. *J Endod.* 1996;22(11):583-5.
- 38 Kinney JH, Balooch M, Marshall SJ, et al. Hardness and Young's modulus of human peritubular and intertubular dentine. *Arch Oral Biol.* 1996;41(1):9-13.
- 39 Kohn WG, Collins AS, Cleveland JL, et al. Guidelines for infection control in dental health-care settings--2003. *MMWR Recomm Rep.* 2003;52(RR-17):1-61.
- 40 Kumar M, Sequeira PS, Peter S, et al. Sterilisation of extracted human teeth for educational use. *Indian J Med Microbiol.* 2005;23(4):256-8.
- 41 Lee JJ, Nettey-Marbell A, Cook A, Jr., et al. Using extracted teeth for research: the effect of storage medium and sterilization on dentin bond strengths. *J Am Dent Assoc.* 2007;138(12):1599-603.
- 42 Mahoney E, Holt A, Swain M, et al. The hardness and modulus of elasticity of primary molar teeth: an ultra-micro-indentation study. *J Dent.* 2000;28(8):589-94.
- 43 Manfrin TM, Poi WR, de Mendonca MR, et al. Analysis in vitro of direct bonding system with cyanoacrylate ester and orthodontic wires. *Dent Traumatol.* 2009;25(2):229-32.
- 44 Manjunath K, Kavitha B, Saraswathi TR, et al. Cementum analysis in cleidocranial dysostosis. *Indian J Dent Res.* 2008;19(3):253-6.
- 45 Mareending M, Luder HU, Brunner TJ, et al. Effect of sodium hypochlorite on human root dentine--mechanical, chemical and structural evaluation. *Int Endod J.* 2007;40(10):786-93.

- 46 Matherne RP, Angelopoulos C, Kulild JC, et al. Use of cone-beam computed tomography to identify root canal systems in vitro. *J Endod.* 2008;34(1):87-9.
- 47 Meredith N, Sherriff M, Setchell DJ, et al. Measurement of the microhardness and Young's modulus of human enamel and dentine using an indentation technique. *Arch Oral Biol.* 1996;41(6):539-45.
- 48 Miears JR, Jr., Charlton DG, Hermes CB. Effect of dentin moisture and storage time on resin bonding. *Am J Dent.* 1995;8(2):80-2.
- 49 Miranda WG, Placido E, Moura SK, et al. Influence of postextraction substrate aging on the microtensile bond strength of a dental adhesive system. *J Adhes Dent.* 2005;7(3):193-6.
- 50 Moraes LGP. Análise quantitativa de espectros de absorção no infravermelho de compósitos odontológicos fotoativados [dissertação]. Ilha Solteira: Faculdade de Engenharia - UNESP; 2004.
- 51 Moscovich H, Creugers NH, Jansen JA, et al. In vitro dentine hardness following gamma-irradiation and freezing. *J Dent.* 1999;27(7):503-7.
- 52 Muench A, da Silva EM, Ballester RY. Influence of different dentinal substrates on the tensile bond strength of three adhesive systems. *J Adhes Dent.* 2000;2(3):209-12.
- 53 Nakajima M, Kanemura N, Pereira PN, et al. Comparative microtensile bond strength and SEM analysis of bonding to wet and dry dentin. *Am J Dent.* 2000;13(6):324-8.
- 54 Norrington DW, Ruby J, Beck P, et al. Observations of biofilm growth on human dentin and potential destruction after exposure to antibiotics. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008;105(4):526-9.

- 55 Oliveira LD, Carvalho CA, Nunes W, et al. Effects of chlorhexidine and sodium hypochlorite on the microhardness of root canal dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007;104(4):e125-8.
- 56 Panighi M, G'Sell C. Influence of calcium concentration on the dentin wettability by an adhesive. *J Biomed Mater Res.* 1992;26(8):1081-9.
- 57 Panighi M, G'Sell C. Effect of the tooth microstructure on the shear bond strength of a dental composite. *J Biomed Mater Res.* 1993;27(8):975-81.
- 58 Parsell DE, Karns L, Buchanan WT, et al. Mercury release during autoclave sterilization of amalgam. *J Dent Educ.* 1996;60(5):453-8.
- 59 Pashley D, Okabe A, Parham P. The relationship between dentin microhardness and tubule density. *Endod Dent Traumatol.* 1985;1(5):176-9.
- 60 Pashley EL, Tao L, Pashley DH. Sterilization of human teeth: its effect on permeability and bond strength. *Am J Dent.* 1993;6(4):189-91.
- 61 Qing Y, Akita Y, Kawano S, et al. Cleaning efficacy and dentin micro-hardness after root canal irrigation with a strong acid electrolytic water. *J Endod.* 2006;32(11):1102-6.
- 62 Rodrigues LK, Cury JA, Nobre dos Santos M. The effect of gamma radiation on enamel hardness and its resistance to demineralization in vitro. *J Oral Sci.* 2004;46(4):215-20.
- 63 Sakae T, Mishima H, Kozawa Y. Changes in bovine dentin mineral with sodium hypochlorite treatment. *J Dent Res.* 1988;67(9):1229-34.
- 64 Saleh AA, Ettman WM. Effect of endodontic irrigation solutions on microhardness of root canal dentine. *J Dent.* 1999;27(1):43-6.

- 65 Sauro S, Mannocci F, Toledano M, et al. EDTA or H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/NaOCl dentine treatments may increase hybrid layers' resistance to degradation: a microtensile bond strength and confocal-micropermeability study. *J Dent*. 2009;37(4):279-88.
- 66 Sengun A, Cobankara FK, Orucoglu H. Effect of a new restoration technique on fracture resistance of endodontically treated teeth. *Dent Traumatol*. 2008;24(2):214-9.
- 67 Shabahang S, Aslanyan J, Torabinejad M. The substitution of chlorhexidine for doxycycline in MTAD: the antibacterial efficacy against a strain of *Enterococcus faecalis*. *J Endod*. 2008;34(3):288-90.
- 68 Silva KG, Pedrini D, Delbem AC, et al. Microhardness and fluoride release of restorative materials in different storage media. *Braz Dent J*. 2007;18(4):309-13.
- 69 Sim TP, Knowles JC, Ng YL, et al. Effect of sodium hypochlorite on mechanical properties of dentine and tooth surface strain. *Int Endod J*. 2001;34(2):120-32.
- 70 Slutzky-Goldberg I, Liberman R, Heling I. The effect of instrumentation with two different file types, each with 2.5% NaOCl irrigation on the microhardness of root dentin. *J Endod*. 2002;28(4):311-2.
- 71 Slutzky-Goldberg I, Maree M, Liberman R, et al. Effect of sodium hypochlorite on dentin microhardness. *J Endod*. 2004;30(12):880-2.
- 72 Sly MM, Moore BK, Platt JA, et al. Push-out bond strength of a new endodontic obturation system (Resilon/Epiphany). *J Endod*. 2007;33(2):160-2.
- 73 Soares CJ, Soares PV, de Freitas Santos-Filho PC, et al. The influence of cavity design and glass fiber posts on biomechanical behavior of endodontically treated premolars. *J Endod*. 2008;34(8):1015-9.

- 74 Solano F, Hartwell G, Appelstein C. Comparison of apical leakage between immediate versus delayed post space preparation using AH Plus sealer. *J Endod.* 2005;31(10):752-4.
- 75 Sperandio M, Souza JB, Oliveira DT. Effect of gamma radiation on dentin bond strength and morphology. *Braz Dent J.* 2001;12(3):205-8.
- 76 Strawn SE, White JM, Marshall GW, et al. Spectroscopic changes in human dentine exposed to various storage solutions--short term. *J Dent.* 1996;24(6):417-23.
- 77 Titley KC, Chernecky R, Rossouw PE, et al. The effect of various storage methods and media on shear-bond strengths of dental composite resin to bovine dentine. *Arch Oral Biol.* 1998;43(4):305-11.
- 78 Toledano M, Osorio R, Osorio E, et al. Microhardness of acid-treated and resin infiltrated human dentine. *J Dent.* 2005;33(4):349-54.
- 79 Tonami K, Takahashi H, Nishimura F. Effect of frozen storage and boiling on tensile strength of bovine dentin. *Dent Mater J.* 1996;15(2):205-11.
- 80 Vieira A, Hancock R, Dumitriu M, et al. How does fluoride affect dentin microhardness and mineralization? *J Dent Res.* 2005;84(10):951-7.
- 81 Vieira S. *Análise de variância: (Anova)*. São Paulo: Atlas; 2006.
- 82 White JD, Lacefield WR, Chavers LS, et al. The effect of three commonly used endodontic materials on the strength and hardness of root dentin. *J Endod.* 2002;28(12):828-30.
- 83 White JM, Goodis HE, Marshall SJ, et al. Sterilization of teeth by gamma radiation. *J Dent Res.* 1994;73(9):1560-7.
- 84 White RR, Hays GL. Failure of ethylene oxide to sterilize extracted human teeth. *Dent Mater.* 1995;11(4):231-3.

85 Willems G, Celis JP, Lambrechts P, et al. Hardness and Young's modulus determined by nanoindentation technique of filler particles of dental restorative materials compared with human enamel. *J Biomed Mater Res.* 1993;27(6):747-55.


86 Wrbas KT, Altenburger MJ, Schirrmeister JF, et al. Effect of adhesive resin cements and post surface silanization on the bond strengths of adhesively inserted fiber posts. *J Endod.* 2007;33(7):840-3.

87 Yoldas O, Dogan C, Seydaoglu G. The effect of two different calcium hydroxide combinations on root dentine microhardness. *Int Endod J.* 2004;37(12):828-31.

88 Zehnder M, Lehnert B, Schonenberger K, et al. [Irrigants and intracanal medicaments in endodontics]. *Schweiz Monatsschr Zahnmed.* 2003;113(7):756-63.

89 Zheng TL, Huang C, Zhang ZX, et al. [Influence of storage methods on microtensile bond strength of dentin adhesive system]. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue.* 2005;14(2):147-50.

**ANEXO A – Certificado do comitê de ética em pesquisa**

 **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
Av. Eng. Francisco José Longo, 777 – Jd. São Diniz  
CEP 12201-970 – F. (12) 3947-9028  
Fax: (12) 3947-9010 / janeto@fojoc.unesp.br



**CERTIFICADO**  
**Comitê de Ética em Pesquisa**  
**Envolvendo Seres Humanos**

**CERTIFICAMOS**, que o protocolo nº **075/2008-PH/CEP**, sobre **“Influência de diferentes soluções e períodos de armazenagem, meios de esterilização e suas associações sobre a microdureza da dentina radicular em dentes humanos extraídos: Estudo in vitro”**, sob a responsabilidade de **MARCOS UYEDA AIVAZOGLOU**, está de acordo com os Princípios Éticos, seguindo diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa, envolvendo seres humanos, conforme Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e foi aprovado por este Comitê de Ética em Pesquisa.

São José dos Campos, 18 de novembro de 2008.

Prof. Adjunta **JANETE DIAS ALMEIDA**  
Coordenadora

**ANEXO B - Modelo do termo de doação de material biológico  
preenchido e assinado pelos pacientes doadores ou  
seus responsáveis legais**

**TERMO DE DOAÇÃO DE MATERIAL BIOLÓGICO**

**Autorização de doação de material biológico (dente/tecido) para pesquisa  
científica**

Eu, \_\_\_\_\_, abaixo assinado, RG  
\_\_\_\_\_, CPF \_\_\_\_\_, residente na cidade  
de \_\_\_\_\_, Estado de \_\_\_\_\_, declaro  
que estou doando os dentes/tecidos, que seriam descartados, para serem  
utilizados em pesquisas científicas.

São José dos Campos, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
**Paciente ou responsável legal**

\_\_\_\_\_  
**Cirurgião-Dentista**  
**(profissional responsável pela coleta e destinação do material)**



**ANEXO C - Modelo do termo de doação de material biológico  
preenchido e assinado pelos profissionais que  
colaboraram com a pesquisa**

**TERMO DE DOAÇÃO DE MATERIAL BIOLÓGICO**

Eu, Dr. \_\_\_\_\_, RG \_\_\_\_\_, CPF  
\_\_\_\_\_, CROSP, \_\_\_\_\_, com consultório na Rua/Av.  
\_\_\_\_\_ nº \_\_\_\_\_ na cidade  
de \_\_\_\_\_, Estado de \_\_\_\_\_, declaro  
que estou doando dentes/tecidos para serem utilizados em pesquisas  
científicas, obtidos mediante Termo de Doação constante dos prontuários dos  
pacientes.

Declaro estar ciente que o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos  
– CEPH, da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP,  
poderá, a qualquer momento, solicitar cópia de todos os Termos de Doação  
de Material Biológico corretamente preenchidos por cada doador ou seu  
representante legal.

São José dos Campos, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
Cirurgião-Dentista

(profissional responsável pela coleta e destinação do material)

**ANEXO D – Certificado de esterilização CBE Embrarad**

**EMPRESA BRASILEIRA DE RADIAÇÕES LTDA.**  
AV. CRUZADA BANDEIRANTE, 290 - COTIA - SP  
C.N.P.J 45.789.724/0002-85  
REGISTRO MS 926/81

CLIENTE.....: MARCOS UYEDA AIVA20GLOU  
CERTIFICADO N.: 175876 - EMITIDO EM 17/04/2009

PROCESSADO EM : 17/04/2009

MATERIAL PROCESSADO:

QUANT.	PRODUTO	LOTE
--------	---------	------

10 UN BLOCO DE RESINA ACRIL.75X50X10MM FRAG.RAIZ.D////		
--	--	--

DOSE: 25 KGY

MATERIAL REFERENTE SUA NF: 011496 DE 15/04/2009

CERTIFICAMOS QUE O MATERIAL ACIMA DESCRITO FOI PROCESSADO  
ATRAVES DE RAIOS GAMA E REMETIDO ATRAVES DE NOSSA N.F. 011754.

SISTEMA DE MEDIDA DOSIMETRICA RED PERSPEX 4034.  
O MATERIAL E' CONSIDERADO PROCESSADO DESDE QUE INVIOLADAS  
AS EMBALAGENS.

FERNANDO REICHMANN  
Responsável Técnico

Aivazoglou MU. *Effect of storage solutions, sterilization methods and their associations upon human dentin microhardness: an in vitro study [dissertation]. São José dos Campos: São José dos Campos School of Dentistry, UNESP - São Paulo State University; 2009.*

## **ABSTRACT**

*The aim of this study was to evaluate the effect of storage solutions: distilled water (G1), 0.05% thymol solution (G2), 10% formalin (G3), and 1% sodium hypochlorite (G4); sterilization methods- steam autoclaving (A) and gamma irradiation (B)- and the associations between the two factors on the root dentin microhardness of extracted human third molars. Data were subjected to Student's t test for dependent samples, Two and Three-way ANOVA, and Tukey's test ( $\alpha = 0.05$  for all tests). Regarding storage, only the G1 (in both periods) did not alter the dentin microhardness significantly. In the analysis of sterilization methods, there were significant differences on the solution employed, storage time and sterilization method ( $p < 0.05$ ). Based on the results, it was concluded that the storage in distilled water did not change the root dentin microhardness, and association of this storage solution with sterilization by Gamma radiation did not produce alterations by means of the studied variable, thus consisting in the best methods regarding storage and sterilization of teeth to be used in research.*

*Keywords: Exposure to Biological Agents. Sterilization. Hardness tests. Dentin. Tooth root.*