

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

LIDIANY KARLA AZEVEDO RODRIGUES
CIRURGIÁ-DENTISTA

**CARGA BACTERIANA DE DENTES HUMANOS E EFEITO DA
RADIÇÃO GAMA SOBRE O ESMALTE DENTAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Concentração, Cariologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de mestre.

**PIRACICABA
2002**

**UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL**

CIRUGIÃ-DENTISTA: LIDIANY KARLA AZEVEDO RODRIGUES

**CARGA BACTERIANA DE DENTES HUMANOS E EFEITO DA
RADIÇÃO GAMA SOBRE O ESMALTE DENTAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Concentração, Cariologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Marinês Nobre dos Santos Uchôa

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Jaime Aparecido Cury

Profa. Dra. Marinês Nobre dos Santos Uchôa

Profa. Dra. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto

Este exemplar foi devidamente corrigido,
de acordo com a Resolução CCPG-036/83

CPG, 02/04/2002


Assinatura do Orientador

**PIRACICABA
2002**

2002.2.2514

UNIDADE 30
Nº CHAMADA T/UNICAMP
R618c
V _____ EX _____
TOMBO BCI 49165
PROC. 16-837/02
C _____ D X
PREÇO R\$ 11,00
DATA _____
Nº CPD _____

CM001676BB-1

BIB ID 241020

Ficha Catalográfica

R618c Rodrigues, Lidiany Karla Azevedo.
Carga bacteriana de dentes humanos e efeito da radiação gama sobre o esmalte dental. / Lidiany Karla Azevedo Rodrigues. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2002.
xviii, 110p. : il.

Orientadora : Profª Drª Marinês Nobre dos Santos Uchôa.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Esterilização. 2. Dentes. 3. Esmalte dentário. 4. Radiação ionizante. I. Uchôa, Marinês Nobre dos Santos. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.


Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marilene Girello CRB/8-6159, da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP.





FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de MESTRADO, em sessão pública realizada em 28 de Janeiro de 2002, considerou a candidata LIDIANY KARLA AZEVEDO RODRIGUES aprovada.

1. Profa. Dra. MARINES NOBRE DOS SANTOS UCHOA  _____

2. Profa. Dra. TEREZINHA DE JESUS ANDREOLI PINTO  _____

3. Prof. Dr. JAIME APARECIDO CURY  _____

A Deus,

que encheu minha mente, governou meu coração e guiou meus pés

À minha família,

meus pais, Paiva e Socorro,

meus irmãos, Fabyola, Farah, Neto e Brenno,

meus primos e amigos, Tércio, Izabel e Bruna

Ao meu amor,

Luís Fernando

sempre presentes

nos grandes e pequenos momentos

deste desafio

dedico este trabalho.

Agradecimento especial

À Profa. Dra. Marinês Nobre dos Santos Uchôa,

não somente pela orientação neste trabalho,
mas principalmente pela acolhida e pelo incentivo
ao meu crescimento acadêmico e pessoal.

Muito obrigada.

Aos Profs. Dr. Jaime Aparecido Cury

e Dr. Pedro Luiz Rosalen

meus professores no curso de mestrado,
pela ajuda, amizade, estímulo e exemplo.

Aos mestres com carinho.

Agradecimentos

Ao Magnífico Reitor da Unicamp, Prof. Dr. Hermano Ferreira de Medeiros Tavares.

Ao Prof. Dr. Antonio Wilson Sallum, Diretor da FOP-UNICAMP, instituição onde cursei a pós-graduação.

À Profa. Dra. Altair Antoninha Del Bel Cury, Coordenadora dos Cursos de Pós-Graduação da FOP-UNICAMP.

Ao coordenador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen.

À Universidade Federal do Ceará pela concessão do meu afastamento para a realização deste curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- CAPES, pela concessão da bolsa de estudos, fundamental para minha manutenção em Piracicaba.

Aos docentes do Curso de Pós-Graduação em Odontologia da FOP-UNICAMP, pelo convívio e ensinamentos recebidos.

Aos professores e colegas das Disciplinas de Dentística da Universidade Federal do Ceará, que incentivaram meus primeiros passos científicos.

Ao Prof. Dr. Haroldo César Pinheiro Beltrão, diretor da Faculdade de Farmácia Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, pelo incentivo e exemplo de dedicação e competência.

Aos professores da FOP-UNICAMP Altair Antoninha Del Bel Cury, Luiz André Freire Pimenta e Sérgio Roberto Peres Line, membros da Banca de Qualificação, pelas correções e sugestões para versão final deste trabalho.

Aos técnicos do Laboratório de Bioquímica Oral, da FOP-UNICAMP, José Alfredo Soares, Mariza de Jesus Carlos Soares e Waldomiro Vieira Filho, pelo carinho demonstrado e pelo auxílio no preparo das soluções.

À bibliotecária Marilene Girello pelo auxílio na correção das referências bibliográficas e confecção da ficha catalográfica.

Às secretárias Elisa, Sônia e Érika, pela atenção em todas as fases administrativas.

Agradecimentos

Ao engenheiro agrônomo Marcelo Corrêa Alves, do Setor de Informática da Escola Superior de Agronomia “Luiz de Queiroz”, pela análise estatística.

À Profa. Cíntia P. Machado Tabchoury e à amiga Rosane Argenta pela ajuda no estabelecimento da metodologia da ciclagem de pH.

Ao Prof. Dr. Augusto Tullman Neto do Laboratório de Melhoramento de Plantas do Centro de Energia Nuclear na Agricultura- CENA-USP, pela irradiação dos espécimes dentais.

À Profa. Dra. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto do Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP e ao amigo Márcio Ferrarine, pela orientação na parte de testes de esterilidade.

Às amigas Roberta, Rosane, Viviane e Iriana pelo apoio essencial na ocasião da execução da parte experimental deste trabalho.

Aos amigos e companheiros de turma Andréa, Adriana, André, Fábio Mialhe, Fábio Koslówsk, Iriana, Luciane, Marcelle, Márcia, Roberta, Rosane, Vanessa e Viviane que tornaram a vida em Piracicaba mais alegre, pela força, pela amizade, ajuda e companheirismo.

Aos amigos e companheiros de Pós-Graduação Simone, Mitsue, Alexandre, Celso, Zezé, Léa, Nilza, Ynara, Flávia, Ferdinando, Dany e Franco pelo companheirismo e amizade.

Ao amigo Pedro Adriano pela ajuda na coleta dos dentes e apoio nos primeiros momentos da execução deste trabalho.

À amiga Roberta pela paciência e tolerância demonstradas em todos os dias de convivência em nossa casa.

Ao amigo Vicente Sabóia pelo apoio dado nos primeiros momentos em Piracicaba.

A todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

“Creio que a imaginação pode mais que o conhecimento.

Que o mito pode mais que a história.

Que os sonhos podem mais que os fatos.

Que a esperança sempre vence a experiência.

Que o riso cura a tristeza.

E creio que o amor pode muito mais que a morte.”

Desconhecido.

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUÇÃO	5
2. REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1. CULTIVO E CRESCIMENTO DE MICRORGANISMOS	11
2.2. CONTROLE MICROBIANO	14
2.3. MÉTODOS DE ESTERILIZAÇÃO	18
2.3.1. Calor úmido	18
2.3.2. Óxido de etileno	24
2.3.3. Radiações ionizantes	26
2.3. CICLAGEM DE pH	30
2.4. MICRODUREZA COMO MÉTODO DE AVALIAÇÃO	35
3. MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	41
3.1.1. Aspectos éticos	43
3.2. FASE I	44
3.2.1. Análise da carga microbiana dos dentes	45
3.2.1.1. Obtenção e preparo dos dentes	45
3.2.1.2. Obtenção, homogeneização e diluição da suspensão bacteriana	46
3.2.1.3. Semeadura do material	47
3.2.1.4. Contagem das ufc's	48
3.2.2. Cálculo da dose de radiação gama	51
3.3. FASE II	53
3.3.1. Irradiação dos espécimes com radiação gama	53
3.3.1.1. Obtenção e irradiação das metades dentais	53
3.3.2. Confeção dos blocos dentais	54
3.3.3. Análise de microdureza de superfície do esmalte	56

3.4. FASE III	58
3.4.1. Preparo dos blocos para a ciclagem de pH	58
3.4.2. Ciclagem de pH	60
3.4.3. Preparo dos blocos para análise de microdureza em corte longitudinal	62
3.4.4. Análise de microdureza em corte longitudinal	64
3.4.5. Determinação da perda mineral	65
3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	67
3.5.1. Fase II	67
3.5.2. Fase III	67
4. RESULTADOS	69
4.1. FASE I	69
4.1.1. Carga microbiana	69
4.2. FASE II	71
4.2.1. Coloração da estrutura dental	71
4.2.2. Microdureza de superfície	73
4.3. FASE III	75
4.3.1. Microdureza do esmalte seccionado longitudinalmente	75
5. DISCUSSÃO	79
5.1. FASE I	79
5.2. FASE II	75
5.3. FASE III	87
6. CONCLUSÃO	91
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93
ANEXOS	105

RESUMO

A radiação gama é letal para microrganismos e parece não causar mudanças morfológicas na superfície do esmalte, sendo uma alternativa para a esterilização dental. No entanto, os dados da literatura não são conclusivos em estabelecer uma dose mínima de radiação gama eficaz para esterilização de dentes humanos armazenados em solução salina fisiológica, já que nas pesquisas que sugerem esta dose não foi executado o processo de validação da eficácia esterilizante da referida dose. Por conseguinte, o presente trabalho se propôs, através de um estudo *in vitro*, a determinar a carga bacteriana de dentes armazenados em solução salina para posterior escolha da dose de radiação gama capaz de esterilizá-los. Este trabalho objetivou também, analisar o efeito da dose de 25 kGy sobre a microdureza de superfície e resistência do esmalte dental humano ao desenvolvimento de cárie *in vitro* quando submetido a um modelo de ciclagem de desmineralização-remineralização. O estudo consistiu de três fases. Na primeira, foi determinada a carga microbiana em 20 terceiros molares procedentes de três clínicas diferentes e estocados em solução salina estéril. Na segunda fase, 30 metades dentais foram irradiadas, com a dose hospitalar (25 kGy) e outras 30 foram reservadas como controle. Após a irradiação, o grupo irradiado bem como o controle tiveram sua microdureza de superfície mensurada. Na terceira fase, o efeito da radiação gama foi determinado em blocos de esmalte dental planejados e não planejados após os mesmos terem sido submetidos a um modelo de ciclagem de pH. A partir dos valores de microdureza em corte longitudinal do esmalte, foi calculada a perda

mineral para cada grupo. Os dados das fases I, II e III foram analisados respectivamente pelos testes ANOVA, t de Student e por ANOVA e teste de Tukey (nível de significância de 5%). Os resultados mostraram médias de contaminação bacteriana de $5,60 \times 10^6 \pm 3,10 \times 10^6_a$ para a clínica A; $6,70 \times 10^6 \pm 1,48 \times 10^6_a$ para a clínica B e $5,74 \times 10^6 \pm 2,08 \times 10^6_a$ para a C. A média de unidades formadoras de colônia por unidade dentária foi de $5,8 \times 10^6$. As médias de dureza de superfície dos grupos controle e irradiado foram respectivamente, $338,35 \pm 20,11_a$ e $340,76 \pm 21,68_a$. As perdas minerais mensuradas nos grupos: não planificado controle; não planificado irradiado; planificado controle e planificado irradiado, foram $547,9 \pm 135,9_a$; $425,0 \pm 171,9_a$; $909,5 \pm 405,5_b$ e $1106,5 \pm 343,3_b$ respectivamente. Estes resultados demonstraram que dentes humanos armazenados em solução salina apresentam uma alta carga bacteriana exigindo para sua esterilização uma dose de radiação gama igual ou superior a dose de 25 kGy. Adicionalmente, tal dose alterou a coloração da estrutura dental porém, não interferiu na microdureza de superfície e nem na resistência à produção de cárie *in vitro* do esmalte dental humano.

ABSTRACT

The gamma radiation is lethal for microorganisms and seems not to cause morphologic changes in the enamel's surface, being an alternative for the dental sterilization. However, the data of the literature are not conclusive in establishing an effective minimum dose for sterilization of human teeth stored in physiologic saline solution, since the sterilizing efficacy of this dose has not been validated. Consequently, the purpose of this study was, firstly, to perform an *in vitro* study to determine the bioburden of teeth stored in saline solution for subsequent choice of gamma radiation minimum dose able to sterilize human unerupted third molars stored in 0,9% NaCl solution. Secondly, analyze the effect of a 25 kGy dose on human dental enamel microhardness, and thirdly, analyze the resistance of irradiated enamel to the development of *in vitro* caries-like lesion when submitted the a pH-cycling model. The study was divided into three phases. In the first one, the bioburden was determined in twenty third molars stored in sterile saline solution. In the second phase, thirty dental halves were irradiated with a hospital dose (25 kGy) and the other 30 halves were reserved as control. After irradiation, the irradiated as well as the control group were submitted to microhardness analysis to determine the enamel surface microhardness. In the third phase, the effect of gamma irradiation was determined in abraded and unabraded human dental enamel blocks after being submitted to a pH-cycling model. Mineral loss values were calculated from cross-sectional microhardness. The data of phases I, II and III were analysed respectively by ANOVA, t Student test, and by ANOVA and Tukey's test (at 5% level of significance). The results showed that bioburden means was $5,60 \times 10^6 \pm 3,10 \times$

10^6_a for clinic A; $6,70 \times 10^6 \pm 1,48 \times 10^6_a$ for clinic B and $5,74 \times 10^6 \pm 2,08 \times 10^6_a$ for clinic C. The mean of units forming colony for teeth unit was $5,8 \times 10^6$. The means of surface enamel microhardness for the groups control and irradiated were respectively, $338,35 \pm 20,11_a$ and $340,76 \pm 21,68_a$. The mineral losses measured in the groups: unabrased control; unabrased irradiated; abrased control and abrased irradiated were $547,9 \pm 135,9_a$; $425,0 \pm 171,9_a$; $909,5 \pm 405,5_b$ and $1106,5 \pm 343,3_b$ respectively. These results demonstrated that human teeth stored in saline solution presented a high bioburden demanding a dose equal or higher than 25 kGy for their sterilization. In addition, this dose changed the teeth coloration, however, had no effect on the enamel surface microhardness, neither on enamel resistance to the development of *in vitro* caries-like lesion.

1. INTRODUÇÃO

A preocupação sobre a transmissão das doenças tem sido divulgada há milhares de anos. Instruções sobre “controle de doenças” são encontradas até mesmo na Bíblia. No entanto, o campo de estudos da assepsia e da esterilização cresceu consideravelmente nos últimos 100 anos com a descoberta de numerosos agentes físicos e químicos e outras técnicas desenvolvidas para prevenção da transmissão de organismos infectantes. O principal impulso no interesse corrente sobre assepsia tem sido a preocupação com a hepatite B, no início dos anos 70, e AIDS, iniciando-se nos anos 80. Este interesse advém do fato de que tais doenças, consideradas graves, podem ser transmitidas durante práticas médicas e odontológicas. Através do “controle microbiano” infecções sérias e até mesmo a morte podem ser evitadas (RATHBUN, 1997).

Algumas fontes potenciais de infecção tais como saliva, sangue e exsudatos inflamatórios estão presentes no consultório odontológico e, conseqüentemente, podem estar presentes em dentes extraídos e armazenados. Tais fontes podem causar contaminação das mãos, instrumentos ou outros materiais utilizados no laboratório possibilitando assim que haja transmissão de microrganismos a pesquisadores e alunos que manuseiam dentes estocados. Freqüentemente, tais dentes têm sua origem desconhecida; por conseguinte, os usuários não estão conscientes da contaminação dos mesmos com bactérias, esporos e vírus.

Procedimentos de esterilização podem parecer excessivos, uma vez que não são relatados casos na literatura de incidentes envolvendo contaminação com dentes humanos extraídos. No entanto, turbinas de alta rotação e peças de mão, utilizadas para instrumentação dentária, criam aerossóis que podem conter microrganismos capazes de causar infecções oculares, respiratórias e outros tipos de infecções (BELTING *et al.*, 1964; MILLER *et al.*, 1978). As condições existentes durante a geração de aerossóis em procedimentos laboratoriais com dentes não são as mesmas que as encontradas durante o tratamento de pacientes. Assim, enquanto preparos cavitários em pacientes são usualmente realizados com a utilização de turbinas com spray de água, nos laboratórios pré-clínicos, esses preparos podem ser realizados sem a presença de água. Segundo BELTING *et al.* (1964), aproximadamente duas vezes mais microrganismos são encontrados em aerossóis produzidos em técnicas que não utilizam refrigeração a água. Adicionalmente, um estudo de PAGNIANO *et al.* (1985) demonstrou que bactérias e fungos potencialmente patogênicos puderam ser recuperados após uma técnica laboratorial com dentes extraídos.

O Centro de Controle de Doenças dos Estados Unidos (CDC) recomenda que dentes extraídos usados para propósitos de educação e pesquisa sejam desinfetados com hipoclorito de sódio ou qualquer outro líquido germicida (TORO' *et al.*, 2000). No entanto, alguns trabalhos relatam que o hipoclorito pode aumentar a porosidade do esmalte humano por desproteínização (ROBINSON *et al.*, 1990; BITTER, 1992) e afetar negativamente a estrutura dentinária, removendo ou transformando sua matriz proteica (BARBOSA *et al.*, 1994; INABA *et al.*, 1995).

Para um ótimo controle de infecção, a esterilização seria mais aceitável que uma simples desinfecção dental. Contudo, os métodos de esterilização propostos podem afetar a estrutura dos tecidos duros dentais. A Associação Dental Americana (ADA) e o CDC sugerem a autoclavação como o melhor método de descontaminação para materiais expostos a fluidos corporais. Entretanto, seu uso com dentes extraídos apresenta algumas limitações devido ao fato de os dentes estarem sempre grosseiramente contaminados, o que dificulta sua esterilização (PANTERA & SCHUSTER, 1990). Além disso, os dentes podem ser danificados ou alterados pelo processo de esterilização em autoclave (CHANDLER, 1990; WHITE *et al.*, 1994; PARSELL *et al.*, 1998). O método de esterilização não deve afetar a integridade estrutural do dente; caso isto aconteça, podemos invalidar as comparações de trabalhos científicos que tenham feito uso de substratos dentais submetidos a técnicas diferentes de esterilização.

Outro meio de esterilização considerado efetivo é o uso do óxido de etileno. REEVES *et al.* (1994) atestaram que dentes extraídos tratados com óxido de etileno tornaram-se livres de forma vegetativa de bactéria. No entanto, WHITE & HAYS (1995) demonstraram a ineficácia deste gás contra o esporo *Bacillus subtilis* - um indicador biológico usado para avaliar a esterilização pelo óxido de etileno - quando estes foram colocados na câmara pulpar de molares humanos extraídos. O baixo poder de penetração deste gás e os longos períodos requeridos para esterilização, também levaram vários pesquisadores a testarem outros métodos alternativos.

A radiação gama oriunda de uma fonte de cobalto 60 é letal para todas as formas de vida (HOUSE *et al.*, 1990) e não causa mudanças morfológicas na superfície do esmalte (JANSMA *et al.*, 1988; CHANDLER, 1990; AMAECHI *et al.*, 1998). Este método pode alterar a cor do esmalte e sua resistência à desmineralização por ácido. Entretanto, estes efeitos parecem ser dose-dependentes (AMAECHI *et al.*, 1999b) e só foram testados em modelos estáticos de produção de cárie *in vitro*, que em muito diferem das condições físico-químicas que ocorrem em ambiente bucal quando do desenvolvimento de lesões de cárie. Outro fator a ser considerado é que nos estudos onde foi verificada a eficácia da esterilização, em nenhum momento houve preocupação em se assegurar a confiabilidade e reprodutibilidade do método, o que só seria conseguido com a determinação da contaminação inicial do produto e, baseando-se nesta contaminação, verificar-se se os parâmetros utilizados no método são capazes de reduzir a população microbiana a um nível aceitável e seguro.

Dessa maneira, em virtude da falta informações literárias sobre a contaminação bacteriana de dentes humanos e da falta de estudos que apontem a dose de radiação gama eficaz na esterilização de dentes armazenadas em soluções sem a adição de antimicrobianos, o presente trabalho se propôs a determinar, através de um estudo *in vitro*, a carga bacteriana terceiros molares humanos retidos armazenados em solução salina, podendo assim, escolher a dose de radiação gama capaz de esterilizá-los. Adicionalmente, a literatura não é conclusiva no que se refere aos efeitos da dose de 25 kGy sobre a estrutura adamantina e sobre a resistência do esmalte humano à produção de cárie *in vitro* em situações dinâmicas de desafio cariogênico. Por conseguinte, esta pesquisa também

objetivou verificar o efeito de tal dose de radiação sobre a microdureza de superfície do esmalte dental humano, bem como, analisar a resistência do esmalte irradiado ao desenvolvimento de cárie *in vitro* quando este foi submetido a um modelo de ciclagem de desmineralização-rem mineralização.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Neste capítulo são apresentados os trabalhos pertinentes a este estudo. A revisão da literatura foi subdividida em: 1 – Cultivo e crescimento de microrganismos; 2 - Controle microbiano; 3 – Métodos de esterilização usados em pesquisas com substratos dentais; 4- Ciclagem de pH e 5 – Microdureza como método de avaliação de desmineralização e remineralização dental.

2.1. CULTIVO E CRESCIMENTO DE MICRORGANISMOS

O crescimento microbiano é um somatório dos processos metabólicos progressivos, que normalmente conduz à divisão com concomitante produção de duas células-filha a partir de uma única. Ao contrário dos microrganismos multicelulares, onde o crescimento é usualmente muito fácil de ser discernido, o crescimento individual de uma bactéria requer observações cuidadosas, uma vez que o processo pode ser comparativamente rápido e as condições necessárias para a medida podem interferir no crescimento (ALTERTHUM & CARVALHAL, 1999).

De todos os organismos vivos, os microrganismos são os mais versáteis e diversificados em suas exigências nutricionais. Alguns microrganismos podem crescer com algumas poucas substâncias inorgânicas, enquanto outros se assemelham aos organismos superiores na sua necessidade de compostos orgânicos complexos (PELCZAR JÚNIOR *et al.*, 1996).

O cultivo de microrganismos requer meios de cultura apropriados, pois alguns deles apresentam exigências nutricionais complexas e muitas vezes indefinidas. Quando células microbianas são semeadas em um meio de cultura apropriado e incubados em condições ótimas para o crescimento, um grande aumento de células ocorre em um período relativamente curto. Em algumas espécies bacterianas, a população máxima é atingida em 24 horas, mas a maioria das espécies requer um tempo maior de incubação para atingir o crescimento máximo (PELCZAR JÚNIOR *et al.*, 1996).

Além da oferta de nutrientes, outros fatores influenciam o crescimento microbiano tais como, temperatura, pH e atmosfera gasosa (PELCZAR JÚNIOR *et al.*, 1996; ALTERTHUM & CARVALHAL, 1999). O pesquisador deve conhecer e satisfazer as necessidades específicas dos microrganismos para o crescimento.

- Temperatura

Todos os processos de crescimento microbiano são dependentes de reações químicas que são afetadas pela temperatura. Os diferentes microrganismos apresentam diferentes temperaturas ótimas de crescimento, onde suas enzimas estão na forma mais ativa, pois o crescimento é o resultado de uma série de reações enzimáticas (PELCZAR JÚNIOR *et al.*, 1996; ALTERTHUM & CARVALHAL, 1999). A temperatura ótima para uma espécie microbiana é a mais próxima do limite superior da variação de temperatura na qual o microrganismo cresce, porque a velocidade das reações aumenta com o

acréscimo da temperatura, porém no ponto em que as enzimas são danificadas pelo calor as células param de crescer (PELCZAR JÚNIOR *et al.*, 1996).

- pH

O pH do meio é um fator muito importante para a atividade enzimática. De uma maneira geral, o pH neutro é requerido para um melhor desenvolvimento da cultura. Porém, dentro de certos limites, uma alteração de pH não afeta consideravelmente o tempo de geração. A membrana bacteriana apresenta um mecanismo muito eficiente para a entrada de íons na célula. Entretanto, acredita-se que à medida que o pH se afasta da neutralidade, os íons presentes no meio alteram as proteínas impedindo a penetração adequada de nutrientes (ALTERTHUM & CARVALHAL, 1999).

- Atmosfera gasosa

O cultivo de células microbianas em laboratório exige gás atmosférico apropriado, alguns gases são utilizados no metabolismo celular, outros podem ser tóxicos às células. Os microrganismos que normalmente requerem oxigênio para seu metabolismo são denominados aeróbios, os que crescem na presença do ar atmosférico e em anaerobiose são os facultativos e os que não utilizam o oxigênio para as reações de produção de energia, e são até mortos por este elemento, são os anaeróbios (PELCZAR JÚNIOR *et al.*, 1996).

2.2. CONTROLE MICROBIANO

O manuseio efetivo de microrganismos nos laboratórios, hospitais, clínicas e nas indústrias depende essencialmente de como controlá-los em seu meio. O campo da assepsia e da esterilização cresceu consideravelmente nos últimos 100 anos com a descoberta de numerosos agentes físicos e químicos, como altas temperaturas, radiações e produtos químicos, os quais podem ser utilizados para a prevenção da transmissão de microrganismos infectantes, evitando assim, a exposição das comunidades a riscos de contaminação microbiana. A escolha do melhor agente é dependente do objetivo almejado, ou seja, se é desejado destruir ou remover todos os microrganismos presentes, destruir somente certos tipos de microrganismos ou simplesmente prevenir a multiplicação daqueles já presentes (PELCZAR JÚNIOR *et al.*, 1996). Na definição dos objetivos é importante o conhecimento da terminologia empregada no controle do crescimento microbiano, exposta no QUADRO 1.

Quadro 1. Definições e comentários sobre a terminologia relacionada ao controle do crescimento microbiano.

Termo	Definições e comentários
Esterilização	Processo de destruição e ou remoção de todas as formas de vida viáveis de um objeto ou material.
Desinfecção	Destruição de agentes patogênicos pela aplicação direta de métodos físicos e químicos. Reduzem ou inibem o crescimento mas não necessariamente esterilizam.
Anti-sepsia	Caso particular de desinfecção realizada em tecidos vivos.
Assepsia	Ausência de microrganismos em uma área pela utilização de técnicas assépticas. Prevenção do contato com patógenos.

FONTE - Adaptado de RATHBUN, 1997. p. 348.

Utilizando-se a metodologia recomendada pela ADA para a esterilização, todos os instrumentos que entram em contato com saliva ou sangue devem ser esterilizados, antes da estocagem ou de uso subsequente. A partir de 1974 e desde 1985, com a epidemia da AIDS, a padronização dos cuidados na prevenção de infecções nos Estados Unidos tem sido mais voltada para a esterilização, do que para a desinfecção (RATHBUN, 1997).

Antes de discorrer sobre os métodos físicos e químicos de controle microbiano é importante definir termos relacionados a este tópico. Para tanto, serão tecidos comentários sobre alguns aspectos fundamentais que, segundo PELCZAR JÚNIOR *et al.* (1996), se aplicam às duas classes de agentes: 1- padrão de morte da população microbiana após exposição a um agente antimicrobiano; 2- condições que influenciam a eficiência de um agente antimicrobiano e 3- a forma como as células microbianas podem ser lesadas por um agente antimicrobiano.

1- Cinética de morte da população microbiana

Do ponto de vista microbiológico, os microrganismos são considerados mortos quando perdem de forma irreversível, a capacidade de reprodução. Para avaliar a eficiência de um agente antimicrobiano, uma amostra do material tratado é cultivada para determinar o número de sobreviventes, isto é, aqueles que podem crescer e se multiplicar. Os microrganismos ao entrarem em contato com tais agentes não são mortos instantaneamente, eles morrem em uma relação constante em um determinado período de tempo. Esta cinética de morte é denominada “morte exponencial”. Por exemplo, se uma população inicial de 1 milhão de bactérias for submetida a um método de esterilização e após 1 minuto for feita uma nova contagem de viáveis e encontrarmos 100 mil, no minuto seguinte uma amostra revelará a presença de 10 mil vivas e assim sucessivamente até os seis minutos, quando teremos a probabilidade de não mais encontrar microrganismos vivos. A partir deste momento, prosseguindo as contagens minuto a minuto, o que detectaremos é somente uma probabilidade cada vez menor, de encontrarmos microrganismos vivos. Do ponto de vista prático, um material será considerado estéril quando trabalharmos na faixa de probabilidade de $1/10^6$ (nível de esterilização aceito mundialmente), ou seja, submetendo-se a amostra ao mesmo processo de esterilização em iguais condições por 12 minutos, a probabilidade de encontrar um microrganismo vivo é de 1 em um milhão.

2- Condições que influenciam a atividade antimicrobiana

- Tamanho da população microbiana:

As considerações feitas anteriormente nos mostram que quanto maior o número inicial de microrganismos presentes, maior será o tempo necessário para a esterilização.

- Intensidade ou concentração do agente:

Quanto menor a intensidade ou concentração do agente, maior será o tempo de esterilização necessário.

- Tempo de exposição:

Quanto maior o tempo de exposição, maior será o número de células mortas.

- Características dos microrganismos presentes:

Os microrganismos variam consideravelmente na resistência a agentes físicos e químicos.

3- Mecanismos de destruição das células microbianas

Os agentes antimicrobianos inibem ou matam os microrganismos pela destruição de certas estruturas celulares, como a parede celular ou a membrana citoplasmática, ou ainda pela inativação ou destruição de substâncias presentes no citoplasma, como enzimas, ribossomos ou material do núcleo celular.

O conhecimento dos métodos de esterilização e do mecanismo de ação de um agente antimicrobiano é de grande valor para tomar decisões de aplicações práticas e ainda, para auxiliar estudantes e profissionais a executarem procedimentos seguros, eficientes e

com respaldo deontológico. Adicionalmente, é importante que se conheçam as possíveis alterações ocasionadas nos substratos dentais pela utilização de qualquer um dos processos de esterilização. A falta de atenção a este fato, pode culminar em interpretação errônea de resultados obtidos em pesquisas utilizando tais substratos esterilizados.

2.3. MÉTODOS DE ESTERILIZAÇÃO USADOS EM PESQUISAS COM SUBSTRATOS DENTAIS

2.3.1. Calor úmido

A temperatura elevada é um dos métodos de maior eficiência e um dos mais utilizados na destruição de microrganismos. O calor pode ser aplicado tanto em condições úmidas quanto secas, sendo o calor úmido muito mais eficiente para a esterilização. Isto ocorre porque o vapor sob pressão causa desnaturação e coagulação de proteínas vitais como as enzimas, enquanto que o calor seco causa oxidação dos constituintes orgânicos da célula. O aparelho destinado a esterilizar com vapor sob pressão é denominado autoclave. As autoclaves operam pelo mesmo princípio das panelas de pressão, porém a temperatura e a pressão interna na autoclave podem ser melhor controladas (RATHBUN, 1997; PELCZAR JÚNIOR *et al.*, 1996).

Parâmetros- Usualmente uma autoclave opera com uma pressão de 15 psi, na qual a temperatura do vapor é 121°C (250°F), por 15 minutos ou a 30 psi, alcançando uma temperatura de 132°C (270°F) por 3 a 7 minutos para instrumentos não embalados. É

importante ressaltar que grandes volumes requerem um tempo extra para que a temperatura desejada seja atingida no seu interior (RATHBUN, 1997; PELCZAR JÚNIOR *et al.*, 1996; ALTERTHUM & CARVALHAL, 1999).

A esterilização de dentes empregando autoclaves tem sido usada por diversos autores (HORSTED *et al.*, 1980; ADELSON *et al.*, 1980; ASSAD *et al.*, 1987; ESTRELA *et al.*, 1999) em trabalhos com objetivos distintos, nos quais nem sua efetividade nem seu efeito sobre a estrutura dental foram testados. A constatação de PAGNIANO *et al.* em 1985, de que aerossóis produzidos pela manipulação de dentes extraídos podem conter microrganismos potencialmente patogênicos levou pesquisadores a explorarem os efeitos da desinfecção e esterilização sobre as estruturas dentais.

O trabalho de SHAFFER *et al.* (1985) foi o pioneiro em analisar o efeito da utilização da autoclave na esterilização de dentes humanos extraídos. Os autores compararam 3 métodos de desinfecção/esterilização: estocagem em glutaraldeído a 2% por 24 horas; em hipoclorito de sódio a 1% pelo mesmo período e autoclavação por 20 minutos a 260°F (\cong 126°C). Os espécimes foram analisados por microscopia eletrônica de varredura e testes de resistência adesiva. As análises não mostraram diferenças entre grupo controle e experimentais para nenhum dos testes. Não foi realizada nenhuma análise microbiológica.

CHANDLER em 1990 realizou um experimento no qual a autoclavação foi comparada à irradiação com raios gama e à aplicação de óxido de etileno na esterilização de blocos de esmalte bovino. Os parâmetros usados foram: temperatura de 132°C por 5 minutos seguidos por 10 minutos de secagem com ar em pressão sub-atmosférica. A

microdureza de superfície foi analisada antes e depois dos processos de esterilização e mudanças morfológicas na superfície do esmalte foram analisadas por microscopia ótica e de varredura. Nenhuma diferença foi encontrada na morfologia do esmalte entre grupos experimentais e controle. Entretanto, o autor constatou que a microdureza de superfície foi diminuída com o processo de esterilização com autoclave.

Em 1988 e 1886 a ADA e o CDC, respectivamente, sugeriram a autoclavação como melhor método de descontaminação para materiais expostos a fluidos corporais. Considerando esta recomendação e o fato de que, até então, nenhum teste de esterilidade tinha sido realizado em dentes autoclavados, PANTERA & SCHUSTER (1990) testaram a eficácia deste método. Os dentes foram divididos em 5 grupos que usavam para esterilização/desinfecção: estocagem em Rocall II a 10% (10% de alquil dimetil benzil cloreto de amônia, 1,25% de álcool etílico e 88,5% de água) por 3 semanas; estocagem em Rocall II a 10% por 24 horas; imersão em NaOCl a 25% por 5 minutos; autoclavação em solução salina estéril por 20 minutos, 121°C, 15 psi e autoclavação em sacos plásticos autoclaváveis pelo mesmo tempo e nas mesmas condições de temperatura e pressão. Na realidade, os autores utilizaram, no último grupo, uma esterilização a seco em um aparelho que esteriliza com calor úmido. O teste de esterilidade foi realizado com a coleta de material pulpar com instrumentos esterilizados e incubação em caldo de *Brain Heart Infusion* – BHI por 10 dias. Houve crescimento bacteriano em todos os grupos, embora nos grupos que utilizaram a autoclave o crescimento ocorreu em apenas um dos espécimes. Em uma segunda etapa, os espécimes foram acondicionados juntos e submetidos a uma nova autoclavação por um período de 40 minutos. Feita uma nova análise, não houve mais

crescimento bacteriano. Os autores concluíram ser necessário um tempo de 40 minutos para que a esterilização de dentes armazenados em solução salina, em autoclave, fosse efetiva.

Em 1991, TATE & WHITE testando soluções desinfetantes, autoclavaram os dentes do grupo controle negativo usando os parâmetros usuais. Não foi observado crescimento bacteriano algum, em 100% dos espécimes testados. O meio para verificação da presença bacteriana foi o tioglicolato e a turbidimetria foi verificada 24 e 48 horas após a incubação. É válido ressaltar, que o tempo de 24 horas é o tempo mínimo requerido por uma célula microbiana para que esta se recupere de um stress anterior. A FARMACOPÉIA BRASILEIRA recomenda a incubação em meio tioglicolato por pelo menos 7 dias para verificação de esterilidade.

PASHLEY *et al.* (1993) indicaram que a esterilização de dentes através de óxido de etileno ou autoclave não resultou em alterações intrínsecas na dentina ou na força de adesão da mesma a 2 sistemas adesivos. A autoclavação foi executada por 30 minutos a 121°C e 15 psi. Apesar de não ter sido verificada a esterilização, os autores sugeriram que qualquer um destes processos poderia ser apropriado para salvaguardar pesquisadores usuários de dentes extraídos.

Já WHITE *et al.* (1994), usando os mesmos parâmetros do estudo anterior, fizeram uma avaliação comparativa dos efeitos de 4 métodos de esterilização sobre discos de dentina. Foram verificadas a composição mineral, pela técnica de espectroscopia infravermelha de Fourier (FTIR), e as propriedades óticas dos espécimes. A autoclavação, o óxido de etileno e o calor seco promoveram alterações significativas nos parâmetros

analisados, indicando mudanças estruturais na dentina. Este trabalho tinha como objetivo principal testar a eficácia da radiação gama na esterilização dental, por conseguinte, testes microbiológicos foram realizados para a radiação gama (em diferentes doses) e, a autoclavação foi usada como método de esterilização do grupo controle negativo. Para o teste de esterilidade, os espécimes foram preparados com raízes de dentes humanos que foram contaminadas com *Bacillus subtilis* - microrganismo padrão usado como monitor em processos de esterilização com óxido de etileno. Os microrganismos foram inoculados dentro do canal radicular dos espécimes e estes foram submetidos à esterilização, acondicionados em recipientes contendo caldo BHI com 0,01% de fenol vermelho (indicador de crescimento). Depois disso, os espécimes foram incubados por 72 horas para promover crescimento bacteriano. Os espécimes nos quais o BHI mudou de cor (de vermelho para amarelo) foram considerados positivos. Adicionalmente, foram inoculadas, em placas de BHI ágar, amostras do caldo de cultura no qual os dentes tinham sido imersos e da suspensão bacteriana acondicionada dentro das raízes dentais. Nenhum resultado positivo foi obtido com os dentes autoclavados.

Em condições diferentes de esterilização (260°F, 20 minutos e 20 psi), PARSELL *et al.* (1998) avaliaram o efeito da autoclavação sobre a microdureza de superfície do esmalte e dentina, bem como sobre a resistência do dente ao desgaste, avaliada clinicamente. A avaliação clínica, realizada por 4 examinadores executando preparos cavitários, não detectou diferenças entre grupo controle e experimental, no entanto, a microdureza da dentina diminuiu significativamente no grupo de dentes autoclavados.

Em 1998, AMAECHI *et al.* analisaram o comportamento do esmalte bovino submetido a diferentes processos de esterilização, frente a um desafio cariogênico estático (produção de lesão artificial de cárie com tampão acetato). A eficácia dos métodos também foi avaliada. Foram analisados os parâmetros de profundidade de lesão, por microrradiografia e microscopia de luz polarizada, e porcentagem de perda mineral por microrradiografia. Embora não tenha havido diferenças estatisticamente significantes entre grupos experimentais e grupo controle, os maiores valores numéricos de porcentagem de perda mineral foram encontrados para o grupo de dentes autoclavados. Os parâmetros utilizados foram os mesmos usados por CHANDLER em 1990, com diminuição da temperatura para 121°C. O meio BHI foi empregado para verificação de crescimento bacteriano tendo apresentado resultados positivos apenas para o grupo controle.

No ano seguinte, os mesmos autores realizaram um experimento muito similar, porém, os dentes sofriam desmineralização e posteriormente eram divididos, indo uma metade para um grupo experimental e a outra era reservada como controle, então, eram esterilizados. Desta vez, os maiores valores de perda mineral foram encontrados para o grupo de dentes autoclavados que diferiram significativamente do controle. Neste trabalho, o exame microbiológico foi realizado com a incubação dos inóculos também em anaerobiose. Os resultados do teste de esterilidade não mudaram em relação ao estudo anterior.

Verificando o efeito dose-resposta ao flúor de lesões artificiais de esmalte esterilizadas, TORO *et al.* (2000) observaram que dentes cariados esterilizados por calor úmido não apresentaram o efeito dose-resposta ao flúor quando submetidos a um modelo

de ciclagem de pH com 4 exposições diárias a dentifrícios fluoretados com 250 ou 1100 ppm F. Outros parâmetros analisados como flúor incorporado à lesão, profundidade de lesão e mudanças no conteúdo mineral não apresentaram diferenças estatísticas entre os métodos.

O efeito da autoclavação sobre a dentina com lesão de cárie foi analisado por CLARKE *et al.* em 2000. Foram feitos testes microbiológicos usando meio ágar sangue e ágar neutralização. A profundidade da lesão de cárie e a porcentagem de perda mineral foram mensuradas por microrradiografia transversa, antes e depois da esterilização. Não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e experimentais em nenhum dos parâmetros analisados. Os autores concluíram que o método foi efetivo na esterilização da dentina e não afetou a integridade estrutural da mesma.

2.3.2. Óxido de etileno

O óxido de etileno é um esterilizante químico que em temperaturas superiores a 10,8°C apresenta-se na forma gasosa. É tóxico para todas as bactérias, vírus, fungos e esporos. O gás inativa enzimas e outras proteínas que têm átomos de hidrogênio lábeis, como em grupos sulfidrilas. Seus vapores são altamente irritantes para pele e mucosas e é inflamável mesmo em baixas concentrações. Outra característica importante e desejável do óxido de etileno é seu poder de penetração, podendo atravessar e esterilizar estruturas. Entretanto, uma de suas desvantagens é a baixa velocidade de ação, necessitando de várias horas de ação para ser eficiente (RATHBUN, 1997; PELCZAR JÚNIOR *et al.*, 1996; ALTERTHUM & CARVALHAL, 1999).

Parâmetros- O aquecimento a 120°F (50°C) faz com que o tempo de esterilização fique em torno de 2 a 3 horas. À temperatura ambiente, este tempo aumenta para 12 horas. A aeração de materiais permeáveis, plásticos, borrachas e roupas requer de 12 a 24 horas (RATHBUN, 1997).

Desde 1974, o óxido de etileno tem sido empregado em estudos envolvendo substratos dentais (KOULOURIDES *et al.*, 1974; PEARCE & GALLAGHER, 1979; PEARCE, 1982; SCHÄFER, 1989; CORPRON *et al.*, 1992). Seu uso tem suscitado preocupações sobre seu potencial tóxico e de alguns de seus subprodutos. Efeitos colaterais tem sido reportados em funcionários de hospitais expostos a altos níveis de óxido de etileno por longos períodos (BRASHEAR *et al.*, 1996). Os efeitos da exposição a baixos níveis do gás são ainda contraditórios (SAILLENFAIT *et al.*, 1996), porém é sabido que níveis significantes de subprodutos tóxicos podem permanecer em materiais esterilizados por esta técnica (FERREL *et al.*, 1997; BUBEN *et al.*, 1999).

Apesar das visíveis dificuldades encontradas na sua utilização, muitas pesquisas já citadas demonstraram que o óxido de etileno é inerte para as estruturas dentais. O método parece não alterar algumas das propriedades físicas de substratos dentais como a microdureza de superfície do esmalte dental bovino (CHANDLER, 1990); permeabilidade dentinária e resistência adesiva da dentina a 2 sistemas adesivos (PASHLEY *et al.*, 1993).

Em contrapartida, WHITE *et al.* (1994) detectaram mudanças estruturais na dentina que se caracterizaram por perda de fosfato e redução na absorvância dentinária, após a utilização do óxido de etileno. Análises microbiológicas foram relatadas em apenas

um trabalho realizado por WHITE & HAYS em 1995, onde foram encontrados diferentes percentuais de desinfecção usando 2 parâmetros distintos de temperatura e tempo (30°C por 250 minutos seguidos de aeração por 24 horas e 63°C e aeração de 16 horas). Os dentes expostos ao gás continham, no interior da câmara pulpar, uma suspensão de *Bacillus subtilis*. Os resultados demonstraram que nenhum dos tratamentos foi capaz de esterilizar todos os dentes testados. Os testes microbiológicos foram realizados usando o meio tioglicolato e o meio caseína-soja, com um tempo de incubação após a inoculação, de 7 dias.

TORO *et al.* (2000) testando a autoclavagem, óxido de etileno e solução de formol, sugeriram o uso de óxido de etileno como método preferencial na esterilização de blocos de esmalte humano cariado a serem usados em testes de cariogenicidade intra-orais. Neste estudo, os autores não encontraram alterações nos padrões de perda mineral do esmalte cariado esterilizado quando submetido a um modelo de ciclagem de pH, bem como na sua reatividade ao flúor e na sua dose-resposta a dentifrícios fluoretados. A indicação dos autores sobre este método é justificada pelo fato de o formol ser apenas um desinfetante e pelo fato da autoclavagem ter promovido algumas alterações citadas no item anterior.

2.3.3. Radiações ionizantes

A radiação eletromagnética é a energia na forma de ondas eletromagnéticas transmitida através do espaço ou através de um material. A quantidade de energia de uma radiação é inversamente proporcional ao seu comprimento de onda, tendo uma alta energia os raios gama, raios-X e luz ultravioleta. Os dois primeiros são exemplos de radiações

eletromagnéticas ionizantes, por conseguinte, possuem energia suficiente para remover elétrons dos átomos quando passam através do material, tornando estes átomos eletricamente carregados ou ionizados (PELCZAR JÚNIOR *et al.*, 1996).

Os raios gama são radiações emitidas pelo núcleo excitado de elementos radioativos como o cobalto 60 (Co^{60}) e o césio 137 (Cs^{137}). A radiação gama apresenta um excelente poder de penetração, ao contrário dos raios ultravioletas e das partículas β .

A aplicação deste tipo de radiação é capaz de destruir microrganismos sem que haja um aumento apreciável na temperatura. Seu principal efeito antimicrobiano é a ionização (radiólise) da água formando radicais livres e peróxidos que reagem com componentes celulares orgânicos, dentre eles o DNA, matando ou inativando os microrganismos. A radiação também pode atuar diretamente nos constituintes celulares vitais matando a célula, pois em algumas circunstâncias a presença de íons no tecido pode interromper processos biológicos normais (ALTERTHUM & CARVALHAL, 1999; LANDGRAF, 1996).

Parâmetros- As doses de radiação ionizante absorvidas são expressas por uma unidade chamada Gray (Gy), que mede a quantidade de energia radioativa absorvida por unidade de massa. O Gray é definido em termos de quantidade de energia medida em joule, absorvida por quilograma do material: $1 \text{ Gy} = 1 \text{ J} \times \text{kg}^{-1}$. No Sistema Internacional de Unidades, o Gy substituiu a unidade RAD (Radiation Absorbed Doses) que é a quantidade de energia medida em ergs absorvida por grama de material: $1 \text{ rad} = 0,01 \text{ Gy}$ (LANDGRAF, 1996). A dose a ser utilizada é dependente da contaminação inicial do

produto, porém a dose de 25 kGy tem eficácia comprovada e é utilizada como referência para esterilização de materiais hospitalares. Um importante cálculo usado para as fontes de radiação gama é a correção da redução da radioatividade. A meia vida do Co^{60} é de 5 anos e a do Cs^{137} é de 37 anos, com o tempo, a diminuição na atividade radioativa é exponencial e são usadas fórmulas matemáticas para calcular a taxa de dose diária de cada aparelho.

Em 1969, JERVØE analisou o efeito da radiação gama sobre esmalte e dentina dentais. O autor acreditava que o aumento do número de lesões de cárie em pacientes fazendo radioterapia era decorrente do efeito direto da radiação na estrutura dental, causando desnaturação de componentes orgânicos. O trabalho foi realizado com esmalte e dentina pulverizados e submetidos a doses de 1 Mrad (10 kGy). A análise foi feita através de difração de raios-X e foram encontradas diferenças no tamanho dos cristais de esmalte e dentina irradiados. O autor então deduziu que estas mudanças diminuía a resistência do dente à dissolução por ácido.

A crença, ainda persistente, de que a radiação aumentava a susceptibilidade da estrutura dental à cárie levou WALKER (1975) a averiguar o efeito direto da radiação gama sobre a solubilidade do esmalte e da dentina em ácido láctico. Para tal, foram usados dentes humanos seccionados ao meio e irradiados com as doses de 3.500 e 5.000 rads (35 e 50 Gy). Todas as metades foram individualmente imersas em 3,0 mL de ácido láctico a 10% em pH 4,5 por 48 horas. Cada metade foi pesada em balança analítica antes e após a desmineralização e foi obtida uma média de perda de peso para cada grupo. Não houve diferença estatística nem entre doses, nem entre grupos irradiados e não irradiados.

Mais uma vez tentando achar uma explicação para a causa das chamadas “cáries de radiação”, JOYSTON-BECHAL (1985) e JANSMA *et al.* (1988) usando outro tipo de radiação ionizante, o raio-X, investigaram o efeito da radiação sobre a susceptibilidade do esmalte ao desenvolvimento de cárie artificial *in vitro*. A metodologia usada nos estudos foi semelhante a do estudo anterior, usando doses em torno de 70 Gy. Contrariando as expectativas, os resultados mostraram lesões de cárie menos profundas nos dentes irradiados, levando os autores a concluir que a radiação aumenta a resistência do esmalte dental à dissolução por ácido.

Em contrapartida, estudos já descritos como o de CHANDLER em 1990 e WHITE *et al.* em 1994 mostraram, respectivamente, que a irradiação de dentes com raios gama não alterou a estrutura do esmalte bovino e da dentina humana. No estudo realizado por WHITE a eficácia da esterilização por radiação gama foi testada pela primeira vez. Raízes de dentes humanos foram contaminadas com *Bacillus subtilis* e irradiadas com uma fonte de Cs¹³⁷. Foram testadas doses que variaram de 3,2 a 648 krad (6.480 Gy). A menor dose que não apresentou crescimento bacteriano foi a de 173 krad. Além disso, nenhuma alteração estrutural foi encontrada nos espécimes irradiados.

Em 1998 e 1999, AMAECHI *et al.* testaram novamente a eficácia da radiação gama na esterilização dental, utilizando dentes bovinos. A dose de radiação usada foi de 25 kGy. A radiação foi comparada com autoclavação, imersão em hipoclorito de sódio e imersão em povidine-iodine. Como já citado anteriormente, nenhum método promoveu crescimento bacteriano nos testes microbiológicos realizados. Foi observada alteração na coloração do esmalte nos dentes irradiados. Embora não houvesse diferença estatística, os

menores valores de porcentagem de perda mineral e profundidade de lesão de cárie (quando comparados com o controle) foram encontrados para os dentes irradiados.

Acreditando que as alterações na coloração e solubilidade do esmalte promovidas pela radiação gama são dependentes da dose utilizada, AMAECHI *et al.* (1999b) testaram doses de radiação que variaram de 2448 a 4896 Gy. Foi observada ausência de crescimento bacteriano e de alteração de cor a partir da dose de 4080 Gy. Todos os espécimes foram submetidos à desmineralização por ácido e a perda mineral foi mensurada através da técnica de microrradiografia. Mais uma vez não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos irradiados, bem como entre estes grupos experimentais e o grupo controle.

Em 2000, CLARKE *et al.* testaram a dose mínima eficaz sugerida por AMAECHI *et al.* (1999b) sobre espécimes de dentina desmineralizada. A dose não causou mudanças na integridade estrutural da dentina, porém foi observado crescimento bacteriano em um dos espécimes do grupo irradiado.

A compilação de dados literários relacionados às alterações ocorridas em substratos dentais provenientes de processos de esterilização permitiu a constatação da escassez de estudos realizados com modelos dinâmicos de ciclos de desmineralização-rem mineralização para verificação do comportamento de substratos dentais esterilizados. Tais ciclos ocorrem várias vezes durante um dia em cada indivíduo, e, o desenvolvimento das lesões de cárie dental depende da magnitude da interação destes eventos bioquímicos.

2.4. CICLAGEM DE pH

O desenvolvimento de uma lesão de cárie é um processo dinâmico que se caracteriza por períodos alternados de desmineralização e remineralização que ocorrem constantemente no ambiente bucal (CURY, 1992). Durante estes processos de desmineralização e remineralização, há um fluxo mineral nos tecidos duros dentais, refletindo em perda e ganho de componentes. O estudo do mecanismo destas trocas minerais entre meio e substrato dental (esmalte e dentina) pode ser executado através de experimentos *in vitro*, com animais, *in situ* e *in vivo* (WHITE, 1992).

Os modelos *in vitro* possuem grande relevância em pesquisas relacionadas à cárie dental, pois são capazes de simular efeitos cinéticos e termodinâmicos gerais durante a formação e reversão da lesão, com taxas absolutas mais rápidas que aquelas *in vivo*. Além disso, estes modelos permitem que as condições experimentais possam ser cuidadosamente controladas o que possibilita modificações diretas na sensibilidade do modelo. As vantagens obtidas com estes métodos altamente controlados não estão restritas a medidas empíricas, mas valem-se de mecanismos de avaliação de desmineralização e remineralização com habilidade de quantificar efeitos sobre uma simples variável, com outras variáveis mantidas constantes (WHITE, 1992).

Um dos mais consagrados métodos de avaliar o comportamento de substratos dentais sobre eventos de desmineralização e remineralização é denominado ciclagem de pH e foi originalmente proposto por TEN CATE & DUIJSTERS (1982). Esta metodologia pode ser delineada de modo a mimetizar uma situação mais próxima das condições clínicas,

nas quais sempre há um processo físico-químico dinâmico, com trocas minerais entre tecidos duros dentais e fluidos bucais. Este atributo do método diferencia-o de outros métodos de indução de lesão de cárie artificial (imersão em solução tampão de acetato ou lactato; imersão em meio de cultura de bactérias acidogênicas e contato com gel acidificado) cujo comportamento estático simula uma condição de ataque ácido bastante diferente do que ocorre no ambiente bucal (SERRA & CURY, 1992).

A ciclagem de pH emprega soluções desmineralizadoras e remineralizadoras, nas quais o substrato dental é imerso por períodos alternados de tempo, reproduzindo assim, os vários momentos de decréscimo de pH que ocorrem na placa dental e superfície do esmalte durante o dia. O estágio de desmineralização é simulado com o emprego de tampões ácidos contendo cálcio e fosfato em pH baixo, enquanto que a solução remineralizadora contém cálcio e fosfato em um grau de saturação que mimetiza as propriedades remineralizadoras da saliva. Diferentes protocolos têm sido empregados de acordo com o delineamento experimental, apresentando variações na composição e pH das soluções, tempo de imersão dos espécimes em cada solução, volume de solução por área dental exposta e duração da ciclagem.

O modelo pioneiro proposto por TEN CATE & DUIJSTERS (1982) utilizou dentes bovinos com lesão de cárie subsuperficial que foram imersos em soluções desmineralizadoras e remineralizadoras com concentrações de cálcio e fosfato próximas às encontradas na saliva. A solução remineralizadora constituía-se de 1,5 mM de cálcio, 0,9 mM de fósforo, 130 mM de KCl e 20 mM de tampão cacodilato. Por sua vez, a solução desmineralizadora era constituída por 2,2 mM de cálcio, 2,2 mM de fósforo e 50 mM de

ácido acético. O pH das soluções era respectivamente 4,7 e 7,0 e o tempo de imersão variava para grupos distintos, em 3 e 8 horas diárias. Foi adicionado flúor nas soluções usadas para alguns grupos. Os ciclos foram realizados em 10 dias consecutivos e os ganhos e as perdas minerais foram analisados pelas alterações nas concentrações de cálcio, fosfato e flúor nas soluções utilizadas.

Em 1986, FEATHERSTONE *et al.* modificaram o modelo proposto por TEN CATE & DUIJSTERS (1982). Um dos grandes méritos do trabalho de FEATHERSTONE foi desenvolver um modelo de ciclagem de pH com correlação clínica, possibilitando assim, pelo menos para produtos fluoretados, uma razoável predição de eficácia clínica. Esta correlação foi estabelecida com a utilização de resultados encontrados em experimentos *in vivo* no desenvolvimento de um modelo de ciclagem de desmineralização/remineralização que simula o que acontece no ambiente bucal em situações de alto desafio cariogênico em pacientes utilizando aparelho ortodôntico. Neste estudo, os espécimes de esmalte dental humano permaneciam 6 horas por dia na solução desmineralizadora (pH 4,3) e aproximadamente 17 horas na remineralizadora (pH 7,0). A solução remineralizadora tinha composição similar àquela utilizada por TEN CATE & DUIJSTERS (1982) e o volume de solução para cada dente foi de 20,0 mL. A solução desmineralizadora constituía-se de tampão acetato contendo 2,0 mmol/L de cálcio, 2,0 mmol/L de fosfato e 0,075 mol/L de ácido acético. Cada espécime foi imerso em 40 mL desta solução. O sistema de ciclagem foi repetido em 14 dias consecutivos, sendo que nos finais de semana os espécimes permaneceram na solução remineralizadora. A perda mineral foi mensurada por microdureza.

GERRARD & WINTER (1986) desenvolveram um modelo de ciclagem com maior frequência diária de desafio cariogênico e menor número de dias. A composição das soluções foi similar às anteriormente descritas, diferenciando-se no pH, 5,0 para a solução desmineralizadora e em torno de 6,5 para a remineralizadora. Os espécimes eram imersos na solução desmineralizadora por 5 minutos, 4 vezes ao dia, durante 2 dias.

Uma nova composição para a solução desmineralizadora foi proposta por FORSS & SEPPÄ em 1990. Esta solução constituiu-se de 0,1 M de ácido láctico tamponado por hidróxido de sódio e pH 5,0. Possivelmente, devido à diferença entre o pH obtido e o pK_a do ácido (3,7) utilizado a solução não se manteve por todo o tempo do experimento com o pH desejado. O volume de solução utilizado por espécime foi de 3,0 mL. Já para a solução remineralizadora, este volume foi de 1,2 mL. O tempo de imersão na solução desmineralizadora foi de 30 minutos por dia, os ciclos foram repetidos durante 9 dias.

DAMATO *et al.* (1990) descreveram um modelo de ciclagem no qual os espécimes permaneciam 3 horas por dia em solução desmineralizadora (pH 4,8) e 21 horas em solução remineralizadora (pH 6,85). A composição das soluções era similar à descrita por TEN CATE & DUIJSTERS (1982) e os ciclos foram repetidos durante 5 semanas.

Em 1991, FEATHERSTONE *et al.* realizaram um experimento com um menor desafio cariogênico, diminuindo para 5 o número de ciclos executados. Os tempos de imersão nas soluções desmineralizadora e remineralizadora, bem como, as condições de saturação e pH das soluções foram os mesmos usados por FEATHERSTONE *et al.* (1986).

O modelo proposto por GIBBS *et al.* (1995) apresentou como inovação a utilização de uma terceira solução denominada “tampão neutro”, na qual os espécimes permaneciam por um período de aproximadamente 15 horas diárias e durante os finais de semana. Esta solução era constituída por 20,0 mmol/L de cacodilato, 1,5 mmol/L de fosfato em pH 7,2. A condição remineralizante foi obtida com a utilização de uma solução contendo 1,5 mmol/L de cloreto de cálcio, 0,9 mmol/L de fosfato, 20,0 mmol/L de cacodilato e 130,0 mmol/L de cloreto de potássio. O pH era 7,3 e houve a adição de diferentes quantidades de flúor em alguns grupos. Os espécimes permaneciam por 30 minutos diários em solução desmineralizadora de composição similar à usada por FEATHERSTONE *et al.* (1986) porém com pH 5,0. Os ciclos foram repetidos por 14 dias consecutivos.

TEN CATE *et al.* (1995) usaram uma solução desmineralizadora com pH 4,8 e constituída por 1,5 mmol/L de cloreto de cálcio, 0,9 mmol de fosfato ácido de cálcio e 50,0 mmol/L de ácido acético. A solução remineralizadora (pH 7,0) tinha a mesma composição da desmineralizadora, excetuando-se o ácido acético e adicionando-se 20,0 mmol/L de tampão HEPES. Os espécimes foram imersos em solução desmineralizadora por 30 minutos seis vezes ao dia. As imersões em solução desmineralizadora eram distribuídas num período de 16 horas durante o dia. À noite, os espécimes ficavam imersos em solução remineralizadora. Os ciclos foram realizados em 2 períodos de 5 dias, intermediados por 2 dias nos quais os espécimes permaneciam em solução remineralizadora.

Em 1997, KAWASAKI & FEATHERSTONE descreveram um modelo de ciclagem realizado com dentina, no qual parte dos espécimes permanecia por 8 horas

diárias em solução desmineralizadora e 16 horas na remineralizadora. Os tempos foram invertidos para a outra parte dos espécimes. Os ciclos eram repetidos em 5 dias consecutivos.

SHINKAI *et al.* (2001) montaram um modelo de ciclagem, modificando o proposto por FEATHERSTONE *et al.* (1986) diminuindo o número de ciclos para 8 e aumentando para 7 horas o tempo de imersão dos espécimes em solução desmineralizadora. A solução desmineralizadora empregada foi descrita por WEFEL *et al.* (1994) constituindo-se de 2,2 mmol/L de cálcio, 2,2 mmol/L de fosfato, 0,05 M de ácido acético e 1 ppm de flúor, pH 4,5. As proporções solução/área exposta foram 6,25 mL/mm² para a solução desmineralizadora e 3,125 mL/L para a remineralizadora.

A possibilidade de se controlar variáveis justifica a quantidade de modelos de ciclagem já existentes, propiciando ao pesquisador adaptar modelos para responder as questões elaboradas na pesquisa.

2.5. MICRODUREZA COMO MÉTODO DE AVALIAÇÃO DE DESMINERALIZAÇÃO E REMINERALIZAÇÃO DENTAL

Uma grande quantidade de técnicas tem sido usada e especialmente desenvolvida para mensurar as mudanças ocorridas nos tecidos dentais, promovidas por processos de des e remineralização. Entre as técnicas, estão testes usados para quantificar mudanças nas propriedades físicas, como a microdureza; densidade e propriedades óticas,

como microrradiografia e microscopia de luz polarizada respectivamente; ou para medir alterações na composição química do substrato, como as análises químicas (FEATHERSTONE *et al.*, 1983). Estas são técnicas úteis para determinação da condição mineral de lesões bem iniciais (essencialmente lesão superficial, com aproximadamente 0-50 μm) e em outros casos, para lesões de 25-150 μm ou maior profundidade (FEATHERSTONE, 1992).

Em uma conferência sobre técnicas de avaliação de modelos intra-orais de desmineralização-rem mineralização (ARENDS & TEN BOSH, 1992; FEATHERSTONE, 1992), alguns parâmetros foram apontados para a mensuração de alterações minerais nos substratos dentais, são estes:

- Profundidade da lesão (d ou l_d)- corresponde à distância entre a superfície externa do tecido e o ponto onde o conteúdo mineral equivale a 95% do valor do tecido sadio.
- Perfil mineral- curva dos valores de porcentagem mineral em volume em função da profundidade abaixo da superfície externa. Mostra a distribuição mineral local.
- ΔZ (% de volume mineral x μm)- é o valor de perda mineral, obtido pela diferença da área integrada entre o perfil mineral da lesão e o perfil mineral do tecido dental hígido (ou sua projeção). Segundo WHITE *et al.* (1992), o valor ΔZ é melhor obtido pela técnica de microrradiografia, porém pode ser calculado através de microdureza, com protocolos apropriados e padronizados.

A microdureza é um teste de dureza por endentação que envolve a penetração de uma ponta de diamante de geometria específica para dentro do material a ser testado. A aplicação deste teste em espécimes dentais foi iniciada por HODGE em 1936, que reportou durezas para a dentina (GUNNAR *et al.*, 1961). Três tipos de pontas penetradores podem ser empregados em pesquisas odontológicas: penetradores tipo Vickers; tipo Brinell e tipo Knoop. Nos estudos em esmalte e dentina, o teste de microdureza mais utilizado é o teste Knoop (MEREDITH *et al.*, 1996). A ponta penetradora tipo Knoop é constituída por um diamante, lapidado de forma que o ângulo longitudinal formado na parte impressora seja de 172,50° e o ângulo transversal de 130°. Neste método, a ponta piramidal é posicionada na amostra com uma determinada carga por um determinado tempo. O comprimento da marca, em forma de losango, deixada pelo penetrador na amostra é determinado com um microscópio e o valor de microdureza (número de dureza Knoop- KHN) é calculado usando-se a fórmula matemática

$$KHN = (14230 \times P)/L^2$$

Onde P é a carga aplicada em g e L é o comprimento da impressão feita pelo diamante, medida na diagonal maior em μm (FEATHERSTONE *et al.*, 1983; TEN BOSH & ANGMAR MANSON, 1991). A unidade de medida da dureza é kg/mm^2 .

As determinações de microdureza podem prover evidências indiretas de ganho ou perda mineral. Se o comprimento das impressões aumenta, o tecido perdeu mineral. Se o valor do comprimento diminui em magnitude, o tecido provavelmente ganhou mineral.

Segundo ARENDS & TEN BOSH, (1992) dois tipos de mensuração de microdureza podem ser realizados na análise de alterações minerais:

- Microdureza de superfície, onde o penetrador é posicionado perpendicular à superfície polida do tecido.
- Microdureza do esmalte seccionado longitudinalmente, onde o penetrador é posicionado paralelamente à superfície anatômica do tecido.

A microdureza é considerada um método indireto de se quantificar perda mineral, pelo fato de não fornecer os resultados em quantidade de mineral do tecido analisado. Este cálculo pode ser feito através de fórmulas que correlacionam dureza e porcentagem de volume mineral. FEATHERSTONE *et al.* (1983) correlacionaram valores de microdureza e valores de conteúdo mineral obtidos com microrradiografia e demonstraram que a porcentagem de volume mineral foi diretamente proporcional à raiz quadrada do número de dureza Knoop. O coeficiente de correlação foi de 0,92 e foi proposta a seguinte equação:

$$\% \text{ de volume mineral} = 4,3 \text{ KHN}^{1/2} + 11,3$$

Na técnica de microdureza do esmalte seccionado longitudinalmente, o cálculo do ΔZ pode ser obtido calculando-se os valores de porcentagem de volume mineral em profundidades crescentes no espécime, obtendo-se curvas do perfil mineral do tecido com lesão e do tecido hígido.

Em resumo, a técnica de microdureza tem o seu uso bastante difundido na determinação de alterações minerais ocorridas em substratos dentários submetidos a processos de des e remineralização proporcionando resultados confiáveis e reprodutíveis.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Este estudo *in vitro* constituiu-se de 3 fases, a saber:

- Fase I: Determinação da carga bacteriana de terceiros molares humanos retidos, armazenados em solução de NaCl a 0,9%, para posterior cálculo da dose mínima de radiação gama eficaz na sua esterilização.
- Fase II: Análise do efeito da dose de 25 kGy de radiação gama, sobre a microdureza de superfície do esmalte dental humano.
- Fase III: Avaliação do efeito da mesma dose de radiação gama sobre a resistência do esmalte dental ao desenvolvimento de cárie *in vitro* quando submetido a um modelo de ciclagem de desmineralização-remineralização.

Para a realização da Fase I deste trabalho, foram coletados 20 terceiros molares humanos retidos procedentes de três clínicas diferentes, os quais tiveram sua carga microbiana determinada. Uma vez determinada esta carga, a dose de radiação para esterilização foi escolhida.

Para a Fase II, foram utilizados outros 30 terceiros molares humanos retidos seccionados ao meio. Cada metade foi destinada a um grupo distinto, constituindo assim, dois grupos experimentais: Grupo controle- formado pelas metades mantidas em água

destilada, deionizada e esterilizada e Grupo Irradiado- formado pelas metades irradiadas pela dose de 25 kGy (dose hospitalar). Das 30 metades de cada grupo foram obtidos 60 blocos, 40 dos quais foram planificados, polidos e tiveram sua microdureza de superfície avaliada. Os 20 blocos restantes permaneceram com sua superfície externa de esmalte preservada.

Para a realização da Fase III foram constituídos 4 grupos experimentais a partir dos blocos obtidos na Fase II, cada grupo continha 10 unidades experimentais. Os grupos foram denominados: Grupo NPC- formado por blocos de esmalte não planificado advindos das metades dentais acondicionados em água (Controle 1); Grupo NPI- formado por blocos de esmalte não planificado advindos das metades dentais irradiadas por radiação gama; Grupo CP- formado por blocos de esmalte planificado com dureza de superfície determinada advindos das metades dentais reservadas em água (Controle 2) e Grupo PI- formado por blocos de esmalte planificado com dureza de superfície determinada advindos das metades dentais irradiadas por radiação gama. Estes grupos foram submetidos a um modelo de ciclagem de desmineralização-rem mineralização (ciclagem de pH). Após a ciclagem, a microdureza Knoop em corte longitudinal do esmalte foi mensurada em cada corpo-de-prova e os valores de perda mineral foram calculados. O esquema do delineamento experimental usado nas fases II e III está expresso na FIG. 1.

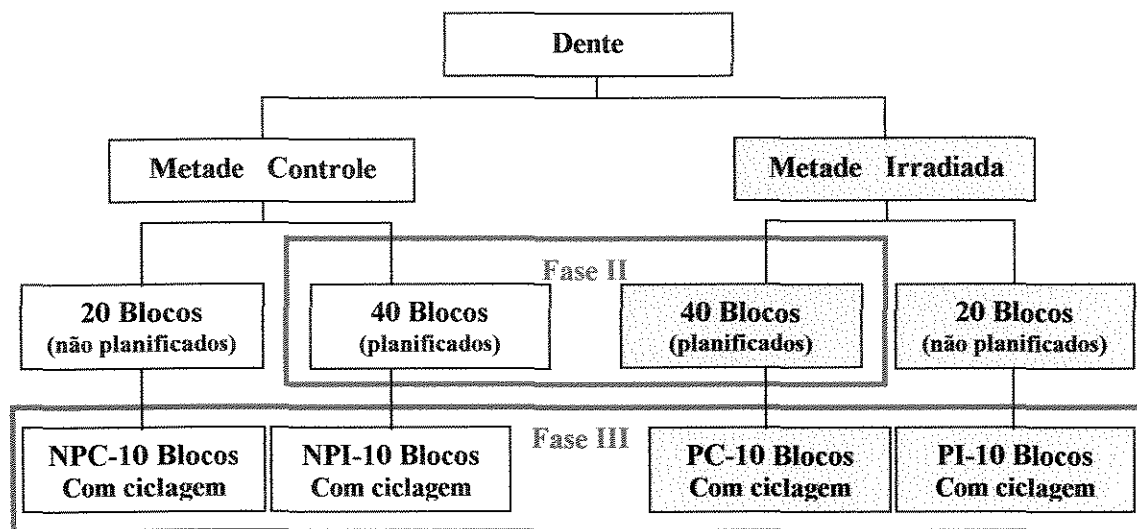


FIGURA 1. Esquema do delineamento experimental usado nas Fases II e III.

3.1.1. Aspectos éticos

Por trabalhar com partes constituintes do corpo humano, o projeto desta pesquisa foi submetido à avaliação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP. Sua aprovação foi expressa em documento cujo protocolo teve nº 059/2001, estando de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS. (Anexo 1)

3.2. FASE I- DETERMINAÇÃO DA CARGA BACTERIANA DE TERCEIROS MOLARES RETIDOS, ARMAZENADOS EM SOLUÇÃO DE NaCl A 0,9 %, PARA POSTERIOR CÁLCULO DA DOSE MÍNIMA DE RADIAÇÃO GAMA EFICAZ NA SUA ESTERILIZAÇÃO

Para a determinação de uma dose de radiação gama para esterilização de dentes terceiros molares retidos armazenados em solução salina, foi seguido o protocolo sugerido pelas Normas Européias de Validação e Controle de Rotina de Esterilização por Irradiação para dispositivos médicos - NF EN 552 de outubro de 1994 (AFNOR, 1994a). Segundo estas normas, para validar um processo de esterilização por irradiação pode-se proceder de duas maneiras:

a- Fazer uma estimativa da carga microbiana (população de microrganismo viáveis sobre um produto e/ou uma embalagem) do material, em conformidade com a Norma Européia EN 1174-1 em pelo menos 3 lotes do produto (AFNOR, 1994c). A escolha da dose esterilizante deve ser feita de acordo com a Norma Européia EN 556 (AFNOR, 1994b). Depois de escolhida e aplicada esta dose sobre 100 unidades do produto, devem ser aplicados testes para verificação de esterilidade, seguindo a metodologia preconizada pela EN EF 556 similar à recomendada pela FARMACOPÉIA BRASILEIRA de 1988. Os testes devem ser realizados em condições assépticas de forma a evitar contaminação acidental da amostra durante sua manipulação. São usados dois meios de cultura: o meio de caseína-soja e o meio tioglicolato; o primeiro para crescimento de leveduras, fungos e aeróbios e o

segundo, contempla o crescimento anaeróbio, embora haja também neste meio, crescimento de aeróbios, leveduras e até mesmo de fungos. Os meios de cultura devem apresentar esterilidade e capacidade de promover crescimento de microrganismo, portanto, estes são testados antes do teste das amostras ou em paralelo com ele. Para que o processo de esterilização seja considerado seguro e reprodutível, um máximo de dois resultados positivos, podem ser encontrados nestes testes.

b- Tratamento da amostra com uma dose mínima de irradiação de 25 kGy e confirmação da esterilização com os testes supracitados.

Objetivando encontrar a dose mínima de esterilização, foram seguidas as recomendações descritas no item “a”.

3.2.1. Análise da carga microbiana dos dentes

3.2.1.1. Obtenção e preparo dos dentes

A amostra foi constituída por 20 dentes terceiros molares humanos retidos com pelo menos dois terços (2/3) da raiz formada e extraídos por razões clínicas. Após a exodontia, os dentes foram mantidos em solução de NaCl a 0,9 % esterilizada. Estes dentes eram procedentes de três clínicas diferentes, visando atender a exigência da norma NF EN 552 (AFNOR, 1994a), a qual especifica que pelo menos três lotes do produto a ser analisado tenham sua carga bacteriana estimada.

Todos os dentes receberam a seguinte codificação:

- A seqüência de A-1 a A-6 representou os dentes coletados em uma clínica odontológica da rede privada da cidade de Piracicaba-SP.
- A série B-1 a B-7 foi empregada para representar dentes coletados em uma clínica odontológica da rede privada da cidade de Fortaleza-CE.
- Os dentes codificados com as siglas C-1 a C-7 foram coletados em um centro de atendimento do serviço público estadual do Ceará.

De acordo com um estudo piloto realizado para definir toda a metodologia de análise da carga microbiana, os dentes sofreram cortes longitudinais com discos flexíveis diamantados de dupla face (KG SORENSEN) esterilizados, montados em micromotor acoplado a uma peça reta. Os cortes tiveram aproximadamente a profundidade de 1 cm e objetivaram facilitar a quebra do dente com fórceps nº 16 para expor os tecidos pulparem no procedimento microbiológico. Para evitar contaminação, este passo operatório foi realizado dentro de uma câmara de fluxo laminar estando o operador devidamente paramentado.

3.2.1.2. Obtenção, homogeneização e diluição da suspensão bacteriana

Para facilitar a coleta de microrganismo presentes nos tecidos pulparem, os dentes foram quebrados ao meio com fórceps esterilizados e os segmentos dentais foram colocados em tubos de ensaio plásticos estéreis e com tampa (GREINER) os quais continham 20,0 mL de uma solução esterilizada de NaCl a 0,9 % e Tween 20 a 4 %. A adição do detergente Tween 20 à solução salina visava facilitar a extração de bactérias

adsorvidas à estrutura dental. Os dentes foram agitados por 1 minuto em um agitador de tubos (PHOENIX) e em seguida sonicados em sonicador VIBRA CELL 400 w (Sonics & Materials Inc.). Foram realizados 3 pulsos de 9,9 segundos com 5 segundos de intervalo entre eles, objetivando a homogeneização da suspensão bacteriana (BOWEN *et al.*, 1986).

A suspensão foi diluída adicionando-se 1,0 mL da mesma a 9,0 mL de solução salina, obtendo-se uma diluição de 1:10. O mesmo procedimento foi realizado mais três vezes com as novas suspensões, obtendo-se então diluições de 1:100, 1:1000 e 1:10000.

3.2.1.3. Semeadura do material

Depois da diluição seriada, 50,0 µL das três últimas diluições foram inoculados em meio TSA (em duplicata) para contagem da microbiota total. O meio TSA foi preparado dissolvendo-se 40 g de meio Tryptone Soya Agar- OXOID em 1,0 L de água destilada e deionizada. A mistura foi aquecida até a fervura e, então, levada para autoclavação por 15 minutos a uma temperatura de 121°C. Após a esterilização, o meio foi resfriado até 45°C e distribuído em placas de Petri médias descartáveis. O volume de meio dispensado em cada placa foi de 20,0 mL e as mesmas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Esta incubação possibilitou testar a esterilidade do meio e também sua secagem, requisito este, essencial para uma boa operacionalidade no aparelho de semeadura.

A semeadura da superfície do meio, previamente distribuído em placas de Petri estéreis, foi realizada pelo método de plaqueamento em espiral adequado para grandes cargas microbianas. Este método automatizado de semeadura foi executado por um aparelho SPIRAL PLATER. Inicialmente, a SPIRAL PLATER succiona a amostra

homogeneizada, através de uma cânula de teflon. Em seguida, o plaqueador faz a semeadura da superfície da placa presente sobre uma plataforma giratória. A mediada que faz a dispensa da amostra enquanto a placa gira, a cânula se desloca do centro para as bordas da placa formando um espiral e um gradiente de concentração, que se inicia no centro e diminui à mediada que se dirige para as bordas da placa. A máquina possui capacidade de realizar até quatro (4) inoculações de 50,0 µL, que podem ser feitas de maneira linear ou logarítmica. No presente trabalho usou-se a inoculação na forma logarítmica. A lavagem da máquina entre as semeaduras foi realizada com solução de Milton (hipoclorito de sódio a 0,5 %) seguida de água destilada e deionizada. Esta lavagem era realizada após a troca de cada diluição. Depois de semeadas, as placas de TSA foram incubadas em atmosfera normal a 37°C por 48 horas.

3.2.1.4. Contagem das unidades formadoras de colônia por unidade dentária

A contagem das colônias foi realizada com ajuda de uma lupa, acoplada a um contador de colônias adquirido em conjunto com o aparelho SPIRAL PLATER. O procedimento seguiu o protocolo da própria máquina, que consiste na contagem de setores previamente estabelecidos da placa que podem ser visualizados com a ajuda de um cantilhão (FIG.2).

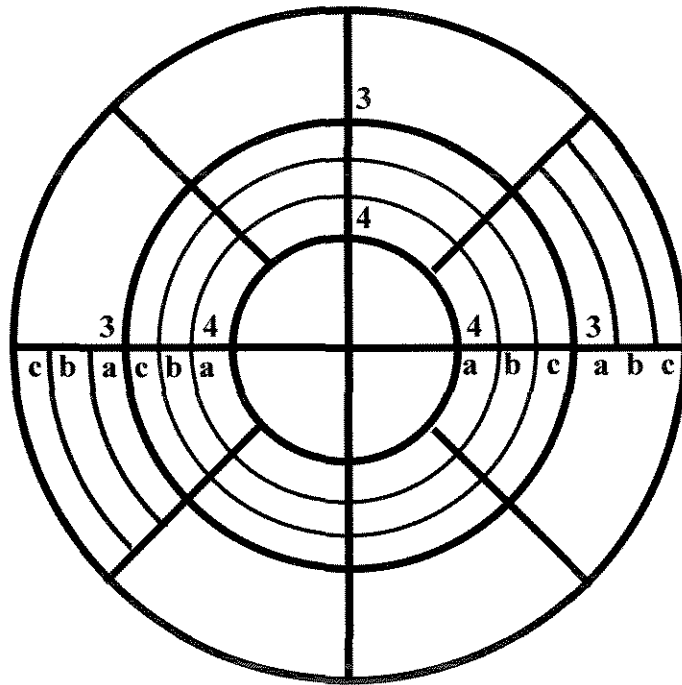


FIGURA 2- Cantilhão para contagem da placa em setores

O cantilhão está desenhado sobre a porção iluminada do contador de colônias, assim, na ocasião da colocação da placa sobre esta porção do aparelho, pode-se ver, através do meio de cultura e placa, a imagem do mesmo. A superposição da placa e suas colônias sobre o cantilhão possibilita a contagem das colônias apenas nos setores da placa. Deste modo, o número total de colônias pode ser estimado, tomando-se por base o fato de que a inoculação foi feita de forma logarítmica. Levando-se em consideração que a cada setor da placa corresponde um determinado volume de inoculação e que o volume total despejado pela máquina é de 50 μ L, pode-se, através de uma regra de três, calcular o número

aproximado de colônias existentes em toda a extensão da placa de Petri. Exemplificando, os setores hachurados na FIG. 3 correspondem à área 3c na qual são inoculados 0,00054 mL de inóculo, portanto, se contarmos nesta área 35 colônias, o número de ufc/mL de inóculo será de $6,5 \times 10^4$.

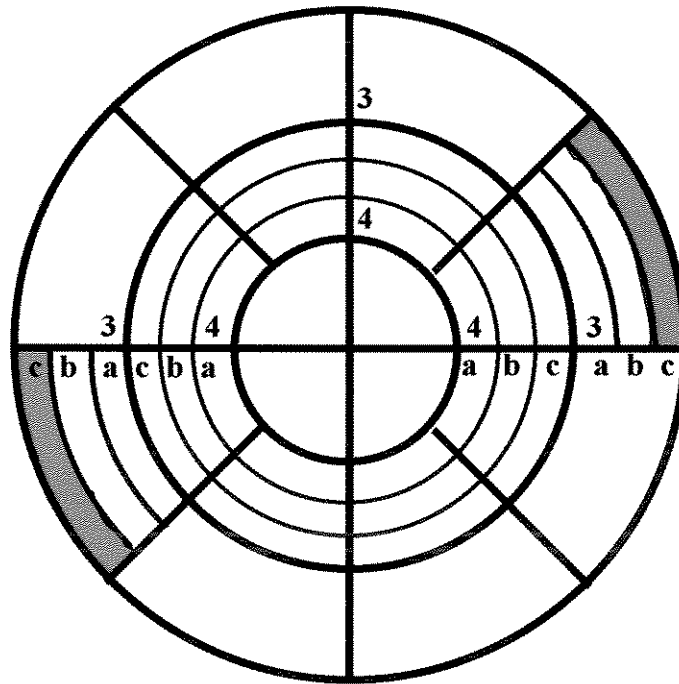


FIGURA 3- Cantilhão com a área 3c hachurada correspondendo aos setores 3c

Caso encontremos nesta área, um número de colônias inferior a 20, devemos estender a contagem aos setores 3b. A área 3b corresponde à soma dos setores 3c e 3b como mostrado pelas áreas hachuradas na FIG.4. Sabendo que a inoculação nesta área é de 0,00137 mL, as mesmas 35 colônias se encontradas nesta região da placa dariam uma estimativa de $2,6 \times 10^4$ ufc/mL por inóculo. É válido ressaltar que sempre devem ser

contados os setores opostos da placa, caso o número de colônias seja insuficiente, estende-se a contagem até se obter este número.

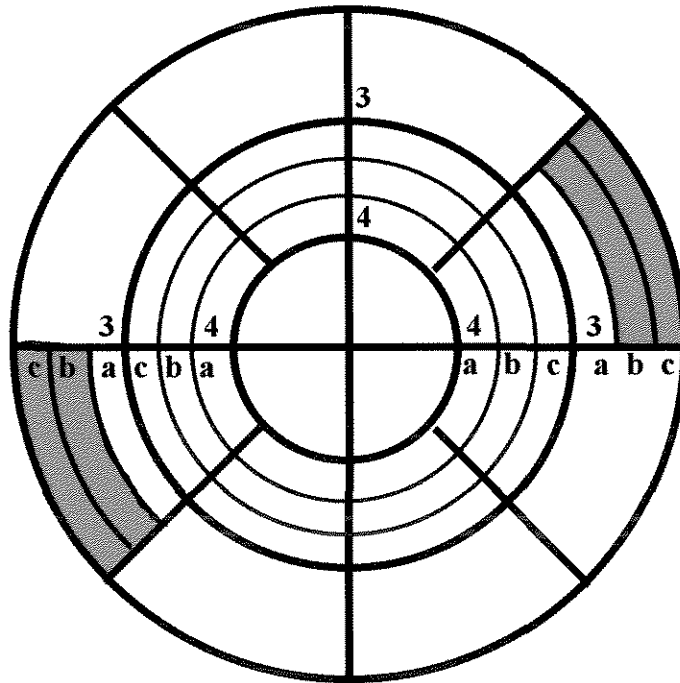


FIGURA 4- Cantilhão com a área 3b hachurada correspondendo aos setores 3c e 3b

3.2.2. Cálculo da dose de radiação gama para esterilização dental

Depois de obtido o valor médio da contaminação dos dentes analisados, a dose de radiação gama a ser empregada foi calculada tendo-se como referência a tabela B.1 da “International Organization For Standardization”- ISO 11137-1995 (E) citada pela norma EN 556. Esta tabela apresenta a dose de radiação gama em kGy requerida para alcançar

diferentes níveis de garantia de esterilização para diferentes cargas microbianas. A média de contaminação mais alta de uma unidade do grupo só deve ser usada para estabelecimento da dose de esterilização, se este valor exceder em duas vezes a média geral de todas as unidades do produto que tiveram sua carga microbiana estimada. Se a média de contaminação não tiver seu valor expresso na tabela, o valor mais próximo e superior da tabela deve ser o escolhido. (Anexo 2)

3.3. FASE II- ANÁLISE DO EFEITO DA DOSE DE 25 kGy DE RADIAÇÃO GAMA SOBRE A MICRODUREZA DE SUPERFÍCIE DO ESMALTE DENTAL HUMANO

3.1. Irradiação dos espécimes com radiação gama

3.3.1.1. Obtenção e irradiação das metades dentais

Para esta fase foram utilizados 30 terceiros molares humanos retidos armazenados em solução salina esterilizada, escolhidos com os seguintes critérios de inclusão: mais de dois terços da raiz formada, volume adequado e ausência de lesões de cárie, trincas ou imperfeições. Esta seleção foi feita pelo método visual com o auxílio de uma lupa com aumento de 10 vezes.

Os dentes foram seccionados ao meio com disco diamantado dupla face (KG SORESEN). Por se tratar de material contaminado, o operador executou este procedimento devidamente paramentado seguindo todas as normas de biossegurança e dentro de uma câmara de fluxo laminar. Uma metade de cada dente foi reservada para ser constituído o grupo controle. Estas metades dentais foram armazenadas em 50,0 mL de água destilada, deionizada, esterilizada em um único recipiente e mantidas sob refrigeração (Grupo Controle). As outras trinta metades (Grupo Irradiado) foram acondicionadas da mesma maneira e levadas ao CENA -Centro de Energia Nuclear na Agricultura- USP para serem submetidas a radiação gama aplicando-se a dose de 25 kGy. O aparelho utilizado foi um

GAMMACELL 220 EXCEL (GC-220E). A taxa de dose do dia da aplicação era de 1726 Gy/h proporcionando um tempo de irradiação de 14 horas e quarenta e nove minutos. A temperatura da sala foi mantida constante a 27° C. A escolha da dose foi baseada na opção “b” do protocolo de validação de processos de esterilização por irradiação, uma vez que a contaminação inicial estimada superou os valores encontrados na tabela da ISO- 1995. Segundo a NE 552, historicamente, é constatado que uma dose de 25 kGy constitui uma dose de esterilização eficaz, além de ser a dose previamente relatada na literatura (CHANDLER, 1990; TITLEY *et al.*, 1998; SØNJU CLASEN *et al.*, 1997; AMAECHI *et al.*, 1998, 1999a).

3.3.2. Confeção dos blocos dentais

Das 30 metades dentais pertencentes a cada grupo foram confeccionados 60 blocos, totalizando 120 blocos de esmalte dental. Para a obtenção dos blocos, as metades dentais foram cortadas com discos diamantados de dupla face (DIAMOND BUEHLER), acoplados a uma cortadeira metalográfica elétrica BUEHLER-ISOMET, sob refrigeração com água destilada deionizada. Foi utilizado um espaçador de 4 mm, a fim de conseguirmos uma amostra de 4 mm x 4 mm (ou 16 mm²). Os blocos foram obtidos da porção central da coroa dental.

Após o corte dos blocos de esmalte, foi realizada a planificação da dentina visando à obtenção de uma maior área de esmalte plano. A dentina foi planificada fixando-se os blocos na porção central de um disco de resina acrílica pré-fabricado (3,0 cm de

diâmetro e 8,0 mm de espessura), com a superfície mais plana do esmalte voltada para a resina acrílica. Este ajuste foi feito de forma manual usando uma lixa 320 molhada com água destilada deionizada e permitiu que a dentina ficasse paralela à superfície mais plana do esmalte.

Depois de realizada esta planificação, foram selecionados de forma aleatória 20 blocos de cada grupo, os quais foram reservados para serem utilizados na Fase III. Nos 80 blocos restantes (40 de cada grupo) foi executada a planificação e o polimento do esmalte, para posterior verificação da microdureza de superfície. O número maior de blocos usados para esta análise é justificado para termos uma maior liberdade de escolha na ocasião da seleção dos blocos (“base-line”) para a ciclagem de pH.

Para planificação e polimento da superfície do esmalte, os blocos foram reposicionados no centro de discos de resina acrílica, com a superfície de esmalte voltada para cima e levados à politriz com lixa de granulação 600 durante 30 segundos. Este lixamento tinha o objetivo de remover uma camada de esmalte, expondo uma área de esmalte lixado e plano, que não abrangeu toda a face do bloco dental. Em seguida foi usada a lixa de granulação 1200 durante 3 minutos. Após o uso de cada lixa, os blocos eram submetidos a um banho de ultra-som em água destilada e deionizada por 3 minutos.

Para o acabamento final, utilizou-se a politriz com disco de papel feltro (Polishing Cloth BUEHLER nº 40-7618) e suspensão de diamante (BUEHLER-METADI Diamond Suspension 1 micron - Water Base nº 40-6530), baixa velocidade, durante 3 minutos. O último banho de ultra-som dos blocos era realizado por 2 minutos e os mesmos

encontravam-se imersos em solução detergente (ULTRAMET SONIC Cleaning Solution n° 75-5000-032 BUEHLER) diluída na proporção 1:20, em água destilada deionizada. Em seguida, os mesmos eram enxaguados em água destilada deionizada corrente e armazenados em ambiente úmido, fechado e refrigerado.

3.3.3. Análise da Microdureza de Superfície do Esmalte Dental Irradiado e Não Irradiado

A análise da microdureza de superfície foi realizada em um microdurômetro FUTURE TECH modelo FM-7 acoplado a um software FM-ARS, e penetrador tipo KNOOP com carga estática de 50 gramas e tempo de 5 segundos. Foram realizadas 5 penetrações no centro da área de esmalte plano, confeccionada na planificação do esmalte. Estas impressões estavam separadas entre si por uma distância de 100 μm . A análise foi realizada nos 80 blocos polidos. A seguir foi calculado o número de dureza Knoop (KHN) médio de cada bloco e posteriormente de cada grupo. O número de dureza Knoop corresponde à razão da carga aplicada à ponta penetradora com a área projetada na amostra e é calculado automaticamente pelo software. O esquema das impressões está representado na FIG. 5.

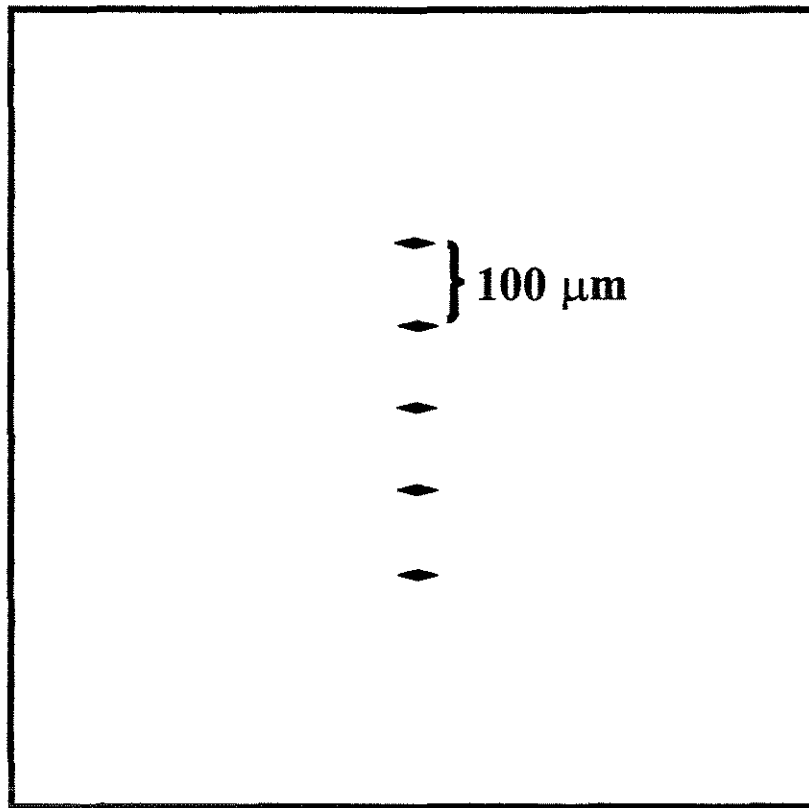


FIGURA 5. Esquema das impressões feitas no centro da área de esmalte planificado em cada bloco.

3.4. FASE III- AVALIAÇÃO DO EFEITO DA RADIAÇÃO GAMA SOBRE A RESISTÊNCIA DO ESMALTE AO DESENVOLVIMENTO DE CÁRIE *IN VITRO* QUANDO SUBMETIDO A UM MODELO DE CICLAGEM DE pH

3.4.1. Preparo dos blocos para as ciclagens de desmineralização-rem mineralização

Quatro grupos de 10 blocos foram formados, conforme o quadro abaixo:

Grupo	Características do Esmalte
NPC	Esmalte não planificado e não irradiado.
NPI	Esmalte não planificado e irradiado.
PC	Esmalte planificado e irradiado.
PI	Esmalte planificado e irradiado.

QUADRO 2: Grupos experimentais

Para os grupos PC e PI, foram selecionados blocos com o número de dureza Knoop mais próximo do número de dureza médio dos grupos inicialmente formados na Fase II (Grupo Controle e Grupo Irradiado). Para cada novo grupo, foram escolhidos 5 blocos com número de dureza abaixo e 5 blocos com número de dureza acima da média encontrada nos grupos anteriores. Para verificação de indícios de possíveis diferenças entre

as médias dos novos grupos formados, os valores de dureza médios foram analisados pelo teste t para amostras pareadas, ao nível de significância de 5%. O valor de p obtido foi de 0,6010 evidenciando a homogeneidade dos blocos.

Foi fixado, na porção mais plana de cada bloco, um disco de papel Contact® recortado com uma ferramenta que possibilitava a obtenção de círculos com aproximadamente 2 mm de diâmetro. As superfícies dentais externas foram pintadas com uma camada de esmalte para unhas ácido-resistente. O restante da superfície dos blocos dentais foi isolado com cera pegajosa (KERR) quando os mesmos foram fixados no suporte para a realização da ciclagem. Após a secagem do esmalte, o disco de papel adesivo foi removido, expondo uma área de esmalte dental de aproximadamente 3,14 mm². Os blocos foram observados em lupa para verificação da presença ou não de resquícios de cola provenientes do papel. Quando estes existiam, eram facilmente visualizados e removidos após o armazenamento dos blocos em ambiente úmido por 24 horas.

Após esse preparo, os blocos foram fixados em suportes confeccionados com fio ortodôntico e resina acrílica que possibilitaram maior controle na execução dos procedimentos de lavagem e troca dos blocos de uma solução para a outra. Até o início das ciclagens de desmineralização-rem mineralização, todos os blocos foram mantidos em ambiente fechado e úmido.

3.4.2. Ciclagem de desmineralização-remineralização (Ciclagem de pH)

Os blocos, agora fixados nos suportes, foram imersos alternadamente nas soluções desmineralizadora e remineralizadora que estavam acondicionadas em tubos de ensaio plásticos com tampa (GREINER). Desta forma, cada bloco era ciclado separadamente em suas próprias soluções.

O método alternado de ciclagem de pH usado nesta pesquisa foi anteriormente descrito por FEATHERSTONE *et al.* (1986), modificado por ARGENTA (2001) e simula, *in vitro*, uma situação de alto desafio cariogênico. O procedimento foi realizado de acordo com a seguinte descrição:

Os espécimes permaneciam 3 horas numa solução desmineralizadora que se constituía de tampão acetato contendo 2,0 mmol/L de cálcio (proveniente do sal CaCl_2 - SYNTH), 2,0 mmol/L de fosfato (proveniente do sal NaH_2PO_4 - REAGEN) e 0,075 mol/L de ácido acético. O pH foi ajustado para 4,3 e foi adicionado 0,03 ppm de flúor. Cada bloco foi imerso em 20,0 mL desta solução, a proporção solução desmineralizadora/área de esmalte obtida foi de 6,36 mL/mm² (ARGENTA, 2001).

Decorrido este período, os blocos eram removidos da solução desmineralizadora, lavados com água destilada deionizada por 5 segundos e secos com papel absorvente, sem que sofressem pressão. Em seguida, eram imersos também individualmente em 10,0 mL da solução remineralizadora, obtendo-se uma proporção de 3,18 mL de solução para cada mm² de esmalte. Os blocos permaneciam nesta solução por um período de aproximadamente 20 horas e 40 minutos com o objetivo de simular o estágio

de remineralização do processo de cárie. A solução remineralizadora constituía-se de 1,5 mmol/L de cálcio, 0,9 mmol/L de fosfato, 150,0 mmol/L de cloreto de potássio (SYNTH) e 20,0 mmol/L de tampão cacodilato. O pH foi ajustado para 7,4 e foi adicionado 0,05 ppm de flúor (ARGENTA, 2001). Ambas as soluções continham cristais de timol para evitar o crescimento bacteriano e foram preparadas usando os mesmos reagentes como fontes de cálcio e fosfato.

Os grupos foram submetidos a 5 ciclos de desmineralização-remineralização em dias consecutivos. Após a realização dos ciclos, houve um período de 48 horas de imersão na solução remineralizadora (ARGENTA, 2001). Excetuando-se o tempo gasto para a lavagem dos blocos, os mesmos permaneciam em estufa ajustada numa temperatura de 37°C. O esquema da ciclagem encontra-se descrito na FIG. 6.

Após a ciclagem, os blocos foram limpos com jatos de água destilada deionizada, secos com papel absorvente e mantidos em ambiente fechado e úmido e sob refrigeração até o preparo para leitura de microdureza do esmalte seccionado longitudinalmente.

SOLUÇÃO DES- 20 mL:
2 mmol/L de Ca; 2 mmol/L de P
0,075 mol/L de acetato 6,36 mL/mm²
pH- 4,3 0,03 ppm F 37°C

SOLUÇÃO RE- 10 mL:
1,5 mmol/L de Ca; 0,9 mmol/L de P
150 mmol/L de KCl pH- 7,4
20 mmol/L cacodilato 0,05 ppm F
37°C 3,18 mL/mm²

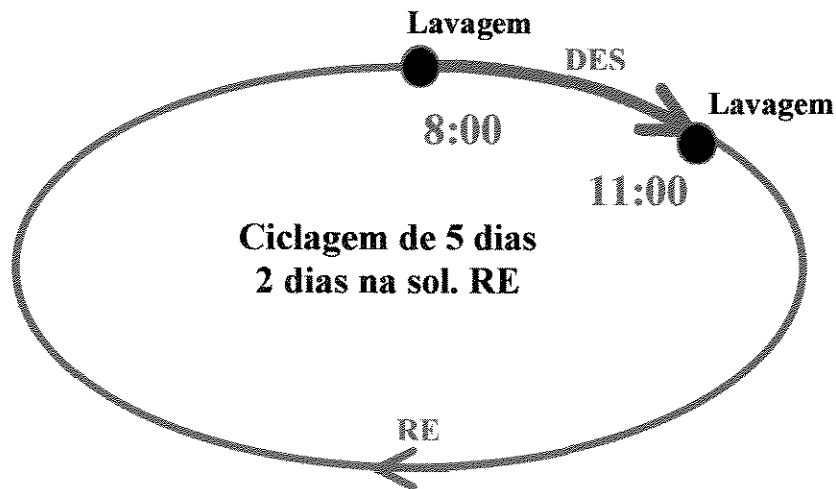


FIGURA 6. Esquema da ciclagem de pH

3.4.3. Preparo dos blocos para a análise de microdureza em corte longitudinal

Cada bloco dental foi fixado em placa de acrílico de 4x4x1 cm com cera pegajosa (KERR) e seccionado em dois segmentos com um corte longitudinal, passando pelo centro da área-teste. Para obtenção dos cortes foi utilizada a cortadeira elétrica BUEHLER-ISOMET com disco diamantado de dupla face (DIAMOND BUEHLER).

Os segmentos dentais foram identificados apenas pelo número para que o estudo fosse cego e embutidos em discos de resina acrílica utilizando-se a embutidora metalográfica AROTEC, modelo PRE-30. Sobre a base do pistão da embutidora, eram fixados de quatro a seis segmentos correspondentes a três ou dois blocos de um mesmo grupo. A fixação era feita de modo que a face cortada ficasse exposta para a leitura da microdureza. Em seguida, adicionava-se resina acrílica incolor ativada termicamente (CLÁSSICO), o pistão era fechado e a embutidora acionada. Foi padronizado um tempo de 5 minutos de aquecimento com pressão entre 100 e 150 kgf/cm², seguido por 8 minutos de resfriamento.

Para o acabamento e o polimento, utilizou-se a politriz elétrica AROTEC, modelo APL-4, com dispositivo para tratamento simultâneo de seis corpos-de-prova. Inicialmente, foi realizado o acabamento superficial com lixa de granulação 320 (CARBIMET Paper Discs- BUEHLER) em alta rotação, até a completa exposição das superfícies dos blocos dentais embutidos (aproximadamente 1 minuto). Em seguida, usou-se a lixa de granulação 600, por 6 minutos utilizando baixa rotação. O acabamento final foi realizado com lixa de granulação 1200, em baixa rotação por 12 minutos. A refrigeração a água foi ativada somente para os procedimentos de acabamento com lixas. Após o emprego de cada uma das lixas os corpos-de-prova eram submetidos a banho de ultra-som, imersos em água destilada deionizada.

No polimento foi utilizado disco de papel feltro auto-adesivo (Polishing Cloth BUEHLER nº 40-7618) com suspensão de diamante (BUEHLER-METADI Diamond Suspension 1 micron - Water Base nº 40-6530) por 14 minutos, utilizando baixa rotação. A

limpeza dos espécimes foi feita com solução de detergente ULTRAMET SONIC CLEANING SOLUTION, diluída em água destilada deionizada na proporção de 1:20, em aparelho de ultra-som, durante 3 minutos. Em seguida, os mesmos eram enxaguados em água destilada deionizada corrente e armazenados em ambiente úmido, fechado e refrigerado.

3.4.4. Análise da microdureza em corte longitudinal

A microdureza em corte longitudinal do esmalte foi mensurada com o microdurômetro FUTURE TECH modelo FM-7 acoplado a um software, e com ponta penetradora tipo KNOOP com carga estática de 25 gramas e tempo de 5 segundos. Foram realizadas 24 penetrações por segmento dental, com o longo eixo da ponta de diamante paralela à superfície externa do esmalte. Três faixas de leitura foram feitas a partir da superfície externa do bloco. Cada uma destas faixas foi constituída por 8 impressões e estavam 100 μm equidistantes uma da outra. A primeira impressão era realizada numa profundidade de 10 μm da margem de esmalte externa do bloco. A distância das penetrações localizadas em cada faixa foi de 20 μm até a profundidade de 110 μm . A partir desta indentação, as próximas foram realizadas nas profundidades de 200 e 300 μm . O esquema representando o embutimento, corte e as impressões realizados nos blocos dentais está apresentado na FIG. 7.

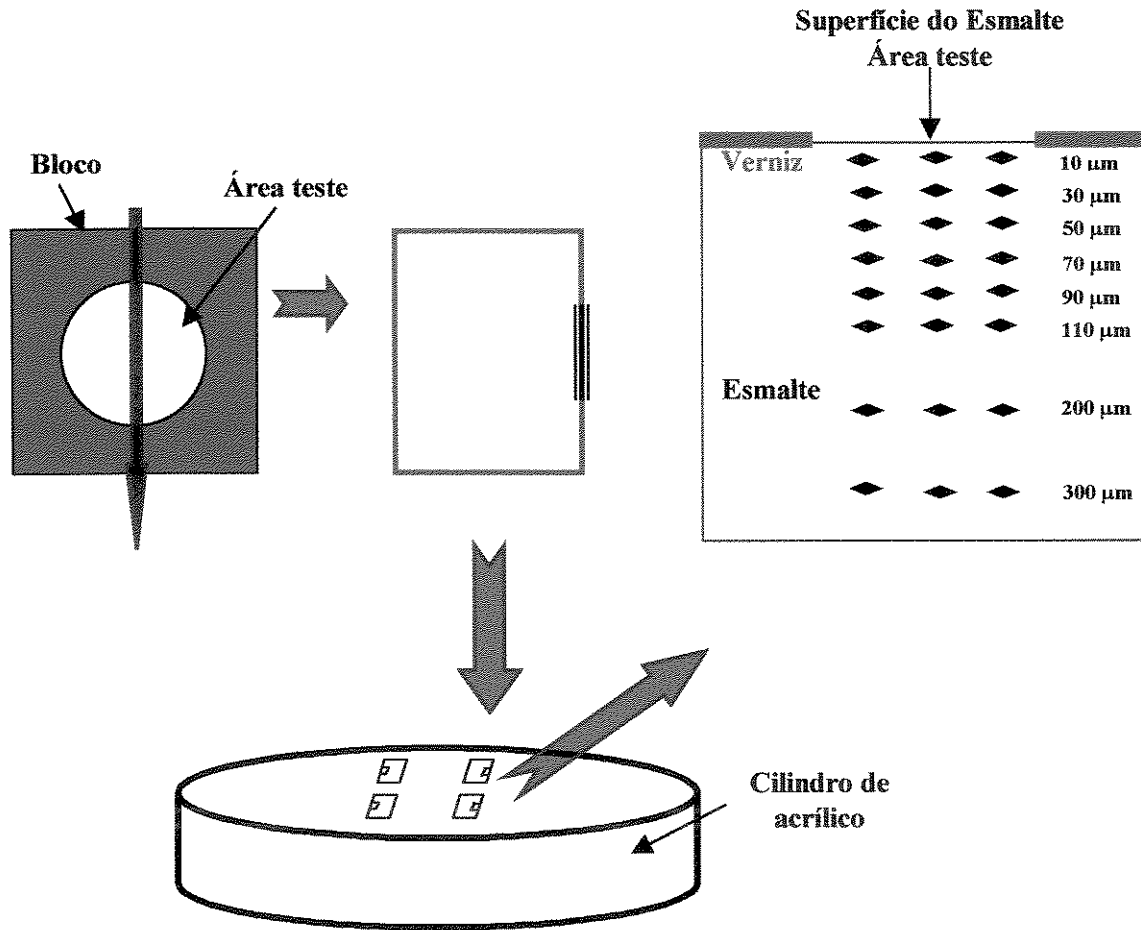


FIGURA 7. Esquema mostrando o corte, embutimento e impressões realizados nos blocos.

3.4.5. Determinação da Perda mineral (ΔZ)

Para cada grupo, os valores de microdureza Knoop (KHN) foram convertidos em porcentagem mineral em volume de acordo com a fórmula proposta por FEATHERSTONE *et al.* (1983):

$$\% \text{ mineral (em volume)} = 4,3 \cdot \text{KHN}^{1/2} + 11,3$$

Após calcular os valores de porcentagem em volume mineral em cada profundidade avaliada, foram obtidos: a curva e o valor de perda mineral (ΔZ) em todos os grupos. O perfil mineral da lesão de cárie foi mensurado plotando-se a porcentagem de volume mineral em função da profundidade a partir da superfície externa do esmalte. O ΔZ de cada bloco foi calculado pela integração da área entre o perfil mineral da lesão e a média da porcentagem de volume mineral do esmalte hígido que foi calculada extrapolando-se os valores de dureza de esmalte hígido sob a lesão (FIG.8). Conseqüentemente, a perda mineral representa a quantidade total de mineral perdido no processo de desmineralização em uma distância específica (OGAARD *et al.*, 1988; ARENDS & TEN BOSCH, 1992; SULLIVAN, 1995).

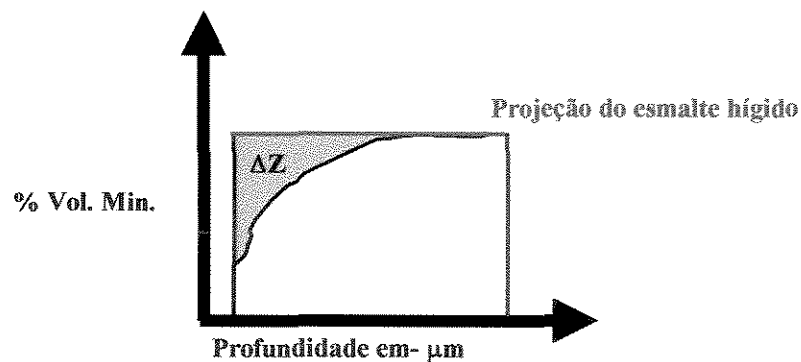


FIGURA 8. Gráfico mostrando a área ΔZ .

3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

3.5.1. Fase II

A análise estatística desta fase consistiu em se estudar a variável microdureza de superfície do esmalte dental. Uma vez determinada a existência de interdependência entre os dados de uma e outra metade dos dentes, foi definida a utilização de um teste para dados pareados objetivando obter-se indícios da diferença entre os dois grupos. A aplicação do teste para dados pareados iniciou-se através de um estudo de suposições para determinação do teste mais adequado às características dos dados analisados. A fim de determinar a existência de normalidade dos dados, foi aplicado o teste de Shapiro-Wilk. Encontrando-se indícios de que os dados provinham de uma população normalmente distribuída, foi aplicado o teste t de Student ao nível de significância de 5%.

3.5.2. Fase III

A análise estatística da fase III consistiu em se estudar a variável *perda mineral* (ΔZ), tendo os tratamentos do esmalte como fonte de variação. A análise de variância foi elaborada seguindo modelo estatístico adequado para análise de dados oriundos de experimento em parcelas subdivididas inteiramente casualizadas, no qual o fator irradiação determinava a parcela do experimento. As parcelas, por sua vez, foram divididas em subparcelas em decorrência da implantação do fator planificação, aleatorizado nas parcelas.

Foram realizadas as seguintes análises:

- Verificação das pressuposições necessárias para análise de variância;
- Estudo de transformação dos dados devido à ausência de homogeneidade de variâncias e presença de dados excessivamente influentes;
- Transformação dos dados de média de porcentagem de mineral pela potência 0,3, ajustando os dados ao modelo proposto para a execução do experimento;
- Observação dos dados potencialmente discrepantes para analisar sua real excessiva influência e, se fosse o caso, exclusão;
- Constatando-se que os valores excessivamente influentes não foram suficientes para imputar a eles o desbalanceamento dos dados, prosseguiu-se com a realização da análise de variância seguindo o modelo adequado para experimento em parcelas subdivididas inteiramente casualizadas;
- Comparações múltiplas de médias, em pares, através do Teste de Tukey, ao nível de significância de 5%.

Para a realização dos cálculos da análise estatística foi utilizado o programa

SAS.

4.RESULTADOS

A apresentação dos resultados foi dividida em três subcapítulos: Fase I, Fase II e Fase III.

4.1. FASE I

4.1.1. Carga microbiana dos dentes analisados

Os valores das médias da contaminação encontrada nos dentes analisados estão apresentados na TAB. 1.

TABELA 1. Médias e desvios padrão da contaminação bacteriana em unidades formadoras de colônia encontradas nas clínicas especificadas.

Clinicas	Média de ufc, 10⁶
A- Clínica da rede privada de Piracicaba-SP	5,60 ± 3,10a
B- Clínica da rede privada de Fortaleza-CE	6,70 ± 1,48a
C- Centro de atendimento do serviço público	5,74 ± 2,08a
Média da contaminação dos dentes	5,80 ± 2,23

Clinicas cujas médias são seguidas por letras distintas diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

O valor de contaminação microbiana mais alto encontrado na análise dos dentes, correspondeu ao espécime A3 procedente da clínica de Piracicaba-SP (Anexo 3). A média de ufc para tal espécime foi de $9,2 \times 10^6$ e não excedeu em duas vezes o valor da média (Média $\times 2 = 10,1 \times 10^6$) de todo o grupo de dentes. Em vista disso, para o cálculo da dose de esterilização optou-se por usar o valor da média final- $5,8 \times 10^6$. Este valor excedeu o maior valor de contaminação previsto pela tabela B1 da ISO 11137:1995. O valor mais

alto previsto na tabela corresponde a uma média de contaminação de aproximadamente $1,01 \times 10^6$. Para um nível de esterilização de 10^{-3} (padrão considerado aceitável em alguns países, como por exemplo Canadá), a dose indicada é de 24,9 kGy. O nível de esterilização 10^{-6} (padrão aceito mundialmente) para esta contaminação recomenda a aplicação de uma dose de 36,4 kGy. Embora não seja previsto ou sugerido pela ISO, foi realizada uma análise estatística através do teste ANOVA, ao nível de significância de 5%, visando verificar indícios de diferença entre as médias de contaminação encontradas em cada clínica. O valor de p encontrado foi de 0,5167 indicando não haver diferença entre a contaminação dos dentes coletados nas 3 clínicas.

4.2. FASE II

4.2.1. Coloração da estrutura dental

Como pode ser evidenciado pela análise das FIG. 9, 10, e 11 foi observado durante a execução da fase II deste estudo, que todas as metades irradiadas tiveram sua coloração alterada.

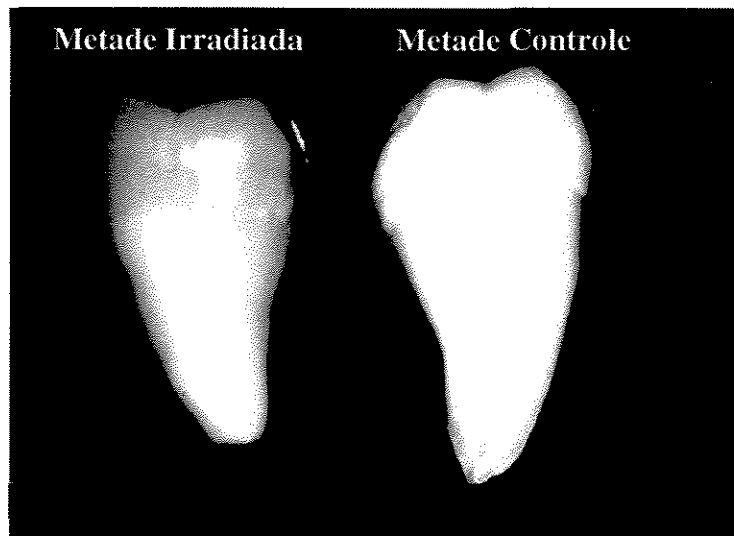


FIGURA 9. Fotografia de metades dentais correspondentes ao mesmo dente, metade irradiada e metade não irradiada.

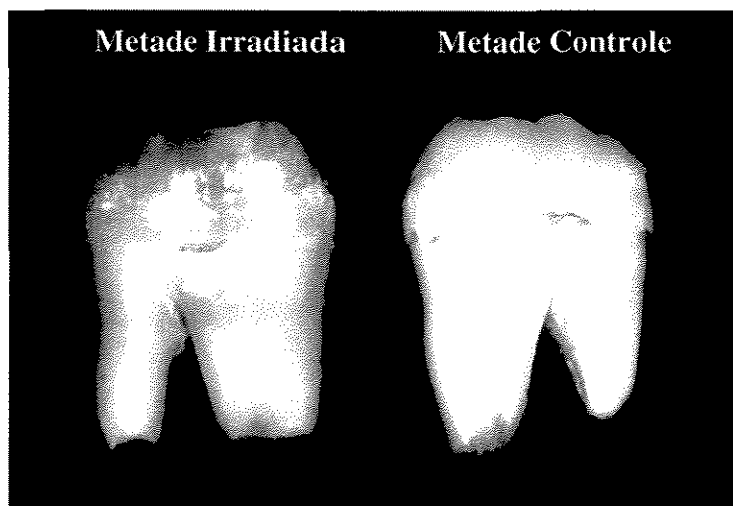


FIGURA 10. Fotografia de metades dentais correspondentes ao mesmo dente, metade irradiada e metade não irradiada.

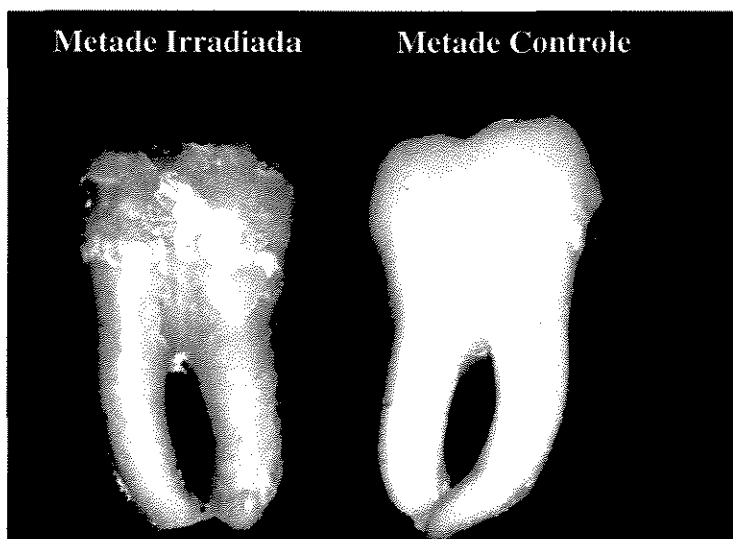


FIGURA 11. Fotografia de metades dentais correspondentes ao mesmo dente, metade irradiada e metade não irradiada.

4.2.2. Microdureza de superfície do esmalte

Nesta etapa, foram analisados os resultados de Dureza Knoop dos grupos Controle, com 40 blocos e Irradiados com radiação Gama, também com 40 blocos. Os resultados obtidos para as médias dos grupos estão listados na TAB. 2.

TABELA 2. Dureza Knoop do esmalte (médias e desvios padrão) em função do tratamento aplicado nos dentes.

Grupos	Dureza Knoop	p
Controle	338,35 ± 20,11a	0,58549
Irradiado	340,76 ± 21,68a	

Tratamentos cujas médias são seguidas por letras distintas diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

A normalidade dos dados foi determinada através da aplicação do teste de Shapiro-Wilk e o valor p obtido no teste foi 0,26638. Uma vez que o valor p apresentou um nível de significância superior ao nível de significância alfa previamente estabelecido em 5%, executou-se a aplicação do teste t de Student ao nível de significância de 5%. Como o valor p encontrado neste teste foi 0,58549, sendo maior que o nível de significância previamente estabelecido, não temos indícios de que existam diferenças entre as médias dos grupos controle e irradiado. Portanto, observa-se pelos resultados da análise estatística que a irradiação de dentes com raios gama não interfere na microdureza de superfície do esmalte dental humano.

Os resultados de microdureza de superfície estão apresentados no GRAF.1

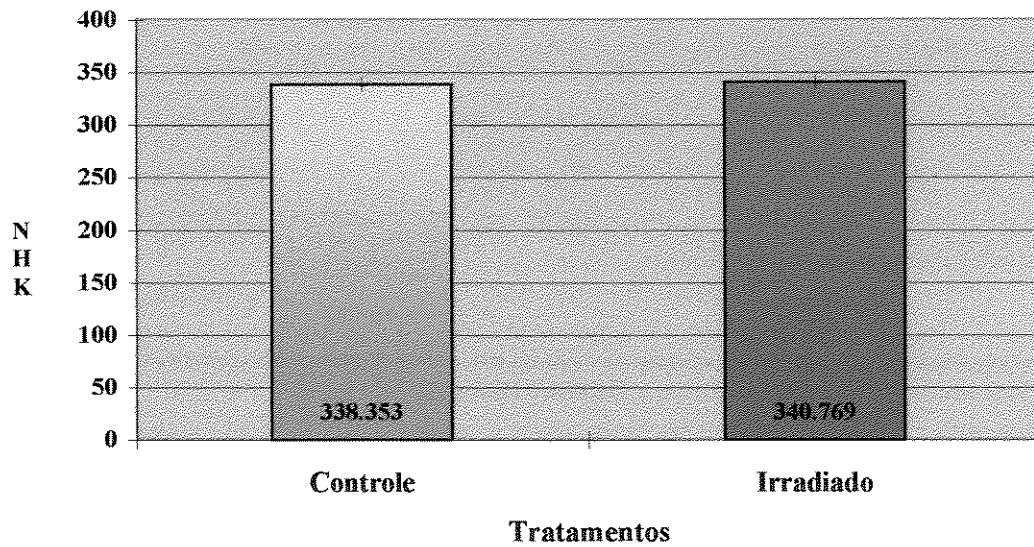


GRÁFICO 1. Comparação de médias e intervalos de confiança (95%)

4.3. FASE III

4.3.1. Microdureza do esmalte seccionado longitudinalmente

A comparação entre grupos de esmalte planificado e grupos de esmalte não planificado foi realizada objetivando constatar a existência, ou não, de uma ação superficial da radiação gama sobre o esmalte dental humano a qual não poderia ser verificada se apenas blocos de esmalte planificado fossem submetidos à ciclagem de pH. Em uma primeira etapa, foram analisados os resultados de ΔZ dentro dos tratamentos através de uma análise de variância, cujo resultado é apresentado na TAB. 3.

TABELA 3. Análise de variância da variável dependente perda mineral (ΔZ) em função dos fatores de variação : Irradiação e Planificação e suas interações, no esmalte dental.

Causa de Variação	GL	Soma de quadrados	Quadrados médios	Valor F	valor-p
Irradiação	1	0.00592636	0.00592636	0.01	0.9136 ^{ns}
Resíduo (A)	18	8.80652988	0.48925166		
Planificação	1	24.14519142	24.14519142	34.50	0.0001 ^{**}
Planificação*Irradiação	1	2.90538794	2.90538794	4.15	0.0566 ^{ns}
Resíduo (B)	18	12.59786646	0.69988147		
Total corrigido	39	48.46090206			
R-Quadrado 0.740041		C.V. 11.80995		Média ΔZ 7.08376749	

^{**}Significante

^{ns} Não significativa

Os valores de perda mineral ocorridos em cada grupo estão apresentados na TAB. 4.

TABELA 4. Médias e desvios padrão da perda mineral (ΔZ) do esmalte submetido ou não à radiação, planificado e não planificado.

Grupos	Média da Perda Mineral
NPC	547.9 ± 135.9a
NPI	425.0 ± 171.9a
PC	909.5 ± 405.5b
PI	1106.5 ± 343.3b

Tratamentos cujas médias são seguidas por letras distintas diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

Observam-se, pela análise, fortes indícios ($p < 0,01$) de que há efeito significativo do fator “Planificação” sobre a variável dependente, mas não há indícios de efeito significativo do fator “Irradiação” ou da interação entre eles ($p > 0,05$). O valor do coeficiente de determinação (R-Quadrado) indica que 74,00% da variação de ΔZ é explicada pelos fatores explícitos no modelo, o que indica um modelo bem ajustado, no qual mais de 70% da variável de resposta não tem seu valor controlado, possivelmente em decorrência da natureza biológica do material usado no ensaio. O coeficiente de variação indica que os valores são pouco dispersos em relação à média, entretanto, em um limite tolerável para este tipo de ensaio, já que o valor é próximo a 10 % (C.V.:11,81).

A comparação entre as médias dos grupos está expressa no GRAFI. 2.

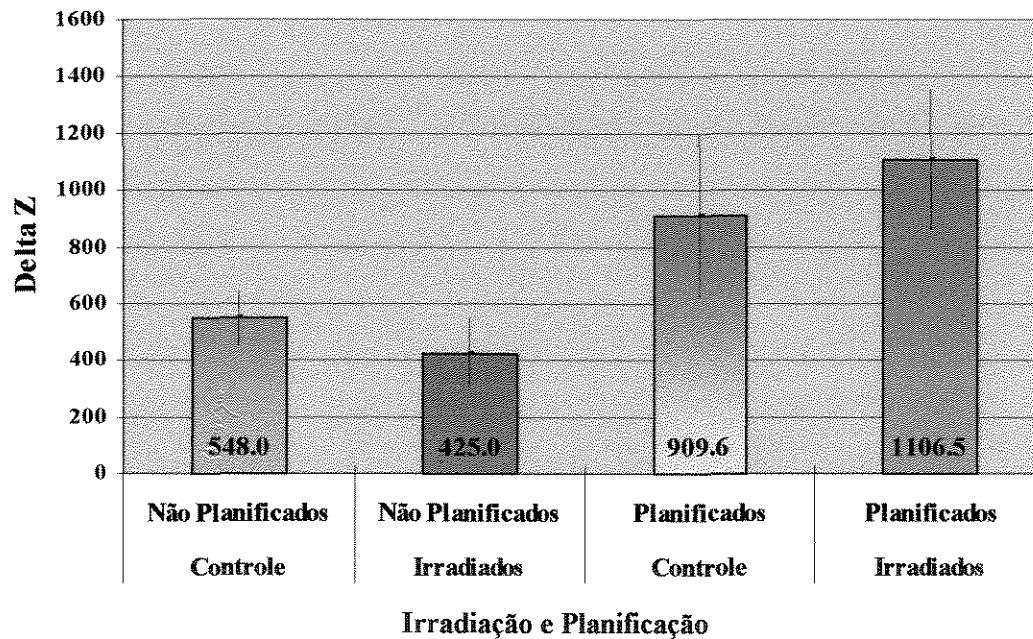


GRÁFICO 2. Comparação das médias de ΔZ entre os grupos

A perda mineral não foi estatisticamente diferente para os grupos NPC e NPI, e ainda para os grupos PC e PI. As diferenças apenas puderam ser observadas entre diferentes tratamentos do esmalte com relação ao tratamento de sua superfície, observando-se maiores perdas minerais nos grupos nos quais o esmalte foi planejado.

Como somente há efeito significativo no fator planificação e este fator conta apenas com dois níveis, nem seria necessária a comparação dos grupos planejados e não planejados, através do teste de Tukey, porém, esta análise foi realizada e a diferença entre os grupos, confirmada. Uma vez que o quadro de análise de variância não detectou

diferença entre os grupos irradiados e não irradiados, não se pode fazer uma comparação através de outro teste.

No GRAFI. 3, são apresentados os perfis minerais do esmalte para os quatro tratamentos, de acordo com a porcentagem de volume mineral em relação à profundidade.

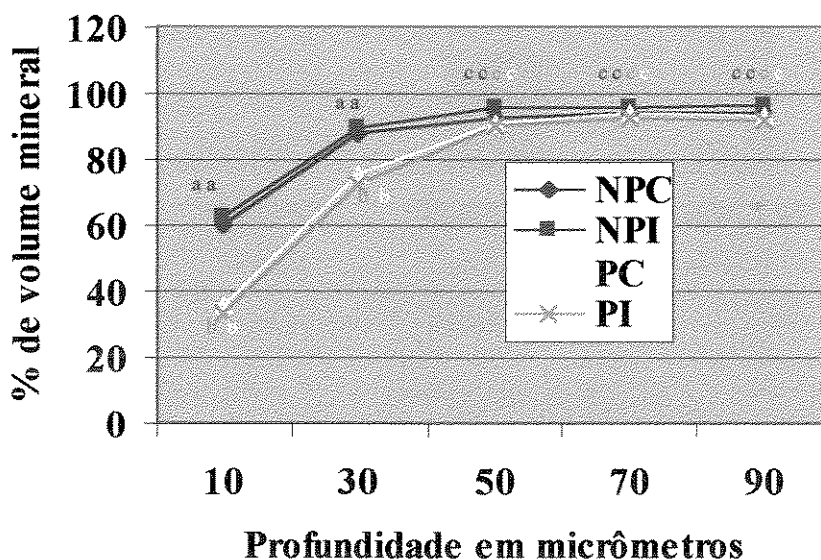


GRÁFICO 3. Perfil mineral conforme o tratamento do esmalte.

Observa-se que os tratamentos NPC e NPI tiveram menores perdas minerais que os grupos PC e PI. Por sua vez, as curvas de perfil mineral de NPC e NPI, bem como PC e PI foram similares.

5.DISSCUSSÃO

A discussão deste estudo foi dividida em três partes concernentes as três fases realizadas.

5.1. FASE I

A transmissão de doenças infectocontagiosas por contaminação cruzada em consultórios e laboratórios dentais tem sido uma preocupação entre profissionais da área odontológica. As diretrizes da ADA e do CDC orientam que todos os microrganismos capazes de transmitir doenças devem ser eliminados dos instrumentos e materiais que tenham sido expostos a fluidos corporais (PANTERA & SCHUSTER, 1990). Tais fluidos, como sangue e saliva, estão comumente associados com dentes extraídos, rotineiramente usados por pesquisadores e estudantes de Odontologia. Por conseguinte, a execução de procedimentos de esterilização em dentes extraídos seria relevante para que se conseguisse proteção efetiva destes indivíduos, não os expondo a riscos desnecessários.

Métodos como autoclavação, uso de óxido de etileno e uso de radiação gama tem sido testados quanto a sua eficácia, na esterilização de substratos dentais coletados e armazenados nas mais diversas condições, como nos estudos realizados por PANTERA & SCHUSTER (1990); WHITE, *et al.* (1994); WHITE & HAYS, (1995); AMAECHI *et al.* (1998, 1999a, 1999b) e CLARKE *et al.* (2000). No entanto, pouco enfoque tem sido dado no sentido de se garantir a eficácia e a reprodutibilidade do método testado. Para se garantir

eficiência nos processos de esterilização, devem ser executados procedimentos padronizados que validem a metodologia aplicada, propiciando assim que esta metodologia conduza sempre a resultados confiáveis e reprodutíveis. Segundo a ASSOCIAÇÃO FRANCESA DE NORMALIZAÇÃO (AFNOR, 1994a), “Validação é o modo operatório utilizado para se obter, registrar e interpretar os resultados necessários para mostrar que um procedimento fornecerá, de maneira reprodutível, um produto conforme as especificações pré-determinadas.” Portanto, a execução de simples testes microbiológicos não assegura que o método utilizado será eficiente em todas as circunstâncias, mesmo que se trate da mesma classe de produtos. A execução isolada de testes de esterilidade e posterior obtenção de resultados negativos, apenas indica a inexistência de microrganismos viáveis naquela amostra analisada.

Uma célula bacteriana é considerada viva quando puder originar uma colônia visível em um meio ágar, puder produzir um crescimento turvo em um meio líquido ou multiplicar-se em um hospedeiro animal ou vegetal (PELCZAR JÚNIOR *et al.*, 1996). No entanto, o conceito de morte microbiana pode ser um artifício controlado por condições laboratoriais. O meio de cultura utilizado para demonstrar o crescimento bacteriano pode não oferecer as condições ideais de reprodução para aquele microorganismo. Ou ainda, as condições físicas como temperatura e ar atmosférico podem não ser satisfatórias para o seu cultivo. Entretanto, o microorganismo pode possivelmente retornar a um estado “saudável” se oferecidas as condições ideais. Sabendo disso, a realização de testes microbiológicos confiáveis, torna-se um fator de grande relevância na validação de um processo de esterilização. Segundo a FARMACOPÉIA BRASILEIRA de 1988, para se constatar a

esterilidade de uma amostra, é necessária a realização de testes que propiciem o crescimento de bactérias aeróbias, anaeróbias e também de fungos.

Estudos como os realizados por AMAECHI *et al.* (1998) e CLARKE *et al.* (2000) não utilizaram testes que oferecessem condições atmosféricas ideais ao crescimento de microrganismos anaeróbios e fungos, por conseqüência, a metodologia não pode ser considerada eficaz para a esterilização dental, uma vez que a esterilidade não foi comprovada. Além disso, no trabalho de AMAECHI os dentes foram acondicionados em solução de timol, um comprovado antimicrobiano que provavelmente foi o responsável pela ausência de crescimento microbiano nos testes, uma vez que o mesmo não foi inativado antes da realização da análise.

As pesquisas realizadas por AMAECHI, em 1999, já apresentaram uma metodologia um pouco diferenciada, foi usado o mesmo meio não seletivo, caldo BHI, porém desta vez os espécimes foram incubados em atmosfera de aerobiose e também anaerobiose. A simples inclusão de um meio rico em atmosfera de anaerobiose não assegura o crescimento dos microrganismos anaeróbios viáveis. O meio de cultura para crescimento de microrganismos anaeróbios, indicado pela FARMACOPÉIA BRASILEIRA é o tioglicolato, meio reduzido, o qual tem um agente redutor que se combina quimicamente com o oxigênio deixando-o não disponível para os microrganismos. Portanto, este meio forma duas fases no tubo de ensaio, uma inferior, na qual há ausência de oxigênio sendo ideal para o crescimento anaeróbio e a superior, que propicia crescimento aeróbio.

A utilização de microrganismos considerados “indicadores biológicos,” como o *Bacillus subtilis* usado por WHITE *et al.* (1994) e WHITE & HAYS (1995) permite a comprovação da eficiência da esterilização, uma vez que, após a aplicação do processo o microorganismo é diretamente testado (APECHI, 1998). No entanto, a realização deste tipo de teste não valida o processo de esterilização, pois não traduz as condições reais encontradas rotineiramente em processos de esterilização.

A inativação de uma cultura de microrganismos por agentes físicos e químicos, utilizados para esterilização, pode ser freqüentemente representada por uma lei exponencial (LANDGRAF, 1996; PELCZAR JÚNIOR *et al.*, 1996; ALTERTHUM & CARVALHAL, 1999). Isto significa que, inevitavelmente, sempre persistirá uma probabilidade finita de sobrevivência de um microorganismo, qualquer que seja a eficácia do método aplicado. Para um dado método, a probabilidade de sobrevivência é em função do número e da resistência dos microrganismos, desde que os parâmetros de esterilização sejam mantidos constantes durante o processo. Sabendo disto, a carga microbiana (biocarga) do produto merece atenção particular na validação de um procedimento de esterilização, pois em se conhecendo esta carga, é possível determinar se os parâmetros aplicados naquele método são capazes de levar a uma redução bacteriana tal, que propicie uma baixa probabilidade de encontrarmos microrganismos viáveis (AFNOR, 1994a).

Não há relatos na literatura de determinação da biocarga de dentes, seja qual for o método utilizado para seu armazenamento. A não realização deste passo operatório pode levar a execução de procedimentos insuficientes de esterilização, ou contrariamente, à

utilização de parâmetros inadequadamente exagerados podendo até causar danos materiais à amostra esterilizada. Um exemplo do primeiro caso pode ser observado nos experimentos realizados por AMAECHI *et al.* (1999b) e CLARKE *et al.* (2000). Em 1999, AMAECHI *et al.* concluíram que a dose de 4080 Gy é ideal para a esterilização de blocos dentais. Já em 2000, CLARKE *et al.* testaram esta dose em blocos de dentina cariada e observaram crescimento bacteriano em um dos espécimes do grupo irradiado. Partindo do princípio que testes realizados, seguindo os parâmetros recomendados pela AFNOR, só permitem resultados positivos em dois espécimes numa amostra de 100, o resultado positivo em 1 espécime dentre 15 é bastante significativo, ainda adicionado ao fato de não terem sido usadas as condições ideais de testes de esterilidade. Apesar deste resultado, os autores ainda consideraram a radiação gama, aplicada nesta dose, efetiva para a esterilização de blocos de dentina.

Para esterilização com radiação gama, diferentes doses são indicadas para diferentes biocargas. O processo de validação consiste na execução de procedimentos conjuntos, que são: determinação da biocarga; determinação da dose adequada para aquela biocarga, escolhendo-se o nível de confiança que se deseja, e execução de testes de esterilidade em uma amostra representativa do produto submetido ao processo (ISO 11137, 1995).

No presente estudo, a média de biocarga encontrada em terceiros molares humanos armazenados em solução de NaCl a 0,9% foi de $5,8 \times 10^6$. Uma média aproximadamente 5 vezes maior que o maior valor previsto na tabela da ISO 11137:1995

que corresponde a um valor de média de biocarga de aproximadamente $1,01 \times 10^6$. Pela tabela, para a obtenção de um nível de esterilização ótimo, 10^{-6} (padrão aceito internacionalmente), é indicada a dose de 36,4 kGy, já um nível de confiança de 10^{-3} (nível aceito em alguns países, como por exemplo o Canadá) a dose indicada é de 24,9 kGy. Estes valores são valores considerados bastante altos, o que implica na utilização de grandes tempos de irradiação e, conseqüentemente, aumento de custos e possíveis danos às estruturas irradiadas. Levando em consideração que a contaminação bacteriana observada nesta pesquisa excedeu em muito o maior valor previsto pela ISO, 1995, não foi considerada plausível a realização de um processo de validação de uma dose tão alta para a esterilização dental, uma vez que para a esterilização de produtos médicos e hospitalares é freqüentemente usada a dose de 25 kGy. Em decorrência disto e do fato de que a grande maioria das pesquisas que se utilizaram da radiação gama para a esterilização dental usaram a dose de 25 kGy (CHANDLER, 1990; TITLEY *et al.*, 1998; SØNJU CLASEN *et al.*, 1997; AMAECHI *et al.*, 1998, 1999a), as fases seguintes deste estudo foram realizadas com a utilização de uma dose de 25 kGy. Outra justificativa seria a possibilidade de uso de substâncias antimicrobianas antecedendo o processo de esterilização, possibilitando assim, processos de esterilização com doses de radiação mais baixas.

5.2.FASE II

Os resultados relacionados aos efeitos da radiação gama sobre a microdureza de superfície do esmalte dental humano obtidos neste estudo corroboram os encontrados por JANSMA *et al.* (1988), usando raio-X e dose de 70 Gy, e CHANDLER em 1990, usando radiação gama e dose de 25 kGy, que não observaram mudanças na microdureza de superfície de esmalte dental bovino irradiado. É válido ressaltar, que por objetivar a proteção de voluntários de estudos *in situ* nos quais são realizados testes de cariogenicidade intra-bucais, CHANDLER executou a esterilização de blocos polidos de esmalte bovino, diferentemente do que foi feito nesta pesquisa, onde a irradiação foi aplicada sobre metades dentais.

Em experimentos anteriores (AMAECCHI *et al.*, 1998, 1999a, 1999b), foi relatada uma alteração de cor sofrida pelo esmalte dental irradiado com radiação gama, tendo esta sido atribuída, pelos autores, à desnaturação de componentes orgânicos presentes nas estruturas dentais. Pela análise visual das metades dentais, foi constatada uma alteração de cor ligeiramente mais severa na estrutura na coroa dental que na superfície radicular irradiada. Considerações contrárias foram feitas no experimento realizado por WHITE *et al.* (1994), uma vez que não foram observadas mudanças na coloração de discos de dentina irradiados com radiação gama. Tal resultado pode advir do fato de que as doses utilizadas pelos autores foram bem inferiores à utilizada neste estudo. A maior relevância desta observação é que não é cabível que sejam feitas inferências sobre possíveis mudanças na coloração adamantina, uma vez que a alteração de cor sofrida pela coroa dental pode ser

resultado de desnaturação proteica sofrida pela dentina localizada sob o esmalte, pois o esmalte é uma estrutura translúcida. Por conseguinte, a realização de análises que identifiquem possíveis alterações de cor no esmalte é bastante dificultada, visto que sua coloração é freqüentemente dependente da coloração dentinária. Adicionalmente, estudos como os realizados por WIEMAN *et al.* (1972), ZACH *et al.* (1976) e JANSMA *et al.* (1988) não encontraram mudanças químicas ou estruturais no esmalte submetido à radiação ionizante, evidenciando que a alteração proteica pode ser o maior fator responsável pela mudança de cor da estrutura dental, uma vez que a dentina possui maior presença de proteínas na sua composição que o esmalte.

5.3. FASE III

O modelo experimental de ciclagem de desmineralização-rem mineralização utilizado (adaptado de FEATHERSTONE *et al.*, 1986) simula um alto desafio cariogênico, apesar da incorporação de flúor na solução desmineralizadora. As três horas de imersão em solução desmineralizadora corresponderam ao tempo total diário em que ocorreria acidez bucal abaixo do pH crítico de dissolução do esmalte, decorrente da fermentação de carboidratos consumidos em alta frequência pelo indivíduo. Já a imersão em solução remineralizadora por aproximadamente 21 horas representou, *in vitro*, o período de remineralização promovido pela saliva. Além de simular o processo de cárie dental ocorrido em ambiente bucal, este modelo de ciclagem de pH tem ainda como vantagem, permitir alterações nas suas condições, a fim de simular situações favoráveis à desmineralização ou remineralização obtidas com a variação da frequência e amplitude dos ciclos de pH. O flúor foi adicionado às soluções des e remineralizadora (ARGENTA, 2001), com o intuito de reduzir a microcavitação superficial provocada pelo ácido na superfície do bloco e permitir a leitura de microdureza sub-superficial no esmalte dental. A diminuição do número de horas de desmineralização, previamente empregada por TEN CATE & DUIJSTERS (1982) e ARGENTA (2001) também teve o mesmo objetivo. A leitura da microdureza em camadas bem próximas à superfície permitiu a mensuração de possíveis alterações provocadas pela radiação, mesmo que estas ocorressem em profundidades tão pequenas quanto 10 µm.

Não foram encontrados relatos na literatura de análise de esmalte irradiado submetidos a modelos de ciclagem de pH. No entanto, o comportamento do esmalte irradiado foi similar ao encontrado em estudos anteriores como os de WALKER (1975); AMAECHI *et al.* (1998, 1999b) nos quais não houve relatos de diferenças significativas na solubilidade do esmalte irradiado e não irradiado frente a desafios ácidos estáticos. Os resultados contrários encontrados por JERVØE (1969) podem ser decorrentes do fato de não ter sido executado no experimento, nenhum procedimento de desmineralização dental. O autor apenas fez inferências que a mudança estrutural observada nos cristais de hidroxiapatita do esmalte e dentina irradiados aumentaria a solubilidade dental e por conseguinte seria a causa do aumento de prevalência de cáries em pacientes submetidos à radioterapia.

Por outro lado, vários são os fatores que podem explicar a diferença de comportamento entre blocos de esmalte planejados e não planejados. A maior resistência ao desenvolvimento de cáries apresentada pela superfície do esmalte, quando comparada a porções mais internas desta estrutura, tem sido atribuída a distribuição de elementos constituintes do esmalte dental, ao maior conteúdo mineral do esmalte superficial e, ainda, a presença, em dentes não erupcionados, de películas orgânicas de origem embriológica.

A distribuição de mineral, água e matéria orgânica no interior do esmalte dental não é uniforme, mas está relacionada a sua microanatomia e ultraestrutura. As variações observadas na composição do esmalte em diferentes regiões implicam em comportamentos físico-químicos distintos desta estrutura, frente a um mesmo desafio ácido. Portanto, a

maior desmineralização observada nos blocos que sofreram planificação e polimento, pode ser explicada pela remoção da camada mais superficial do esmalte. Camada esta, que possui maior concentração de flúor na sua composição (WEATHERELL *et al.*, 1972; WEATHERELL *et al.*, 1973; ROBINSON *et al.*, 1983) apresentando por conseguinte, a interferência deste íon nos fenômenos de des e remineralização do processo de cárie e ou na estabilidade do cristal de hidroxiapatita. Um outro mineral relacionado à solubilidade do esmalte é o carbonato, que, quando presente, pode ser responsável pela maior instabilidade do centro do cristal de hidroxiapatita tornando-o mais solúvel (BACHRA *et al.*, 1965). Diferentemente do que acontece com o flúor, sua concentração aumenta da superfície do esmalte para o seu interior (WEATHERELL *et al.*, 1968; BESIC *et al.*, 1970), provavelmente deixando mais solúvel o esmalte mais profundo.

Outro fator que pode estar relacionado a maior desmineralização decorrente da remoção da camada mais superficial do esmalte seria a remoção da camada de esmalte aprismático, relatada por RIPA *et al.* (1966), GWINNETT, (1967), GWINNETT, (1973), KODAKA *et al.* (1991), GWINNETT (1992). Nesta camada, a natureza paralela dos cristais de hidroxiapatita e a resultante falta de limite entre os prismas tornam o esmalte superficial mais mineralizado que o esmalte prismático subsuperficial, aumentando a resistência da superfície à desmineralização.

Películas orgânicas tais como a membrana de Nasmyth podem permanecer na superfície do esmalte de dentes não erupcionados após a sua exodontia (JENKINS, 1978). Em dentes erupcionados esta estrutura é facilmente perdida através do atrito dental na

mastigação e também na escovação. No entanto, em dentes retidos extraídos, a película embrionária pode permanecer exercendo um efeito protetor da estrutura dental. Sua presença pode funcionar como uma barreira à difusão de ácidos, fenômeno que tenderia a retardar a desmineralização, pela diminuição da concentração do agente desmineralizante (WHITE, 1976).

Assim sendo, não se constatou efeito significativo da irradiação com radiação gama no esmalte dental tendo este sido planificado ou não. Trabalhos adicionais sobre o efeito da radiação sobre os substratos dentais num modelo *in situ* podem fornecer dados complementares para avaliação mais ampla do comportamento de dentes irradiados frente a desafios cariogênicos.

6. CONCLUSÃO

- Dentes humanos armazenados em solução salina apresentam uma alta carga bacteriana exigindo para sua esterilização uma dose de radiação gama igual ou superior a dose de 25 kGy;
- A dose hospitalar de radiação gama promoveu alteração de cor na estrutura dental, porém não interferiu na microdureza de superfície e nem na resistência à produção de cárie *in vitro* do esmalte dental humano.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ADELSON, L.J. *et al.* *In vitro* cytotoxicity of periodontally diseased root surfaces. **J Periodontol**, Chicago, v. 51, n. 12, p. 700-704, Dec. 1980.

ALTERTHUM, F.; CARVALHAL, M.L. Crescimento Bacteriano. Controle dos microorganismos. *In*: TRABULSI, L.R. *et al.* **Microbiologia**. 3.ed. São Paulo: Atheneu, 1999. cap. 4,7, p. 47-54, 75-86.

AMAECHEI, B.T.; HIGHAM, S.M.; EDGAR, W.M. Efficacy of sterilisation methods and their effect on enamel demineralisation. **Caries Res**, Basel, v. 32, n. 6, p. 441- 446, 1998.

AMAECHEI, B.T.; HIGHAM, S.M.; EDGAR, W.M. Effect of sterilization methods on the structural integrity of artificial enamel caries for intra-oral cariogenicity tests. **J Dent**, Oxford, v. 27, n. 4, p. 313-316, May. 1999a.

AMAECHEI, B.T.; HIGHAM, S.M.; EDGAR, W.M. The use of gamma irradiation for the sterilization of enamel for intra-oral cariogenicity tests. **J Oral Rehabil**, Oxford, v. 26, p. 809-813, Oct. 1999b.

ARENDS, J.; TEN BOSCH, J.J. Demineralization and remineralization evaluation techniques. **J Dent Res**, Washington, v. 71, Special Issue, p. 924-928, Apr. 1992.

ARGENTA, R.M.O. Estudo *in vitro* da eficiência anticárie de uma formulação de dentifício contendo NaF e CaCO₃. Piracicaba: Faculdade de Odontologia de Piracicaba; UNICAMP, 2001. **Relatório Científico- FAPESP**. Proc. 99/12229-3.

* Baseada na NBR-6023 de ago. de 2000, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). Abreviatura dos títulos dos periódicos em conformidade com o MEDLINE.

ASSAD, D.A. *et al.* Biologic preparation of diseased root surfaces. An *in vitro* study. **J Periodontol**, Chicago, v. 58, n. 1, p. 30-33, Jan. 1987.

ASSOCIAÇÃO PAULISTA DE ESTUDOS E CONTROLE DE INFECÇÃO HOSPITALAR- **APECHI**. Esterilização de Artigos em Unidades de Saúde. São Paulo, 1998.

ASSOCIATION FRANÇAISE DE NORMALISATION. **NF EN 552**: Stérilisation de dispositifs médicaux-validation et contrôle de routine pour la sterilization par irradiation. Paris, 1994a. 32f.

ASSOCIATION FRANÇAISE DE NORMALISATION. **NF EN 556**: Stérilisation de dispositifs médicaux-exigences pour les dispositifs médicaux étiquetés "stérile". Paris, 1994b. 25f.

ASSOCIATION FRANÇAISE DE NORMALISATION. **NF EN 1174-1**: Stérilisation de dispositifs médicaux-estimation de la population de micro-organismes sur un produit-partie 1: exigences. Paris, 1994c. 28f.

BACHRA, B.N.; TRAUTZ, O.R.; SIMON, S.L. The effect of magnesium and fluoride ions on the spontaneous precipitation of calcium carbonates and phosphates precipitation of calcium carbonates and phosphates. **Arch Oral Biol**, Oxford, v. 10, n. 10, p. 731-738, Sep./Oct.1965.

BARBOSA, S.V.; SAFAVI, K.E.; SPÅNGBERG, L.S.W. Influence of sodium hypochlorite on the permeability and structure of cervical human dentine. **Int End J**, London, v. 27, p. 309-312, Nov. 1994.

BELTING, C.M.; HABERFELD, G.C.; JUHL, L.K. Spread of organism from dental air rotor. J Am Dent Assoc, Chicago, v. 68, p. 34-37, May. 1964.

BESIC, F.C. *et al.* Detailed electron probe microanalysis of three teeth sections with early enamel caries. J Dent Res, Washington, v. 49, n. 1, p. 111-118, Jan./Feb. 1970.

BITTER, N.C. A scanning electron microscopy study of the effect of bleaching agents on enamel. J Prosthet Dent, Saint Louis, v. 67, n. 6, p. 852-855, Jun. 1992.

BOWEN, W.H. *et al.* The effect of partial desalivation on coronal and root surface caries in the rat. In: LEACH, S.A. Ed. Factors relating to demineralization and remineralization of the teeth. Oxford: IRL Press, 1986. p. 243-250.

BRASHEAR, A. *et al.* Ethylene oxide neurotoxicity: a cluster of 12 nurses with peripheral and central nervous system toxicity. Neurology, Cleveland, v. 46, n. 4, p. 992-998, Apr. 1996.

BUBEN, I. Problems associated with sterilization using ethylene oxide. Residues in treated materials. Cent Eur J Public Health, Prague, v. 7, n. 4, p. 197-202, Nov. 1999.

CHANDLER, N.P. Preparation of dental enamel for use in intraoral cariogenicity experiments. J Dent, Oxford, v. 18, n. 1, p. 54-58, Feb. 1990.

CLARKE, K.P.; SMITH, P.W.; HIGHAM, S.M. Sterilization of artificial caries lesions. Caries Res, Basel, v. 34, p. 332, 2000. Abstract, 71.

CORPRON, R.E.; MORE, F.G.; MOUNT, G. Comparison of fluoride by SIMS with mineral density of subsurface enamel lesions treated intra-orally with a fluoride-releasing device. J Dent Res, Washington, v. 71, Special Issue, p. 828-831, Apr. 1992.

CURY, J.A. Uso do flúor. *In*: BARATIERI, L.N. *et al.* **Dentística**: procedimentos preventivos e restauradores. 2.ed. São Paulo: Santos, 1992. cap. 2, p. 43-67.

DAMATO, F.A.; STRANG, R.; STEPHEN, K.W. Effect of fluoride concentration on remineralization of carious enamel: an *in vitro* pH-cycling study. **Caries Res**, Basel, v. 24, n. 3, p. 174-180, 1990.

ESTRELA, C. *et al.* Antimicrobial evaluation of calcium hydroxide in infected dentinal tubules. **J Endod**, Baltimore, v. 25, n. 6, p. 416-418, Jun. 1999.

FARMACOPÉIA Brasileira. 4.ed. São Paulo : Atheneu, 1988. v.5.1.1.6p.

FEATHERSTONE, J.D.B. *et al.* Comparison of artificial caries-like lesions by quantitative microradiography and microhardness. **Caries Res**, Basel, v. 17, n.5, p. 385-391, Sept./Oct. 1983.

FEATHERSTONE, J.D.B. *et al.* Enhancement of remineralisation *in vitro* and *in vivo*. *In*: LEACH, S.A Ed. **Factors relating to demineralisation and remineralisation of the teeth**. Oxford: IRL Press, 1986. p. 23-34.

FEATHERSTONE, J.D.B. *et al.* Carbon dioxide laser effects on caries-like lesions of dental enamel. **Lasers in Orthopedic, Dental and Veterinary Medicine**, Los Angeles, v. 1424, p. 145-149. Jan. 1991.

FEATHERSTONE, J.D.B. Consensus conference on intra-oral models: evaluation techniques **J Dent Res**, Washington, v. 71, Special Issue, p. 955-956, Apr. 1992.

FERREL, M. *et al.* Ethylene oxide on electrophysiology catheters following reesterilization: implications for catheters reuse. **Am J Cardiol**, New York, v. 80, n. 12, p. 1558-1561, Dec. 1997.

FORSS, H.; SEPPÄ, L. Prevention of enamel demineralization adjacent to glass ionomer fillings materials. **Scand J Dent Res**, Copenhagen, v. 98, n. 2, p. 173-178, Apr. 1990.

GERRARD, W.A.; WINTER, P.J. Evaluation of toothpastes by their ability to assist rehardening of enamel *in vitro*. **Caries Res**, Basel, v. 20, n. 3, p. 209-216, 1986.

GIBBS, C.D. Effect of low levels of fluoride on calcium up take by demineralized human enamel. **Arch Oral Biol**, Oxford, v. 40, n. 9, p. 879-881, Sep. 1995.

GUNNAR, R.; FOLEY, D.E.; FAIRHURST, C.W. Micro-indentation hardness. **J Dent Res**, Washington, v. 40, n. 6, p. 1116-1125, Nov./Dec. 1961.

GWINNETT, A.J. The ultrastructure of the "prismless" enamel of permanent human teeth. **Arch Oral Biol**, Oxford, v. 12, n. 3, p. 381-388, Mar. 1967.

GWINNETT, A.J. Human prismless enamel and its influence on sealant penetration. **Arch Oral Biol**, Oxford, v. 18, n. 3, p. 441-444, Mar. 1973.

GWINNETT, A.J. Structure and composition of enamel. **Oper Dent** Seattle, v. 5, n. 10, p.17, 1992.

HODGE, H.C. Hardness tests on teeth. **J Dent Res**, Washington, v. 15, p. 271, 1936.

HORSTED, P.; FEJERSKOV, O.; JOHANNAESEN, G. A model for experimental endodontics by transplantating human dental roots subcutaneously to rats. **Scand J Dent Res**, Copenhagen, v. 88, n. 5, p. 412-417, Oct. 1980.

HOUSE, C.; HOUSE, J.A.; YELDOUTSCHNIG, R.J. Inactivation of viral agents in bovine serum by gamma radiation. **Can J Microbiol**, Ottawa, v. 36, p. 737-740, 1990.

INABA, D. *et al.* The effects of a sodium hypochlorite treatment on demineralized root dentin. **Eur J Oral Sci**, Copenhagen, v. 103, n. 6, p. 368-374, Dec. 1995.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 11137**: Sterilization of health care products - Requirements for validation and routine control - Radiation sterilization. Switzerland, 1995. 66p.

JANSMA, J. *et al.* The effect of x-ray irradiation on the demineralization of bovine dental enamel. A constant composition study. **Caries Res**, Basel, v. 22, n. 4, p. 199-203, 1988.

JENKINS, G.N. Pellicle, plaque and calculus. *In*: JENKINS, G.N **The Physiology and Biochemistry of the Mouth** 4.ed. Oxford: Blackwell scientific publications. 1978. cap. 10, p. 360-413.

JERVØE, P. X-ray diffraction investigation on the effect of experimental and *in situ* radiation on mature human teeth: a preliminary report. **Acta Odontol Scand**, Oslo, v. 28, n. 5, p. 623-631, Nov. 1969.

JOYSTON-BECHAL, S. The effect of x-radiation on the susceptibility of enamel to an artificial caries-like attack *in vitro*. **J Dent**, Oxford, v. 13, n. 1, p. 41-44, Mar. 1985.

KAWASAKI, K.; FEATHERSTONE, J.D.B. Effects of collagenase on root demineralization. **J Dent Res**, Washington, v. 76, n. 1, p. 588-595, Jan. 1997.

KODAKA T.; KUROIWA,M.; HIGASHI,S. Structural and distribution patterns of surface 'prismless' enamel in human permanent teeth. **Caries Res**. Basel, v. 25, n. 1, p. 7-20. 1991.

KOULOURIDES, T. *et al.* An intra-oral model used for studies of fluoride incorporation in enamel. **J Oral Pathol**, Copenhagen, v. 3, n. 4, p. 185-196, 1974.

LANDGRAF, M. Controle do desenvolvimento microbiano nos alimentos. *In*: FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. 3.ed. São Paulo: Atheneu, 1996. cap. 7. p. 151-166.

MEREDITH, N. *et al.* Measurement of the microhardness and young's modulus of human enamel and dentine using an indentation technique. **Arch Oral Biol**, Oxford, v. 41, n. 6, p. 539-545, Jun. 1996.

MILLER, R.L.; MICIK, R.E. Air pollution and its control in the dental office. **Dent Clin North Am**, Philadelphia, v. 42, p. 453-476, July. 1978.

OGAARD, B.; ROLLA, G.; ARENDS, J. *In vivo* progress of enamel and root surface lesions under plaque as a function of time. **Caries Res**, Basel, v. 22, n. 5, p. 302-305, 1988.

PAGNIANO, R.P. *et al.* Airbone microorganisms collected in a preclinical dental laborary. **J Dent Educ**, Washington, v. 49, n. 9, p. 653-655, Sep. 1985.

PANTERA, E.A.; SCHUSTER, G.S. Sterilization of extracted human teeth. **J Dent Educ**, Washington, v. 54, n. 5, p. 283-285, May. 1990.

PARSELL, D.E. *et al.* The effect of steam sterilization on the physical properties and perceived cutting characteristics of extracted teeth. **J Dent Educ**, Washington, v. 62, n. 3, p. 260-263, Mar. 1998.

PASHLEY, E.L.; TAO, L.; PASHLEY, D.H. Sterilization of human teeth: its effect on permeability and bond strength. **Am J Dent**, San Antonio, v. 6, n. 4, p. 189-191, Aug. 1993.

PEARCE, E.I. Effect of plaque mineralization on experimental dental caries. **Caries Res**, Basel, v. 16, n. 6, p. 460-471, 1982.

PEARCE, E.I.; GALLAGHER, I.H.C. The behaviour of sucrose and xylitol in an intra-oral caries test. **N Z Dent J**, Dunedin, v. 75, . n. 339, p. 8-14, Jan. 1979.

PELCZAR JÚNIOR, M. *et al.* **Microbiologia**: conceitos e aplicações. 2.ed. São Paulo: Makron Books, 1996. 524p.

RATHBUN, W.E. Esterilização e assepsia. *In*: NISENGARD, R.J.; NEWMAN, M.G. **Microbiologia oral e imunologia**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. cap. 32, p. 345-363.

REEVES, G.W. *et al.* Ethylene oxide sterilization of extrated human teeth. **J Dent Res**. Washington, v. 73, p. 427, 1994. Abstract, 2603.

RIPA, L.W.; GWINNETT, A.J. BUONOCORE, M.G. The "prismless" outer layer of deciduous and permanent enamel.. **Arch Oral Biol**, Oxford, v. 11, n. 1, p. 41-48, Jan. 1966.

ROBINSON, C.; WEATHERELL, J.A.; HALLSWORTH, A.S. Alterations in the composition of permanent human enamel during carious attack, *In*: LEACH, S.A.; EDGAR, W.M. Eds. **Demineralization and Remineralization of the Teeth**. Oxford: IRL Press, 1983, p. 209.

ROBINSON, C. *et al.* Effect of surface zone deproteinisation on the access of mineral ions into subsurface carious lesions of human enamel. **Caries Res**, Basel, v. 24, n. 4, p. 226-230, 1990.

SAILLENFAIT, A.M. *et al.* Developmental toxicity of the inhaled ethylene oxide in rats following short-duration exposure. **Fundam Appl Toxicol**, Orlando, v. 34, n. 2, p. 223-227, Dec. 1996.

SCHÄFER, F. Evaluation of the anticaries benefit of fluoride toothpastes using an enamel insert model. Caries Res, Basel, v. 23, n. 2, p. 81-86, 1989.

SHAFFER, S.E.; BARKMEIER, W.W.; GWINNETT, A.J. Effect of disinfection/sterilization on *in-vitro* enamel bonding. J Dent Educ, Washington, v. 49, n. 9, p. 658-659, Sep. 1985.

SHINKAI, R.S.; CURY, A.A.D.B.; CURY, J.A. *In vitro* evaluation of secondary caries development in enamel and root dentin around luted metallic restoration. Oper Dent, Seattle, v. 26, n. 1, p. 52-59, Jan./Feb. 2001.

SERRA, M.C.; CURY, J.A. The *in vitro* effect of glass-ionomer cement restoration on enamel subjected to a demineralization and remineralization model. Quintessence Int, Berlin, v. 23, n. 2, p. 143-147, Feb. 1992.

SØNJU CLASEN, A.B. *et al.* Caries development in fluorited and non-fluorited deciduous and permanent enamel *in situ* examined by microradiography and confocal laser scanning microscopy. Adv Dent Res, Washington, v. 11, p. 442-411, 1997.

SULLIVAN, R.J. *et al.* Intra-oral comparison and evaluation of the ability of fluoride dentifrices to promote the remineralization of caries-like lesions in dentin and enamel. J Clin Dent, Yardley, v. 6, n. 2, p. 135-138, 1995.

TATE, W.H.; WHITE, R.R. Disinfection of human teeth for educational purposes. J Dent Educ, Washington, v. 55, n. 9, p. 583-585, 1991.

TEN BOSH, J.J.; ANGMAR-MÅNSSON, B. A review of quantitative methods for studies of mineral content of intra-oral incipient caries lesions. J Dent Res, Washington, v. 70, n. 1, p. 2-14, Jan. 1991.

TEN CATE, J.M.; DUIJSTERS, P.P.E. Alternating demineralization and remineralization of artificial enamel lesions. **Caries Res**, Basel, v. 16, p. 201-210, 1982.

TEN CATE, J.M.; BUIJIS, M.J.; DAMEN, J.J.M. The effects of GIC restorations on enamel and dentin demineralization and remineralization. **Adv Dent Res**, Washington, v. 9, n. 4, p. 384-402, Dec. 1995.

TITLEY, K.C. *et al.* The effect of various storage methods and media on shear-bond strengths of dental composite resin to bovine dentine. **Archs Oral Biol**, Oxford, v. 43, n. 4, p. 305-311, Apr. 1998.

TORO, M.J. In vitro fluoride dose-response study of sterilized enamel lesions. **Caries Res**, Basel, v. 34, p. 246-253, 2000.

WALKER, R. Direct effect of radiation on the solubility of human teeth *in vitro*. **J Dent Res**, Washington, v. 54, n. 4, p. 901, July./Aug. 1975.

WEATHERELL, J.A.; ROBINSON, A.; HILLER, C.R. Distribution of carbonate in thin sections of dental enamel. **Caries Res**, Basel, v. 21, n. 1, p. 1-9, 1968.

WEATHERELL, J.A.; ROBINSON, C.; HALLSWORTH, A.S. Changes in the fluoride concentration of the labial enamel surface with age. **Caries Res**, Basel, v. 6, n. 4, p. 312-324, 1972.

WEATHERELL, J.A.; HALLSWORTH, A.S.; ROBINSON, C. Effect of the tooth wear in the distribution of fluoride in the enamel surface of human teeth. **Arch Oral Biol**, Oxford, v. 18, n. 9, p. 1175-1189, Sep. 1973.

WEFEL, J.S. Root caries histopathology and chemistry. **Am J Dent**, San Antonio, v. 7, n. 5, p. 261-265, Oct. 1994.

WHITE, D.J. The comparative sensitivity of intra-oral, *in vitro*, and animal models in the 'profile' evaluation of topical fluorides. **J Dent Res**, Washington, v. 71, Special Issue, p. 884-894, Apr. 1992.

WHITE, R.R. The Acquired Enamel Integuments: Pellicle, Plaque and Calculus. *In*: LAZZARI, E.P. **Dental Biochemistry**, 2.ed. Philadelphia: lea & Febiger, 1976, cap. 13. p. 243-273.

WHITE, J.M. *et al.* Sterilization of teeth by gamma radiation. **J Dent Res**, Washington, v. 73, n. 9, p. 1560-1567, Sep. 1994.

WHITE, R.R.; HAYS, G.L. Failure of ethylene oxide to sterilize extracted human teeth. **Dent Mater**, Oxford, v. 11, p. 231-233, July. 1995.

WIEMAN, M.R.; DAVIS, M.K. BESIC, F.C. Effect of X-radiation on enamel solubility. **J Dent Res**, Washington, v. 51, n. 3, p. 868, May./Jun., 1972.

ZACH, G.A. X-ray diffraction and calcium-phosphorus analysis of irradiated human teeth. **J Dent Res**, Washington, v. 55, n. 5, p. 907-909, Sep./Oct. 1976.

ANEXOS



UNICAMP

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
CERTIFICADO



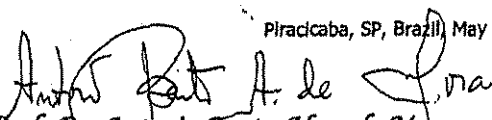
Certificamos que o Projeto de pesquisa intitulado "ANÁLISE DA EFETIVIDADE DA RADIAÇÃO GAMA NA ESTERILIZAÇÃO DENTAL E DE SEU EFEITO SOBRE O ESMALTE HUMANO", sob o protocolo nº 059/2001, da Pesquisadora **Lidiany Karla Azevedo Rodrigues**, sob a responsabilidade dos Profs. Drs. **Marinês Nobre dos Santos Uchoa** e **Jaime Aparecido Cury**, está de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS, de 10/10/96, tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa - FOP.

Piracicaba, 02 de maio de 2001

We certify that the research project with title "ANALYSIS OF THE EFFECTIVENESS OF THE GAMMA RADIATION IN DENTAL STERILIZATION AND OF YOUR EFFECT ON THE HUMAN ENAMEL", protocol nº 059/2001, by Researcher **Lidiany Karla Azevedo Rodrigues**, responsibility by Prof. Dr. **Marinês Nobre dos Santos Uchoa** and **Jaime Aparecido Cury**, is in agreement with the Resolution 196/96 from National Committee of Health/Health Department (BR) and was approved by the Ethical Committee in Research at the Piracicaba Dentistry School/UNICAMP (State University of Campinas).

Piracicaba, SP, Brazil, May 02 2001


Prof. Dr. **Pedro-Luiz Rosalen**
Secretário
CEP/FOP/UNICAMP


Prof. Dr. **Antonio Bento Alves de Moraes**
Coordenador
CEP/FOP/UNICAMP

ANEXO I

ANEXO 2

Table B.1 — Radiation dose (kGy) required to achieve given SAL for different bioburdens having standard distribution of resistances (Tabulated values are used in Stages 3, 4 and 5 of Method 1 of dose setting)

Average bioburden	Sterility Assurance Level					Average bioburden	Sterility Assurance Level				
	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶		10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
0.053	1.0	2.6	4.6	7.4	10.4	50.25	7.1	10.1	13.3	18.6	20.2
0.075	1.1	2.7	5.0	7.8	10.8	54.55	7.2	10.2	13.4	18.8	20.3
0.099	1.2	2.8	5.1	7.8	10.8	59.20	7.3	10.3	13.5	18.9	20.4
0.10	1.3	3.0	5.3	8.0	11.0	64.22	7.4	10.4	13.5	17.0	20.5
0.12	1.4	3.1	5.5	8.2	11.3	69.65	7.5	10.5	13.7	17.1	20.7
0.14	1.5	3.3	5.7	8.4	11.5	75.51	7.6	10.6	13.9	17.3	20.8
0.17	1.6	3.5	5.8	8.6	11.7	81.83	7.7	10.7	14.0	17.4	20.9
0.19	1.7	3.6	6.0	8.8	11.8	88.67	7.8	10.9	14.1	17.5	21.0
0.22	1.8	3.7	6.2	9.0	12.1	96.04	7.9	11.0	14.2	17.6	21.2
0.26	1.9	3.9	6.4	9.2	12.3	104.0	8.0	11.1	14.3	17.7	21.3
0.29	2.0	4.0	6.5	9.4	12.5	112.6	8.1	11.2	14.4	17.9	21.4
0.34	2.1	4.1	6.7	9.6	12.7	121.9	8.2	11.3	14.5	18.0	21.5
0.39	2.2	4.3	6.8	9.8	12.9	131.9	8.3	11.4	14.7	18.1	21.7
0.44	2.3	4.4	7.0	9.9	13.1	142.6	8.4	11.5	14.8	18.2	21.8
0.50	2.4	4.5	7.1	10.1	13.3	154.3	8.5	11.6	14.9	18.3	21.9
0.57	2.5	4.7	7.3	10.3	13.5	166.8	8.6	11.7	15.0	18.5	22.0
0.65	2.6	4.8	7.5	10.4	13.6	180.3	8.7	11.8	15.1	18.6	22.2
0.73	2.7	4.9	7.6	10.6	13.8	194.6	8.8	11.9	15.2	18.7	22.3
0.83	2.8	5.1	7.8	10.8	14.0	210.5	8.9	12.0	15.3	18.8	22.4
1.05	3.0	5.3	8.1	11.1	14.3	227.4	9.0	12.2	15.5	18.9	22.5
1.17	3.1	5.4	8.2	11.2	14.5	245.8	9.1	12.3	15.6	19.0	22.7
1.32	3.2	5.6	8.3	11.4	14.7	265.2	9.2	12.4	15.7	19.2	22.8
1.47	3.3	5.7	8.5	11.5	14.9	285.3	9.3	12.6	15.8	19.3	22.9
1.64	3.4	5.8	8.6	11.7	15.0	309.0	9.4	12.6	15.9	19.4	23.0
1.83	3.5	6.0	8.8	11.9	15.1	333.4	9.5	12.7	16.0	19.5	23.1
2.04	3.6	6.1	8.9	12.0	15.3	359.7	9.6	12.8	16.1	19.6	23.3
2.27	3.7	6.2	9.0	12.2	15.5	386.6	9.7	12.9	16.2	19.8	23.4
2.51	3.8	6.3	9.2	12.3	15.6	414.4	9.8	13.0	16.4	19.9	23.5
2.79	3.9	6.4	9.3	12.4	15.8	451.1	9.9	13.1	16.5	20.0	23.6
3.09	4.0	6.6	9.4	12.6	15.9	486.3	10.0	13.2	16.6	20.1	23.7
3.42	4.1	6.7	9.6	12.7	16.1	524.2	10.1	13.3	16.7	20.2	23.9
3.77	4.2	6.8	9.7	12.8	16.2	564.9	10.2	13.4	16.8	20.3	24.0
4.17	4.3	6.9	9.8	13.0	16.4	605.6	10.3	13.5	16.9	20.5	24.1
4.60	4.4	7.0	10.0	13.1	16.5	655.6	10.4	13.7	17.0	20.8	24.2
5.05	4.6	7.1	10.1	13.3	16.8	705.2	10.5	13.8	17.1	20.7	24.3
5.57	4.6	7.3	10.2	13.4	16.8	753.5	10.6	13.9	17.3	20.8	24.5
6.13	4.7	7.4	10.4	13.6	16.9	810.6	10.7	14.0	17.4	20.9	24.6
6.74	4.8	7.5	10.5	13.7	17.1	881.4	10.8	14.1	17.5	21.0	24.7
7.40	4.9	7.6	10.6	13.8	17.2	940.7	10.9	14.2	17.6	21.1	24.8
8.12	5.0	7.7	10.7	14.0	17.4	1021	11.0	14.3	17.7	21.3	24.9
8.91	5.1	7.8	10.9	14.1	17.5	1099	11.1	14.4	17.8	21.4	25.1
9.76	5.2	8.0	11.0	14.2	17.8	1162	11.2	14.5	17.9	21.5	25.2
10.69	5.3	8.1	11.1	14.4	17.8	1271	11.3	14.6	18.0	21.6	25.3
11.70	5.4	8.2	11.2	14.5	17.9	1397	11.4	14.7	18.2	21.8	25.4
12.90	5.5	8.3	11.4	14.6	18.1	1470	11.5	14.8	18.3	21.9	25.5
13.99	5.6	8.4	11.5	14.7	18.2	1591	11.6	14.9	18.4	22.0	25.7
15.28	5.7	8.5	11.8	14.9	18.3	1699	11.7	15.0	18.6	22.1	25.8
16.69	5.8	8.6	11.7	15.0	18.6	1827	11.8	15.1	18.6	22.2	25.9
18.21	5.9	8.8	11.8	15.1	18.5	1883	11.8	15.2	18.7	22.3	26.0
19.87	6.0	8.9	12.0	15.3	18.7	2109	12.0	15.3	18.8	22.4	26.1
21.66	6.1	9.0	12.1	15.4	18.8	2266	12.1	15.5	18.9	22.6	26.2
23.51	6.2	9.1	12.2	15.5	19.0	2435	12.2	15.8	19.0	22.7	26.4
25.72	6.3	9.2	12.3	15.6	19.1	2615	12.3	15.7	19.1	22.8	26.5
28.00	6.4	9.3	12.4	15.8	19.3	2803	12.4	15.8	19.3	22.9	26.6
30.48	6.5	9.4	12.6	15.9	19.4	3016	12.5	15.9	19.4	23.0	26.7
33.16	6.6	9.5	12.7	16.0	19.6	3238	12.6	16.0	19.5	23.1	26.8
35.95	6.7	9.7	12.8	16.1	19.8	3476	12.7	16.1	19.6	23.2	26.9
39.20	6.8	9.8	12.9	16.2	19.8	3731	12.8	16.2	19.7	23.3	27.1
42.60	6.8	9.9	13.0	16.4	19.9	4004	12.9	16.3	19.8	23.4	27.2
46.26	7.0	10.0	13.2	16.5	20.0	4297	13.0	16.4	19.9	23.6	27.3
						4611	13.1	16.5	20.0	23.7	27.4

ISO 11137:1995(E)

Average bioburden	Sterility Assurance Level					Average bioburden	Sterility Assurance Level				
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
4940	13.2	16.6	20.1	23.8	27.5	80629	17.8	20.8	24.6	28.3	32.1
5306	13.3	16.7	20.2	23.9	27.6	86142	17.4	21.0	24.7	28.4	32.3
5691	13.4	16.8	20.4	24.0	27.7	82025	17.5	21.1	24.8	28.5	32.4
6104	13.5	16.9	20.5	24.1	27.8	88961	17.6	21.2	24.9	28.6	32.5
6525	13.6	17.0	20.6	24.2	28.0	105000	17.7	21.3	25.0	28.8	32.8
7018	13.7	17.1	20.7	24.3	28.1	112140	17.8	21.4	25.1	28.9	32.7
7524	13.8	17.2	20.8	24.5	28.2	119780	17.9	21.5	25.2	29.0	32.8
8055	13.9	17.4	20.9	24.6	28.3	127690	18.0	21.6	25.3	29.1	32.9
8645	14.0	17.5	21.0	24.7	28.4	136560	18.1	21.7	25.4	29.2	33.0
9265	14.1	17.6	21.1	24.8	28.6	146810	18.2	21.8	25.5	29.3	33.1
9928	14.2	17.7	21.2	24.9	28.7	158670	18.3	21.9	25.6	29.4	33.3
10638	14.3	17.8	21.3	25.1	28.8	169180	18.4	22.0	25.7	29.5	33.4
11397	14.4	17.9	21.4	25.2	28.9	177410	18.5	22.1	25.8	29.6	33.5
12209	14.5	18.0	21.6	25.3	29.0	183350	18.6	22.2	25.9	29.7	33.6
13078	14.6	18.1	21.7	25.4	29.1	207110	18.7	22.3	26.1	29.8	33.7
14000	14.7	18.2	21.8	25.5	29.2	215710	18.8	22.5	26.2	29.9	33.8
15000	14.8	18.3	21.9	25.6	29.3	230220	18.9	22.0	26.3	30.1	33.9
16062	14.9	18.4	22.0	25.7	29.5	245690	19.0	22.7	26.4	30.2	34.0
17197	15.0	18.5	22.1	25.8	29.6	262110	19.1	22.8	26.5	30.3	34.1
18411	15.1	18.6	22.2	25.9	29.7	279660	19.2	22.9	26.6	30.4	34.2
19709	15.2	18.7	22.3	26.0	29.8	298370	19.3	23.0	26.7	30.5	34.3
21086	15.3	18.8	22.4	26.1	29.9	318310	19.4	23.1	26.8	30.6	34.5
22578	15.4	18.9	22.5	26.2	30.0	339580	19.5	23.2	26.9	30.7	34.6
24162	15.5	19.0	22.6	26.3	30.1	362200	19.6	23.3	27.0	30.8	34.7
25855	15.6	19.1	22.7	26.4	30.3	386320	19.7	23.4	27.1	30.9	34.8
27664	15.7	19.2	22.8	26.4	30.4	412030	19.8	23.5	27.2	31.0	34.9
29595	15.8	19.3	23.0	26.7	30.5	439420	19.9	23.6	27.3	31.1	35.0
31661	15.9	19.4	23.1	26.8	30.6	468690	20.0	23.7	27.4	31.2	35.1
33867	16.0	19.5	23.2	26.9	30.7	499890	20.1	23.8	27.5	31.3	35.2
36222	16.1	19.7	23.3	27.0	30.8	532810	20.2	23.9	27.6	31.5	35.3
38739	16.2	19.8	23.4	27.1	31.0	568060	20.3	24.0	27.7	31.6	35.4
41425	16.3	19.9	23.5	27.2	31.1	605690	20.4	24.1	27.8	31.7	35.5
44286	16.4	20.0	23.6	27.3	31.2	645690	20.5	24.2	28.0	31.8	35.7
47360	16.5	20.1	23.7	27.4	31.3	688310	20.6	24.3	28.1	31.9	35.8
50632	16.6	20.2	23.8	27.5	31.4	733710	20.7	24.4	28.2	32.0	35.9
54126	16.7	20.3	23.9	27.7	31.5	782060	20.8	24.5	28.3	32.1	36.0
57855	16.8	20.4	24.0	27.8	31.6	833540	20.9	24.6	28.4	32.2	36.1
61836	16.9	20.5	24.1	27.9	31.7	888370	21.0	24.7	28.5	32.3	36.2
66086	17.0	20.6	24.2	28.0	31.8	946746	21.1	24.8	28.6	32.4	36.3
70622	17.1	20.7	24.3	28.1	31.9	1008800	21.2	24.9	28.7	32.5	36.4
75463	17.2	20.8	24.5	28.2	32.0						

NOTE — The presence in table B.1 of high bioburden levels is not intended to imply that such levels are the norm.

B.3.4.1.2.3 Stage 3: Establish verification dose

To establish the verification dose, use one of the following (as determined in stage 2 above):

- highest batch average, if one or more batch average \geq overall average bioburden $\times 2$; or
- overall average bioburden, if each of the batch averages $<$ overall average bioburden $\times 2$.

Using table B.1, determine the verification dose based on the average bioburden (overall average bioburden or highest batch average). If the average bioburden is not given in the table, use the closest average bioburden number greater than the actual average bioburden.

NOTE 24 Table B.1 is designed to test for the resistance of the average bioburden of the sample to the sterilization process at a SAL of 10^{-2} . A sample may be the whole product unit or a portion of the product unit (SIP). If a portion of the product is tested, the bioburden for the portion of the sample (SIP bioburden) should be used to determine the verification dose.

ANEXO 3

TABELA . Médias da contaminação bacteriana em “ufc” encontradas nos dentes procedentes das clínicas especificadas.

Dente	Média de ufc
Clínica da rede privada de Piracicaba-SP	
A1	1,75E+06
A2	6,90E+06
A3	9,20E+06
A4	4,95E+06
A5	4,10E+06
A6	4,30E+06
Clínica da rede privada de Fortaleza-CE	
B1	4,40E+06
B2	6,70E+06
B3	7,10E+06
B4	7,30E+06
B5	5,20E+06
B6	7,75E+06
B7	8,68E+06
Centro de atendimento do serviço público	
C1	3,49E+06
C2	4,35E+06
C3	8,90E+06
C4	7,55E+06
C5	5,40E+06
C6	3,50E+06
C7	4,43E+06
Média da contaminação dos dentes	5,80E+06