



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto



Trabalho de conclusão de curso

Comparação de diferentes métodos de esterilização de dentes extraídos para a realização de ensaios *in vitro* e *in situ*

Aluna:

Letícia Paiva Barbosa de Oliveira

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP

Orientadora:

Prof. Dra. Aline Evangelista de Souza Gabriel

Professora Doutora do Departamento de Odontologia Restauradora

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP

Colaboradores:

Reinaldo Dias da Silva Neto

Aluno do Programa de Pós Graduação em Odontologia Restauradora

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto

Prof. Dr. Sérgio Luiz de Souza Salvador

Professor Doutor do Departamento de Análises Clínicas Toxicologia e Bromatologia.

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP

Ribeirão Preto

2018

LETÍCIA PAIVA BARBOSA DE OLIVEIRA

**Comparação de diferentes métodos de esterilização de dentes extraídos para realização de
ensaios *in vitro* e *in situ***

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Cirurgiã-dentista.

Orientadora: Prof^a Dr^a Aline Evangelista de Souza Gabriel

Ribeirão Preto

2018



Este trabalho de pesquisa foi realizado no Laboratório de Pesquisa em Dentística do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Análises Clínicas Toxicologia e Bromatologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto.

Dedicatória e Agradecimentos

DEDICATÓRIA

À Deus, que com sua infinita sabedoria, foi um importante guia e pilar na minha trajetória.

Aos meus pais, Heloisa e Roberval, que não mediram esforços para tornar esse sonho possível e sempre estiveram comigo em todos os momentos. Todo meu amor por vocês!

Aos meus amigos, que se colocaram a disposição para compartilhar minhas dores, tristezas e angústias com muita paciência e dedicação em cada momento.

Aos meus avós, que foram exemplo de força e luta.

A toda minha família, por todo o apoio e orientação dados durante todo esse tempo!
Eterna gratidão.

AGRADECIMENTOS

A Prof.^a Dr.^a Aline Evangelista de Souza Gabriel, por todo conhecimento compartilhado, pela orientação acadêmica e pela paciência. Sou grata por todo o auxílio na realização desse projeto e na minha formação profissional.

Ao Prof.^o Dr.^o Sérgio Luiz de Souza Salvador pela importante contribuição com o delineamento e execução desse projeto.

Ao Ms. Reinaldo Dias da Silva Neto, pessoa fundamental na realização desse projeto, por todo o esforço, paciência e pelos conhecimentos acadêmicos e de vida. Sou extremamente grata por toda calma e orientação em todos os momentos e por tudo que me ensinou, que contribuiu para minha formação profissional e principalmente pessoal.

A Laís Lima Pelozo, por compartilhar experiências que me auxiliaram na execução desse projeto, pelo auxílio e apoio dado.

*R*_{esumo}

Comparação de diferentes métodos de esterilização de dentes extraídos para a realização de ensaios *in vitro* e *in situ*

Resumo

Este estudo avaliou a eficácia de diferentes métodos de esterilização em raízes humanas para utilização em pesquisas *in vitro*. Quarenta raízes hígidas de incisivos inferiores tiveram o comprimento padronizadas em 10 mm e foram divididas em 4 grupos (n=10): micro-ondas a 650W durante 5 minutos; óxido de etileno por 3h; autoclave a 121°C durante 15 minutos e controle negativo (sem nenhum método de esterilização). As raízes foram imersas em água destilada estéril e submetidas aos tratamentos experimentais. Após a esterilização, as raízes foram individualmente transferidas para tubos de ensaio estéril identificado com 10 mL de meio de cultura BHI estéril. Cada tubo foi agitado em agitador por 1 minuto para homogeneização da amostra. Os tubos de ensaio que continham apenas caldo BHI e dentes sem esterilização (controle) foram incubados em condições de anaerobiose, enquanto os demais grupos experimentais foram incubados em condições de aerobiose. Os tubos de ensaio foram submetidos à incubação em estufa bacteriológica a 37°C por 14 dias. Após este período, foi observada a presença ou ausência de turvação, sendo que a presença de turvação indicava a presença de crescimento de micro-organismos. Após a análise de turvação, as raízes foram seccionadas em slices horizontais, obtendo-se 6 fragmentos de 2mm sendo que o primeiro slice de cada terço foi destinado ao teste de microdureza. Os dados da análise microbiológica foram expressos em porcentagem e os valores de microdureza foram avaliados por ANOVA a dois critérios (método de esterilização e terços radiculares) e teste de Tukey ($\alpha=0,05$). Verificou-se que o único método eficaz para a esterilização das raízes foi a autoclave (100%). Houve diferença significativa ($p<0,05$) na microdureza para os métodos de tratamento ($p<0,0001$) e *terço radicular* ($p=0,0041$), bem como para a interação deles ($p=0,0265$). Os maiores valores de microdureza ($p<0,05$) foram encontrados no grupo controle ($91,09 \pm 4,08$ a) e valores semelhantes ($p>0,05$) foram encontrados nos grupos micro-ondas ($66,69 \pm 9,43$ b), óxido de etileno ($71,42 \pm 9,61$ b) e autoclave ($73,53 \pm 15,02$ b). Os terços radiculares apresentaram diferença significativa ($p<0,05$): cervical > médio > apical. Pode-se concluir que a autoclave pode ser considerada eficiente para a esterilização de raízes humanas com 10 mm de comprimento, porém reduz a microdureza do dente.

Palavras-chave: dentes humanos extraídos, esterilização, autoclave, micro-ondas, óxido de etileno

*S*umário

SUMÁRIO

Introdução.....	19
Proposição.....	25
Material e Método.....	29
Resultados.....	37
Discussão.....	41
Conclusão.....	47
Referências Bibliográficas.....	51

*I*ntrodução

Na Odontologia, situações laboratoriais que simulem as condições do meio bucal, representam importante fator para o desenvolvimento das pesquisas (Mandarino et al., 2006). Os estudos *in vitro* e *in situ* são necessários para proporcionar suporte científico nas fases de desenvolvimento de novo material (DeWald et al., 1997; Gogineni et al., 2016). Para executá-los, normalmente, são utilizados dentes humanos ou bovinos, para reproduzir com mais fidelidade, a interação entre o material e a estrutura dental (Sandhu et al., 2012; Salem-Milani et al., 2015). Segundo as diretrizes da American Dental Association (ADA) e os Centros de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) todos os micro-organismos que sejam capazes de transmitir doenças devem ser completamente removidos antes dos materiais serem utilizados em pacientes (Dominici et al., 2001). Além disto, deve-se manter o mais próximo possível, a manutenção da normalidade do substrato para se atingir a reprodução mais aproximada das situações que ocorrem na cavidade bucal (Lee et al., 2007; Hashemipour et al., 2013)

O risco de infecção e contaminação ao manipular dentes extraídos é alto (Kumar et al., 2005; Lee et al., 2007; Hashemipour et al., 2013; Salem-Milani et al., 2015). Os principais problemas relacionados as pesquisas com dentes humanos extraídos são substratos altamente contaminados, dificuldade de esterilização e podem ter a morfologia danificada ou alterada por meio da esterilização (Hashemipour et al., 2013). Este fato pode ser explicado devido ao grande número de micro-organismos presentes nas estruturas que compõem o dente além da saliva e o biofilme (Kumar et al., 2005; Salem-Milani et al., 2015).

A desinfecção/esterilização pode ser considerada importante no controle de infecção cruzada e é definida como a destruição ou remoção de todas as formas de vida microbiana (Lee et al., 2007; Hashemipour et al., 2013; Gogineni et al., 2016). Com base nestas informações, deve-se identificar qual método de esterilização torne os dentes livre de micro-organismos sem modificar o esmalte ou as estruturas dentinárias (Dominici et al., 2001; Sandhu, et al., 2012).

A eficácia do método de esterilização depende de etapas prévias como a

descontaminação, pré-lavagem, lavagem, secagem e manipulação dos materiais. Falhas cometidas durante estes passos preliminares comprometem a eficácia da esterilização (Tijare et al., 2014; Gogineni et al., 2016). Dentre os métodos de desinfecção/esterilização que podem ser utilizadas do dente temos as substâncias líquidas, como a formalina 10%, o glutaraldeído, o PVPI, o álcool, o vinagre, o timol com solução salina, azida sódica e cloramina (Sandhu et al., 2012; Tijare et al., 2014). Outros métodos que podem ser empregados são a autoclave, a radiação gama, o gás de óxido de etileno, micro-ondas, além do congelamento dos dentes em água até o momento de uso (Viana et al., 2010; Hashemipour et al., 2013; Salem-Milani et al., 2015; Gogineni et al., 2016). A autoclave funciona através do rompimento da molécula de colágeno pelo calor úmido e pressão que pode afetar a ligação iônica entre o colágeno e a hidroxiapatita. Enquanto a estrutura molecular do colágeno não é afetada, causa ruptura das fibras colágenas e desnatura o componente orgânico da dentina (Salem-Milani et al., 2015; Attam et al., 2007)

O processo de esterilização no vapor de óxido de etileno é constituído de ciclos com gás de óxido de etileno e períodos de arejamento do material (Nogueira et al., 2009; Thomaz et al., 2007). A desvantagem é que o fragmento deve estar seco para o correto funcionamento, o que leva a desidratação da amostra (Nogueira et al., 2009; White; Hays et al., 1995).

Em estudos prévios foi possível observar que a irradiação por micro-ondas inicialmente é eficaz, sem levar alteração na morfologia celular, no entanto, se o tempo de exposição for prolongado leva a desintegração celular. Este efeito ocorre pelo aumento de temperatura, e pode também levar a um efeito de alterações celulares mais complexos que segundo os autores, ainda deve ser estudado. (Viana et al., 2013; Viana et al., 2010; Atmaca et al., 1996)

Estudos mostraram que o controle de infecção sobre os dentes extraídos podem afetar a permeabilidade dentinária e a resistência de união (Michaud et al., 2018; Chng et al., 2002; Deogade et al., 2016) ou ainda, afetar as propriedades químicas da dentina (Salem-Milani et al., 2015) e sua microdureza (Salem-Milani et al., 2015). Dentre os métodos pesquisados, a

autoclave apesar de eficiente no controle de micro-organismos, leva a redução significativa da microdureza (Salem-Milani et al., 2015). Portanto, existe a necessidade de se investigar o efeito dos procedimentos de esterilização em diferentes propriedades químicas e mecânicas dos dentes, antes de usá-los para fins educacionais ou de pesquisa (Salem-Milani et al., 2015).

Diante disto, o objetivo desse estudo foi avaliar a eficácia dos métodos de esterilização frequentemente utilizados em dentes humanos e avaliar os efeitos deste tratamento sobre a microdureza de dentes extraídos. No entanto, não se sabe ao certo qual método de esterilização e desinfecção pode ser adotado como protocolo para raízes humanas, a fim de proporcionar a eliminação de micro-organismos por maior intervalo de tempo sem causar riscos aos estudantes e participantes de pesquisas *in vitro* e *in situ*.

*P*roposição

O objetivo desse estudo foi avaliar a eficácia dos métodos de desinfecção/esterilização usados em dentes humanos e avaliar o efeito dos métodos de esterilização. Para tanto, o estudo possui o objetivo específico de analisar a:

- Eliminação de micro-organismos das raízes humanas, por meio de teste de microbiológico de turvação;
- Alteração da microdureza (KHN) da dentina após os diferentes métodos de esterilização.

*M*ateriais e métodos

Este estudo foi aprovado no Comitê de Ética da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil – FORP/USP (CAAE nº 37032114.1.0000.5419)

Delineamento experimental

Foi realizado um estudo *in vitro* com 40 raízes de incisivos inferiores humanos. As raízes foram divididas em 4 grupos, sendo uma delas o grupo controle negativo e 3 grupos experimentais. Dessa forma, o fator de estudo foi o *método de desinfecção/esterilização* em três níveis: micro-ondas a 650W durante 5 minutos; óxido de etileno por 3h e autoclave a 121°C durante 15 minutos. As variáveis resposta quantitativas foram: a eliminação de microorganismos após os diferentes métodos por meio de teste microbiológico de turvação e a alteração da microdureza (KHN) da dentina após os diferentes métodos de esterilização.

Preparo dos dentes

Quarenta incisivos centrais inferiores humanos hígidos, recém-extraídos, provenientes do Banco de Dentes da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto foram armazenados em solução de timol 0,1% a 9°C. Os dentes foram lavados em água corrente por 24 h para remoção dos traços da solução e, em seguida, submetidos à raspagem e limpeza com pedra pomes e água.

Os dentes foram analisados por meio de lupa estereoscópica (Nikon Inc. Instrument Group, Melville, NY, EUA) a fim de comprovar a ausência de defeitos estruturais e formação completa da raiz. Foram também radiografados para verificar a presença de único canal radicular e ausência de reabsorções internas ou calcificações

Secção dos dentes

Os dentes foram seccionados na junção amelo-cementária com discos acoplados à

máquina de corte (Isomet 1000; Buehler Ltda, Lake Bluff, Illinois, EUA), sob refrigeração, de modo a separar as porções coronárias e radiculares. O comprimento radicular ficou padronizando em 10 mm, checado com paquímetro de precisão (Digit CAL SM; Tesa Technology, Bugnon, Suíça) (Figura 1).

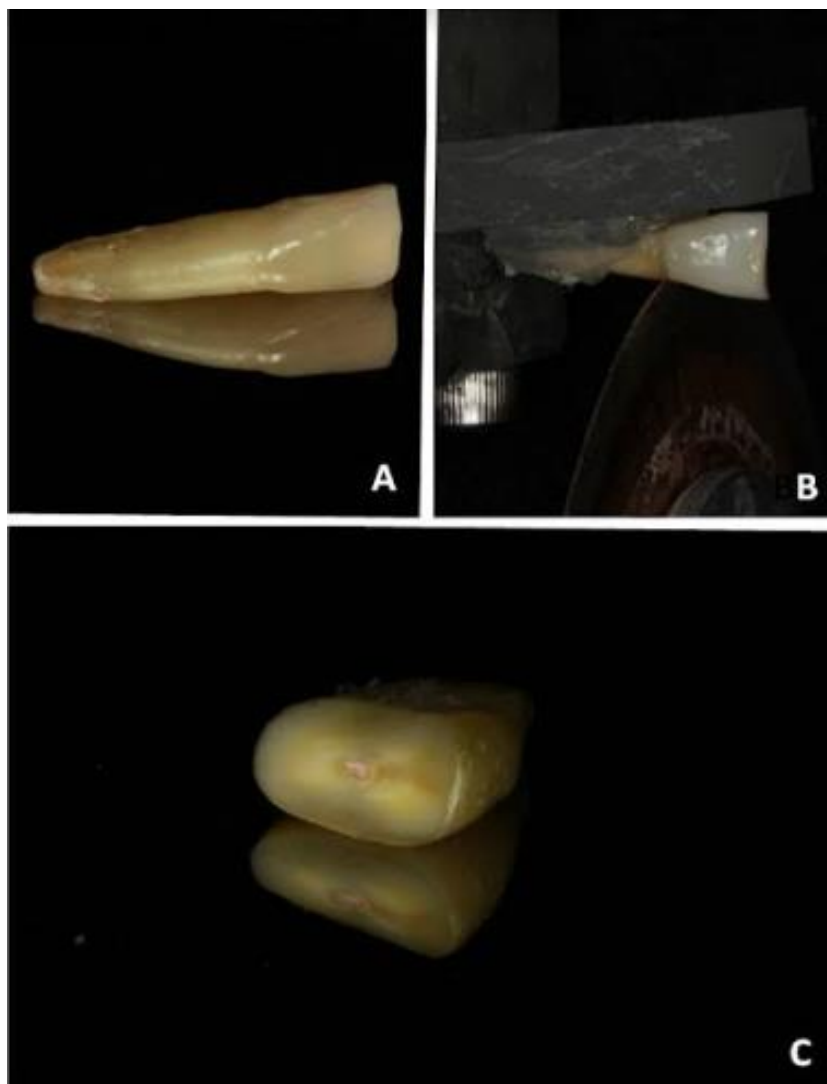


Figura 1. Secção das raízes: A) Incisivo inferior humano; B) Secção da raiz do incisivo na junção amelo-dentinária na máquina de corte; C) Fragmento de raiz com 10 mm de comprimento.

Esterilização das raízes dentais

As quarenta raízes dentais foram divididas em 4 grupos (n=10): controle negativo: sem nenhum método de esterilização; micro-ondas a 650W durante 5 minutos; óxido de etileno por 3h e autoclave a 121°C durante 15 minutos. Todas as raízes foram imersas em água destilada

estéril antes da esterilização.

As raízes foram individualmente transferidas para tubos de ensaio identificados contendo 10 mL de meio de cultura BHI estéril. Cada tubo foi agitado em agitador por 1 minuto. Os tubos de ensaio que continham apenas caldo BHI (controle) foram incubados em condições de anaerobiose, enquanto os demais foram incubados em condições de aerobiose. Os tubos de ensaio foram igualmente submetidos à incubação em estufa bacteriológica a 37°C por 14 dias. Após 14 dias, foi observada a presença ou ausência de turvação, sendo que a presença de turvação indicava a presença de crescimento de micro-organismos (Figuras 2, 3 e 4).

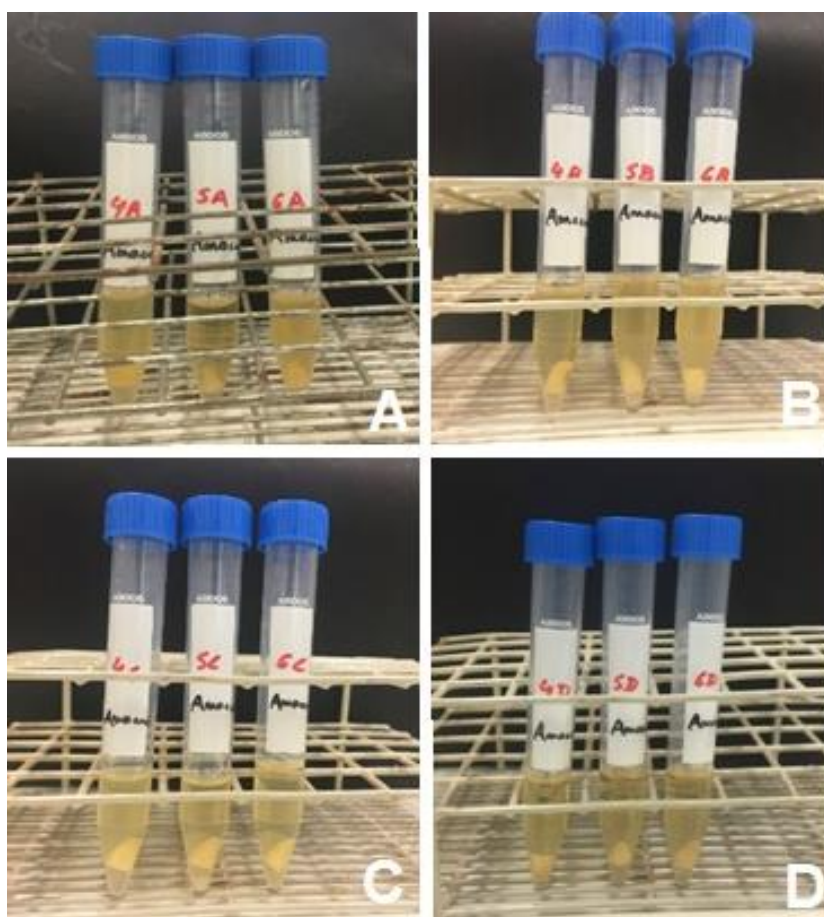


Figura 2. Raízes em tubo Falcon com caldo BHI separadas para atmosfera aerobiose: A) micro-ondas; B) Óxido de etileno; C) Autoclave; D) Controle.

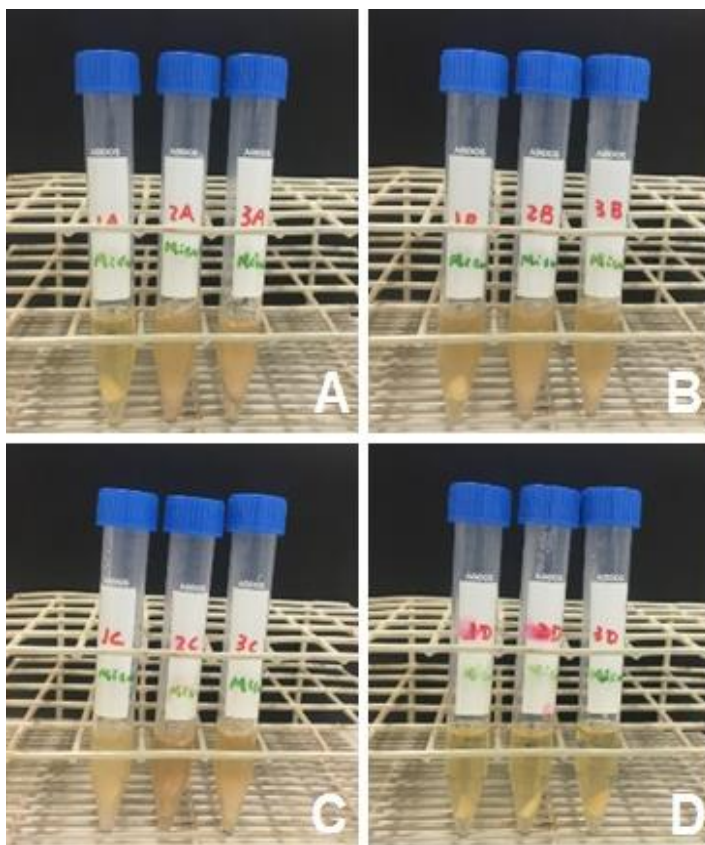


Figura 3. Raízes em tubo Falcon com caldo BHI separadas para atmosfera microaerobia. A) micro-ondas; B) Óxido de etileno; C) Autoclave; D) Controle.

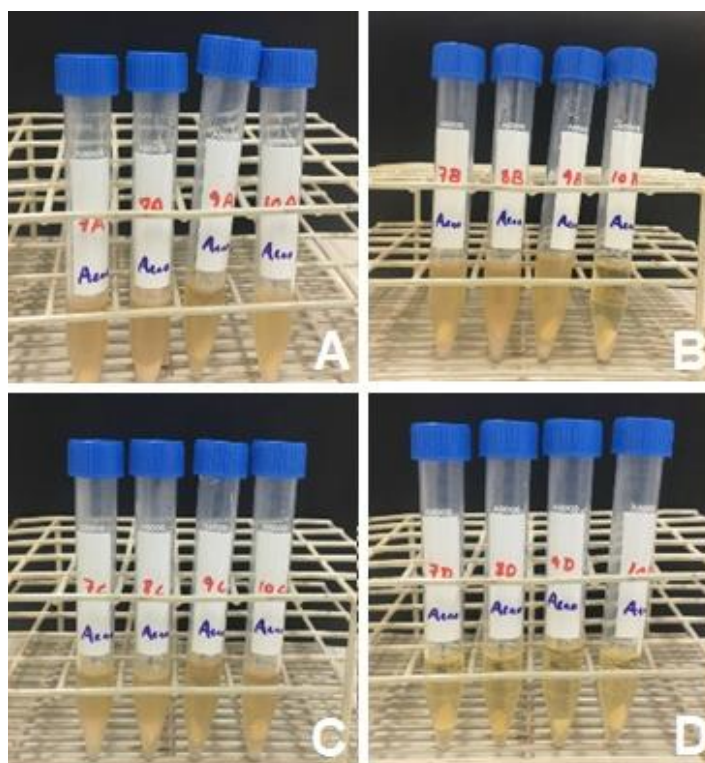


Figura 4. Raízes em tubo Falcon com caldo BHI separadas para atmosfera aeróbia. A) micro-ondas; B) Óxido de etileno; C) Autoclave; D) Controle.

Teste de microdureza

Após a análise de turvação, as raízes foram seccionadas com discos acoplados à máquina de corte (Isomet 1000; Buehler Ltda, Lake Bluff, Illinois, EUA), sob refrigeração, em slices horizontais, obtendo-se 6 fragmentos padronizados de 2mm, sendo que o primeiro slice de cada terço foi destinado ao teste de microdureza. A porção cervical de cada slice ficou voltada para o meio externo e os slices de cada terço tiveram o embutimento manual em canos de PVC de 2 cm com resina acrílica (Resina Acrílica Autopolimerizável Ortoclass, Clássico, São Paulo, Brasil). Em seguida, a superfície foi polida em Politriz giratória (Arotec, Cotia, SP, Brazil) refrigerada à água com lixas d'água de granulação 600 e 1200 (Hermes Abrasives Ltda., VA, EUA) por 30 segundos e pasta de alumina 0.3 e 0.5- μm (Arotec S/A Ind. Com., São Paulo, Brasil) em feltro polidor (ATM, Altenkirchen, Alemanha) por 1 minuto em cada pasta.

Após o polimento, os slices foram observados no microscópio óptico para verificar a lisura superficial e foram submetidos à limpeza em ultrassom por 10 minutos para a remoção dos debris. Na sequência foram submetidos ao teste de microdureza (Shimadzu HVM2, Newage Testing Instruments Inc., Southampom, PA, EUA). As impressões foram realizadas por ponta de diamante, mantendo o longo eixo do penetrador de diamante paralelo à superfície externa da dentina com carga estática de 25 g durante 10s em dentina, em profundidades de 30, 60 e 120 μm no centro do slice (Figura 5). Em cada profundidade de dentina, o teste de microdureza foi realizado três vezes e as médias foram tabuladas.

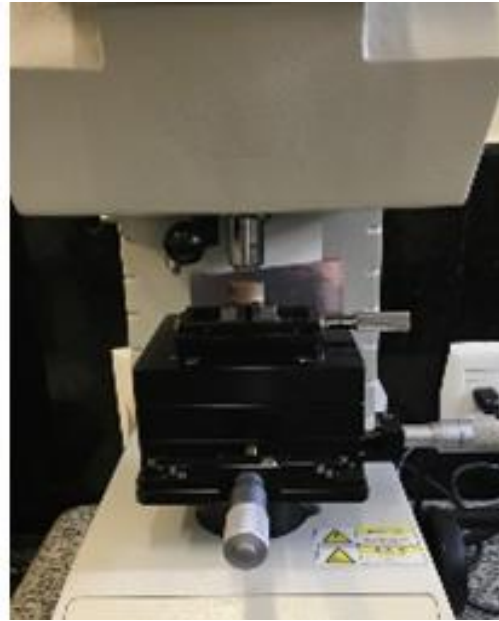


Figura 5. Microdurômetro Shimadzu HMV2 utilizado no experimento.

Forma de análise dos resultados

Os resultados obtidos com os teste microbiológicos foram expressos em porcentagem e os dados relacionados à microdureza foram analisados quanto a normalidade e homogeneidade da distribuição amostral (Shapiro-Wilk e Levene) e em seguida, testes paramétricos ANOVA e Tukey, com auxílio do software SPSS19 (SPSS Inc, Chicago, IL, EUA) ($p < 0,05$).

R *esultados*

1. Análise de turvação

A análise de turvação mostrou que nos grupos micro-ondas, óxido de etileno e controle houve turvação do meio, indicando a presença de micro-organismos em 90%, 80% e 100% das amostras, respectivamente. No grupo de raízes submetidas à autoclave não houve turvação (0%), indicando a ausência de micro-organismos viáveis. Os padrão de turvação em cada grupo está representado na tabela 1.

Tabela 1. Distribuição percentual (%) da turvação dos meios* após 14 dias, por meio de análise visual de turvação (n=10).

Grupos	Turvação do meio (%)
Micro-ondas	(9/10) 90%
Oxído de etileno	(8/10) 80%
Autoclave	(0/10) 0%
Controle	(10/10) 100%

* turvação dos meios indica a presença de micro-organismos

2. Microdureza KHN da dentina

Os dados foram analisados quanto a normalidade e a homogeneidade, respectivamente, pelos testes de Shapiro-Wilk e Levene ($\alpha=0,05\%$).

A Análise de Variância a dois critérios (métodos de esterilização e terços radiculares) mostrou diferença estatisticamente significativa para o fatores métodos de tratamento ($p<0,0001$) e *terço radicular* ($p=0,0041$), bem como para a interação deles ($p=0,0265$). Foi utilizado o teste complementar de Tukey para identificação das diferenças entre os grupos.

O controle apresentou maior média ($91,09 \pm 4,08$ a), estatisticamente superior ao micro-ondas ($66,69 \pm 9,43$ b), óxido de etileno ($71,42 \pm 9,61$ b) e autoclave ($73,53 \pm 15,02$ b).

Os maiores valores de microdureza da raiz foram encontrados nos terços cervical ($77,73 \pm 10,48$ a) e médio ($81,25 \pm 15,26$ a), estatiticamente semelhantes entre si ($p>0,05$). Os menores valores foram encontrados no terço apical ($68,06 \pm 12,50$ b).

A Tabela 2 contém as médias e desvios-padrões para a microdureza da dentina nos diferentes grupos experimentais.

Tabela 2 – Valores de média e desvio-padrão em KHN da microdureza KHN da dentina, considerando-se os diferentes métodos de esterilização testados.

Terço radicular	Micro-ondas	Óxido de etileno	Autoclave	Controle
Cervical	77,57 ± 19,74 Ba	75,25 ± 29,40 Ba	66,42 ± 22,49 Ba	91,70 ± 4,65 Aa
Médio	60,85 ± 18,75 Ba	78,52 ± 20,96 Ba	90,79 ± 19,29 Ba	94,83 ± 7,94 Aa
Apical	61,65 ± 8,71 Bb	60,49 ± 23,10 Bb	63,38 ± 9,68 Bb	86,73 ± 10,13 Ab

Letras maiúsculas indicam diferença estatisticamente significativa entre as colunas (método de esterilização) ($p < 0,05$).

Letras minúsculas indicam diferença estatisticamente significativa entre as linhas (terços radiculares) ($p < 0,05$).

Com relação a interação dos fatores, verificou-se que o controle apresentou maiores valores de microdureza nos terços cervical e médio ($p < 0,05$). Os menores valores foram encontrados para o micro-ondas, óxido de etileno e autoclave, nos terços cervical e médio.

D*iscussão*

Os estudos *in situ* e *in vitro* podem simular as alterações ocorridas no substrato dental no local que deveriam ser encontrados, apresenta resultados mais semelhantes e fidedignos (Barthel et al., 2002; Virtej et al., 2007; Baratieri et al., 2012; Tomás et al., 2013; Valentini et al., 2013; Padovani et al., 2014; Silva-Neto et al., 2018).

As pesquisas com dentes humanos podem ajudar a elucidar o comportamento de materiais e auxiliar no desenvolvimento de técnicas para tratamentos odontológicos. De acordo com o protocolo do CDC, os dentes extraídos devem ser esterilizados para fins educacionais ou de pesquisa (Salem-Milani et al., 2015). O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de diferentes métodos de esterilização sobre micro-organismos e a alteração na microdureza de substratos dentais.

Neste estudo, optou-se por utilizar diferentes métodos de esterilização comumente na prática dos serviços de saúde e em pesquisas como: o micro-ondas, o óxido de etileno e a autoclave. Estes métodos de esterilização já foram investigados em outros estudos (White; Hays et al. 1995; Hashemipour et al., 2013; Kumar et al., 2005; Vasconcelos et al., 2013; Tijare et al., 2014).

Para o presente estudo, ao testar os métodos de esterilização, foram utilizados neste estudo incisivos inferiores humanos por apresentarem menor variabilidade anatômica, tamanho, forma, dimensão e espessura reduzida. Os incisivos inferiores são de fácil obtenção quando comparado aos demais grupos de dentes (Roth et al., 2012; De-Deus et al., 2012).

O método da análise de turvação foi realizado por ser método simples, amplamente utilizado em Microbiologia e pode-se identificar a presença de micro-organismos (Farhad et al., 2012; Dominici et al., 2001; Sheriteh et al., 2010). Os resultados da análise de turvação evidenciaram diferença significativa entre os métodos utilizados. No entanto, verificou-se que apenas a autoclave foi capaz de eliminar e manter os dentes livres de micro-organismos com o passar do tempo. A ADA (American Dental Association) e o CDC (Centros de

Controle e Prevenção de Doenças) sugerem que a autoclave é o melhor método de esterilização para materiais expostos a fluidos corporais, no entanto, os dentes podem ser danificados ou ter sua morfologia alterada (Hashemipour et al., 2013).

Com relação a microdureza, a dentina intrarradicular sofreu alterações como métodos de esterilização o que comprava que embora fique livre de micro-organismos pode levar a alterações estruturais e influenciar nos resultados de estudos que avaliem, por exemplo, a adesão de materiais ao substrato dental (Michaud et al., 2018; Chng et al., 2002; Deogade et al., 2016; Hashemipour et al., 2013).

A medição da microdureza é um dos mais simples métodos de caracterização mecânica não destrutiva (Salem-Milani et al., 2015). Acredita-se que a microdureza da dentina ou do esmalte seja dependente da quantidade de conteúdo mineral em composição e determinação geralmente fornece evidências indiretas de perda ou ganho mineral em tecidos duros dentais (Salem-Milani et al., 2015). O conteúdo mineral nos dentes aumenta com a idade e a dentina antiga é mais dura do que a dentina jovem, que está associada ao aumento de fragilidade dentinária. Entretanto, como a idade dos dentes era desconhecida, nenhuma correção poder ser considerada durante o agrupamento das amostras ou análises estatísticas (Michaud et al., 2018)

Os métodos de esterilização apresentam vantagens e desvantagens (Western et al., 2016). Descobriu-se no presente estudo que a microdureza foi afetada nos diferentes métodos de esterilização utilizados. A hipótese é que o aumento da temperatura e alta pressão durante a autoclave desnatura o componente orgânico da dentina, afetando a microdureza (Salem-Milani et al., 2015; Deogade et al., 2016).

No presente estudo, o melhor método de esterilização para eliminação de micro-organismos foi a autoclave, embora tenha proporcionado redução microdureza da dentina. Sugere-se a realização de mais estudos com dentes humanos para se testar os demais

métodos de esterlização, ou diferentes parâmetros disponíveis, para averiguar o método que menos altere a microdureza dentinária.

C *onclusão*

Apesar das limitações de um estudo in vitro e baseado na metodologia deste estudo foi possível concluir que:

- 1) O método de esterilização autoclave foi o mais efetivo quanto a eliminação de micro-organismos de raízes humanas com 10 mm de comprimento;
- 2) Os dentes submetidos à esterilização, independentemente do método utilizado, tiveram a microdureza reduzida

*R*eferências

- Attam K, Talwar S, Yadav S, Miglani S. Comparative analysis of the effect of autoclaving and 10% formalin storage on extracted teeth: A microleakage evaluation. *J Conserv Dent*. 2009;12:26–30.
- Baratieri C, Mattos CT, Alves M Jr, Lau TC, Nojima LI, de Souza MM, Araujo MT, Nojima Mda C. In situ evaluation of orthodontic elastomeric chains. *Braz Dent J*. 2012;23(4):394-8.
- Barthel CR, Zimmer S, Zilliges S, Schiller R, Göbel UB, Roulet JF. In situ antimicrobial effectiveness of chlorhexidine and calcium hydroxide: gel and paste versus gutta-percha points. *J Endod*. 2002;28(6):427-30.
- Chng HK, Palamara JE, Messer HH. Effect of hydrogen peroxide and sodium perborate on biomechanical properties of human dentin. *J Endod*. 2002;28:62–7.
- De-Deus G, Brandão MC, Leal F, Reis C, Souza EM, Luna AS, Paciornik S, Fidel S. Lack of correlation between sealer penetration into dentinal tubules and sealability in nonbonded root fillings. *Int Endod J*. 2012;45(7):642-51.
- Deogade SC, Mantri SS, Saxena S, Sumathi K. Awareness and Knowledge of Undergraduate Dental Students about Sterilization/Disinfection Methods of Extracted Human Teeth. *Ann Med Health Sci Res*. 2016;6(6):348-355.
- DeWald JP. The use of extracted teeth for *in vitro* bonding studies: a review of infection control considerations. *Dent Mater*. 1997;13(2):74-81.
- Dominici JT, Eleazer PD, Clark SJ, Staat RH, Scheetz JP. Disinfection/sterilization of extracted teeth for dental student use. *J Dent Educ*. 2001;65(11):1278-80.
- Farhad AR, Barekatin B, Allameh M, Narimani T. Evaluation of the antibacterial effect of calcium hydroxide in combination with three different vehicles: An *in vitro* study. *Dent Res J (Isfahan)*. 2012;9(2):167-72.
- Gogineni S, Ganipineni K, Babburi S, Venigalla A, Pinniseti S, Kotti AB, Kalapala L. Evaluation of Vinegar as a Disinfectant for Extracted Human Teeth - An *in-Vitro* Study. *J Clin Diagn Res*. 2016; 10(7):50–52.
- Hashemipour MA, Mozafarinia R, Mirzadeh A, Aramon M, Nassab SA. Knowledge, attitudes, and

- performance of dental students in relation to sterilization/disinfection methods of extracted human teeth. *Dent Res J (Isfahan)*. 2013;10(4):482-8.
- Kumar M, Sequeira PS, Peter S, Bhat GK. Sterilisation of extracted human teeth for educational use. *Indian J Med Microbiol*. 2005;23(4):256-8.
- Lee JJ, Nettey-Marbell A, Cook A Jr, Pimenta LA, Leonard R, Ritter AV. Using extracted teeth for research: the effect of storage medium and sterilization on dentin bond strengths. *J Am Dent Assoc*. 2007;138(12):1599-603.
- Michaud PL, Maleki M, Mello I. Effect of Different Disinfection/Sterilization Methods on Risk of Fracture of Teeth Used in Preclinical Dental Education. *J Dent Educ*. 2018;82(1):84-87.
- Roth KA, Friedman S, Lévesque CM, Basrani BR, Finer Y. Microbial biofilm proliferation within sealer-root dentin interface is affected by sealer type and aging period. *J Endod*. 2012;38(9):1253-6.
- Salem-Milani A, Zand V, Asghari-Jafarabadi M, Zakeri-Milani P, Banifateme A. The effect of protocol for disinfection of extracted teeth recommended by center for disease control (CDC) on microhardness of enamel and dentin. *J Clin Exp Dent*. 2015;7(5):552-556.
- Sandhu SV, Tiwari R, Bhullar RK, Bansal H, Bhandari R, Kakkar T, Bhusri R. Sterilization of extracted human teeth: A comparative analysis. *J Oral Biol Craniofac Res*. 2012;2(3):170-5.
- Sheriteh Z, Hassan T, Sherriff M, Cobourne M, Riley P. Decontamination of viable *Streptococcus mutans* from orthodontic tungsten carbide debonding burs. An in vitro microbiological study. *J Orthod*. 2010;37(3):181-7.
- Silva-Neto RD, Sousa-Neto MD, Pécora JD, Palma-Dibb RG, Souza-Gabriel AE. Wear profile of canal wall surfaces and bond strength of endodontic sealers after in situ acid challenge. *Int Endod J*. 2018;51(3):364-374.
- Thomas RZ, Ruben JL, ten Bosch JJ, Huysmans MC. Effect of ethylene oxide sterilization on enamel and dentin demineralization in vitro. *J Dent*. 2007;35(7):547-51.
- Tijare M, Smitha D, Kasetty S, Kallianpur S, Gupta S, Amith H. Vinegar as a disinfectant of extracted human teeth for dental educational use. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2014;18(1):14-8.

- Tomás I, García-Caballero L, López-Alvar E, Suárez-Cunqueiro M, Diz P, Seoane J. In situ chlorhexidine substantivity on saliva and plaque-like biofilm: influence of circadian rhythm. *J Periodontol*. 2013;84(11):1662-72.
- Valentini F, Luz MS, Boscato N, Pereira-Cenci T. Biofilm formation on denture liners in a randomised controlled in situ trial. *J Dent*. 2013;41(5):420-7.
- Vasconcelos LR, Consani RL, Mesquita MF, Sinhoreti MA. Effect of chemical and microwave disinfection on the surface microhardness of acrylic resin denture teeth. *J Prosthodont*. 2013;22(4):298-303.
- Viana PS, Machado AL, Giampaolo ET, Pavarina AC, Vergani CE. Disinfection of bovine enamel by microwave irradiation: effect on the surface microhardness and demineralization/remineralization processes. *Caries Res*. 2010;44(4):349-357.
- Viana PS, Orlandi MO, Pavarina AC, Machado AL, Vergani CE. Chemical composition and morphology study of bovine enamel submitted to different sterilization methods. *Clin Oral Investig*. 2018;22(2):733-744.
- Virtej A, MacKenzie CR, Raab WH, Pfeffer K, Barthel CR. Determination of the performance of various root canal disinfection methods after in situ carriage. *J Endod*. 2007;33(8):926-9.
- Western JS, Dicksit DD. A systematic review of randomized controlled trials on sterilization methods of extracted human teeth. *J Conserv Dent*. 2016;19(4):343-6.
- White RR, Hays GL. Failure of ethylene oxide to sterilize extracted human teeth. *Dent Mater*. 1995;11(4):231-3