



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

CURSO DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Monografia de Final de Curso

Aluna: Simone Yumi Sudo

Orientadora: Profa. Dra. Altair Antoninha Del Bel Cury

Ano de Conclusão do Curso: 2006



TCC 314



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



**“Influência da solução de armazenagem na resistência
do esmalte dental humano a desmineralização.”**

Piracicaba

Dezembro de 2006



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



Simone Yumi Sudo

**"Influência da solução de armazenagem na resistência
do esmalte dental humano a desmineralização."**

**Monografia de conclusão de Curso de Odontologia da
Faculdade de Odontologia de Piracicaba da
Universidade Estadual de Campinas**

Piracicaba

Dezembro de 2006

Dedicatória

Aos meus pais Mitishiro e Olga pelo companheirismo, carinho e incentivo contínuo nessa jornada.

Aos meus irmãos e grandes amigos, Aurélio, Ana Lúcia, Beatriz, Paula Carolina, pelo exemplo que sempre foram para mim e pelo suporte em tudo que fiz.

A todos que ajudaram para sua realização e para os que de alguma forma usufruirão dele.

Agradecimentos especiais

A Profa Dra. Altair Antoninha Del Bel Cury pela oportunidade, apoio e direcionamento ímpar proporcionado para a realização deste.

A Dra. Juliana S. Moura, minha co-orientadora por toda paciência, sabedoria, disciplina e experiência passada.

Agradeço aos Professores e funcionários das Áreas de Prótese Parcial Removível e Bioquímica Oral por toda a presteza e auxílio na execução deste trabalho.

Sumário

Capítulos	Página
1. Resumo	2
2. Abstract	4
3. Introdução	5
4. Material e Método	7
5. Resultados	13
6. Discussão	17
7. Conclusão	19
8. Referencias Bibliográficas	20
9. Anexo	24
9.1 Parecer do Comitê Ética em Pesquisa FOP/UNICAMP	

Resumo

O número de pesquisas odontológicas utilizando dentes humanos extraídos, assim como o uso dos mesmos com objetivos educacionais tem aumentado dia a dia. Assim, as soluções utilizadas para desinfecção devem ser eficientes, assim como não devem interferir com as estruturas dentais, alterando-as. Dessa forma foi objetivo dessa pesquisa: analisar a influência de formol a 2 % e timol a 0,01 % na microdureza superficial e longitudinal de esmalte dental; analisar da influência destas soluções de armazenagem no esmalte dental humano quando submetido à ciclagem de pH comparando os valores de microdureza superficial inicial e final (porcentagem de perda de dureza superficial) e microdureza longitudinal dos grupos submetidos ou não à ciclagem. Espécimes constituídos de esmalte dental humano, divididos em 4 grupos (n = 15) de acordo com a solução de armazenagem e submissão ou não a um modelo de ciclagem de pH: esmalte armazenado em formol (F1); esmalte armazenado em timol (T1); esmalte armazenado em formol e submetido à ciclagem de pH (F2); esmalte armazenado em timol e submetido à ciclagem de pH (T2). Os dados de microdureza de superfície e porcentagem de volume mineral foram submetidos a análise de variância a dois critérios e ao teste Student-Newman-Keuls ($p < 0,05$). A dureza longitudinal pela análise de variância a um critério, considerando a variável solução de armazenagem, para as distâncias de 10, 20, 30, 40 e 50 μm e teste t. Não houve diferenças entre as soluções de armazenagem antes da ciclagem de pH ($p > 0,05$) antes da ciclagem de pH. No entanto, diferenças significantes foram encontradas para a dureza de superfície quando se compara antes e após a

ciclagem de pH dentro de um mesmo grupo timol ou formol ($p < 0,05$). Também houve diferenças significantes quando se compara os grupos de timol e formol após a ciclagem de pH, com valores reduzidos para formol ($p < 0,05$). Concluí-se que a solução de armazenagem influenciou na desmineralização dental, sendo que as amostras previamente armazenadas em timol apresentaram maiores valores de dureza superficial. Quanto aos valores de dureza longitudinal, menores valores foram encontrados para dentes armazenados em formol apenas nas próximas da borda.

Key words: Thymol; dental demineralization; dental disinfection

Abstract

Extracted human teeth are frequently used for research or educational purposes. Thus, it is necessary their storage in disinfectant solutions that do not alter dental structures. Consequently, this study has evaluated the storage solution influence on enamel demineralization. Therefore, sixty samples were divided into the following groups: enamel stored in formaldehyde (F1), stored in thymol (F1), stored in formaldehyde and submitted to pH cycling (F2), stored in thymol and submitted to pH cycling (T2). All the samples were evaluated by surface and cross-sectional microhardness analysis and had their percentage of mineral volume versus micrometer determined. No differences between the groups were found before the treatment with the solutions ($p > 0,05$). However, regard with the distances, the specimens from the formaldehyde solution exhibited lower values at 30 μ m up 50 μ m depth from enamel surface ($p < 0.05$), where samples from group T1 were more demineralized. In conclusion, the storage solution influenced the reaction of a dental substrate towards a cariogenic challenge. The thymol may decrease enamel demineralization promoted by a pH cycling model, when compared to demineralization occurred in enamel stored in formaldehyde solution.

Key words: Storage solutions, dental demineralization, dental disinfection.

Introdução

O conhecimento sobre desinfecção e esterilização aumentou significativamente no último século, com a descoberta de muitos agentes químicos e físicos que apresentam potencial antimicrobiano. Um interesse crescente neste campo tem sido causado pela possibilidade de transmissão cruzada de doenças como Hepatite B e AIDS durante procedimentos médicos e odontológicos. No entanto, profissionais da área de Odontologia devem estar conscientes do risco de infecção cruzada não somente durante procedimentos clínicos que envolvam contato direto com o sangue ou saliva, mas também durante procedimentos com estruturas dentais utilizadas para fins de ensino e pesquisa. Tais substratos são comumente usados em laboratórios de pré-clínica e em pesquisas que estudam efeitos de materiais e/ou tratamentos de desmineralização ou remineralização dental, podendo, desta forma, ser fonte de contaminação para alunos e pesquisadores.

O Centro de Controle de Doenças dos Estados Unidos recomenda que dentes humanos extraídos utilizados para propósito educacional devem ser desinfetados com solução de hipoclorito de sódio ou qualquer outro líquido germicida (TORO et al., 2000). Entretanto, tem sido relatado que o hipoclorito de sódio pode aumentar a porosidade do esmalte humano por desproteinização (ROBINSON et al., 1990; BITTER, 1992) e afetar a estrutura dentinária, removendo ou modificando a sua matriz protéica. Tal fato inviabiliza o uso de dentes armazenados neste tipo de solução, pois a mesma afetaria a reação dos dentes frente a algum tratamento. Duas outras soluções desinfetantes bastante

utilizadas para propósito de pesquisa são o formol 2% e o timol a 0,01% (GODDIS et al., TATE & WHITE,1991; KERN et al 1994), embora não existam trabalhos na literatura que comparem a reação de estruturas dentais armazenadas nessas soluções em alguns tipos de modelo experimental, como a ciclagem de pH. Este tipo de comparação entre estudos similares onde os dentes foram armazenados em soluções desinfetantes diferentes (RODRIGUES et al, 2002). Ainda, MOURA et al. (2002) verificou haver diferenças na microdureza longitudinal de esmalte dental entre grupos submetidos ou não à ciclagem de pH quando armazenados em diferentes soluções.

Devido à preocupação quanto à manutenção das propriedades físico-químicas de um dente quando submetido à armazenagem em solução desinfetante, o objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade de manutenção da estrutura superficial do esmalte dental necessária para fins de pesquisa, por meio de microdureza superficial e análise da porcentagem de perda mineral.

Material e Método

Delineamento experimental

Para a realização deste trabalho *in vitro*, foram utilizados 30 terceiros molares humanos retidos e extraídos por razões que não as desta pesquisa. Os doadores dos terceiros molares assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido, e a pesquisa foi aprovada pelo Comitê Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, UNICAMP. Após a exodontia, os dentes foram imediatamente armazenados em solução salina (0,9% NaCl). Os dentes foram selecionados por exame visual utilizando os seguintes critérios de seleção: 2/3 de raiz formada e ausência de trincas, manchas, cárie ou imperfeições na coroa. Os terceiros molares foram aleatoriamente divididos para armazenagem em formol a 2% ou timol a 0,01%, sendo obtidos 15 espécimes para cada solução de armazenagem. Após um mês de imersão nestas soluções, os dentes foram seccionados em sua metade em cortadeira metalográfica (Buehler-Isomet). Uma metade de cada dente foi mantida na solução de armazenagem e reservada como controle, enquanto a outra metade foi submetida a um modelo de ciclagem de pH. Desta forma, os grupos foram divididos de acordo com a solução de armazenagem (formol 2% e timol 0,01%), submissão ou não à ciclagem de pH, sendo nomeados de: esmalte armazenado em formol (F1), esmalte armazenado em timol (T1) esmalte armazenado em formol e submetido à ciclagem de pH (F2); esmalte armazenado em timol e submetido à ciclagem de pH (T2).

Preparo dos espécimes

O preparo dos espécimes foi realizado após um mês de armazenagem dos terceiros molares em uma das soluções de armazenagem. Para a limpeza dos dentes, os mesmos permaneceram imersos em água destilada deionizada por vinte e quatro horas. Após este período, foram raspados com curetas periodontais manuais submetidos a profilaxia com pedra-pomes e taças de borracha acopladas a um contra-ângulo e micromotor.

Depois de limpos, os dentes foram seccionados transversalmente nos terços cervicais da raiz e coroa. Em seguida, os blocos dentais foram seccionados longitudinalmente em relação ao longo eixo do dente com cortadeira metalográfica e discos diamantados dupla face sob refrigeração. Nos espécimes do grupos T2 e F2 (grupos submetidos à ciclagem de pH) foram fixados um adesivo circular com 2,5 mm de diâmetro na superfície de cada bloco. Posteriormente, as superfícies dentais externas à área do disco foram cobertas com duas camadas de esmalte para unha e cera. Após a secagem do esmalte, o adesivo foi removido, expondo uma área de aproximadamente 4,9 mm² de esmalte.

Ciclagem de desmineralização- remineralização

Os grupos F2 e T2 foram submetidos a cinco ciclos de desmineralização- remineralização a 37°C. Cada ciclo foi composto por 3 horas de imersão em solução desmineralizante (des) seguidas de 21 horas de imersão em solução remineralizante (re), conforme esquema abaixo (Figura 1):

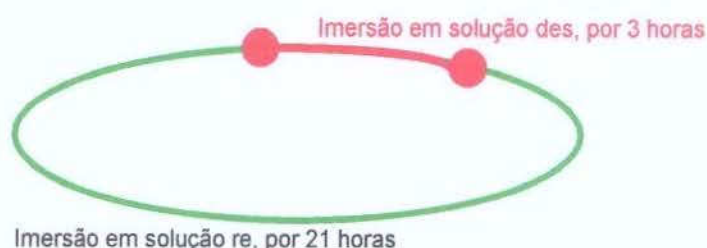


Figura 1 – Esquema de ciclagem de pH por 24 horas, durante período de 5 dias.

A solução remineralizante era composta por: Ca 1.5 mmol/L, PO_4 0.9 mmol/L, KCl 1.5 mmol/L, cacodilato 20 mmol/L, 0.05 ppmF. O pH desta solução será de 7,4 e será usada a proporção de 3,18 mL/mm² de superfície dental exposta.

A composição da solução desmineralizante foi: Ca 2 mmol/L, PO_4 2 mmol/L, 0.75 mmol/L de acetato, 0.03 ppmF, pH 4,3, a proporção usada será de 6,36 mL/mm² (FEATHERSTONE et al., 1996 ARGENTA,2001) . As duas soluções continham cristais de timol para evitar crescimento bacteriano.

Entre os ciclos de desmineralização e remineralização, os espécimes serão lavados em água destilada deionizada por 1 minuto.

Análise da microdureza superficial e em corte longitudinal

Esta análise foi realizada nos espécimes de todos os grupos antes e após imersão em solução salina (pH 7,0) para os grupos T1 e F1 e antes e após ciclagem de pH para os grupos T2 e F2 durante 5 dias. Para análise da microdureza superficial inicial, as superfícies dos espécimes em questão foram inspecionadas, descartando as que apresentarem trincas. Foram realizadas 5 impressões em cada superfície, com uma distância de 100µm para cada, sendo

utilizado microdurômetro (SHIMADZU HMV 2000) e penetrador tipo KNOOP com carga estática de 50 gramas e tempo de 5 segundos. Após a ciclagem de pH ou imersão em solução salina, os valores obtidos para a dureza de superfície final, cinco impressões abaixo (100µm) e cinco acima (100µm) das iniciais (Figura 2) para determinar a porcentagem de perda de dureza de superfície (%PDS), através da fórmula:

$$\%PDS = \frac{\text{Dureza após o ciclagem de pH} - \text{Dureza inicial}}{\text{Dureza inicial}} \times 100$$

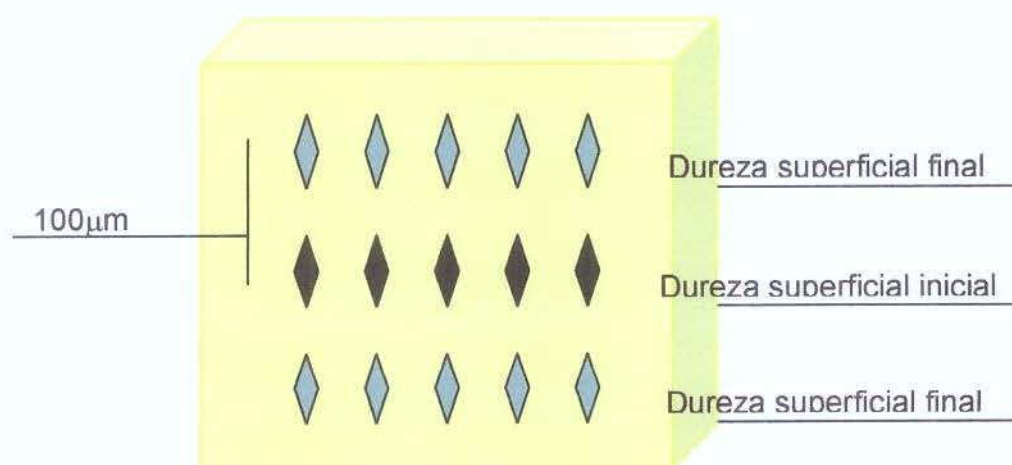


Figura 2 – Esquema de microdureza superficial inicial e final

Para análise da microdureza em corte longitudinal, cada espécime foi seccionado em dois fragmentos, sendo o maior destes utilizados para a análise de microdureza longitudinal. Os fragmentos dentais foram embutidos (embutidora AROTEC PRE-30) em resina acrílica e em seguida polidos com lixas d'água de 320, 400-, 600- e 1.200 µm de granulação (CARBORUNDUN) e discos de feltro e pasta diamantada de 1 µm (BUEHLER). O aparelho utilizado para leitura de

microdureza KNOOP longitudinal em esmalte foi o mesmo que para a mensuração de dureza superficial. As edentações foram realizadas em esmalte, com espaçamento de 20 μm entre elas, sendo a primeira realizada a 10 μm da superfície externa e a última a 90 μm (Figura 3), usando penetrador do tipo Knoop com carga estática de 25 g por 5 s.

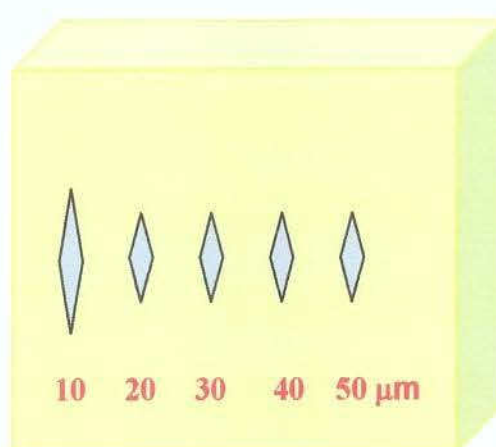


Figura 3 – Esquema de microdureza longitudinal, com edentações a 10, 20, 30, 40 e 50 μm da superfície dental.

Detalhamento da pesquisa

Cinco pilotos foram conduzidos, modificando-se a ciclagem de pH, quanto ao tempo de exposição à solução DES, número de ciclos e o pH da solução DES, como descrito na Tabela 1.

	Tempo de exposição em sol.	Número de ciclos	pH da sol.
	DES		DES
Ciclagem 1	3 horas por dia	3	4,3
Ciclagem 2	6 horas por dia	8	4,3
Ciclagem 3	6 horas por dia	5	4,3
Ciclagem 4	3 horas por dia	5	4,3
Ciclagem 5	3 horas por dia	5	5,0

Tabela 1. Descrição das ciclagens para determinar os tempos de ciclagem da pesquisa

Os pilotos foram realizados com o propósito de se conseguir adequada desmineralização dental. No primeiro piloto não ocorreu desmineralização dental antes e após a ciclagem para o grupo armazenado em formol ($p > 0,05$), enquanto que no segundo, terceiro e quarto pilotos, a solução DES provocou erosão dental, impossibilitando a leitura de dureza superficial. Após a realização do quinto piloto, procedeu-se para a pesquisa propriamente dita, como destrito no capítulo de materiais e métodos.

Análise estatística

A dureza superficial foi analisada por meio de ANOVA dois critérios, considerando duas variáveis - solução de armazenagem e período antes e após a ciclagem -, onde diferenças estatísticas ($p < 0,05$) foram detectadas entre os grupos. As diferenças foram em seguida analisadas por meio do teste Student-Newman-Keuls.

A dureza longitudinal foi analisada por meio de ANOVA um critério, considerando a variável solução de armazenagem, para as diferentes distâncias da superfície dental (10, 20, 30, 40 e 50 μm), onde diferenças estatísticas foram em seguida analisadas por meio do teste t ($p = 0,05$).

Resultados

As tabelas 2 e 3 apresentam as médias e desvios padrão dos valores de dureza Knoop para as superfícies de esmalte dental expostas aos diferentes meios de armazenagem. As figuras 4, 5 e 6 ilustram esses dados. Conforme apresentado na tabela 2, não foram encontradas diferenças estatísticas significantes entre os meios de armazenagem ($p > 0,05$) antes da ciclagem de pH. No entanto, diferenças significantes foram encontradas para a dureza de superfície quando se compara os valores de antes e depois da ciclagem de pH com significativa redução nos valores de dureza ($p < 0,05$) dentro de um mesmo grupo timol ou formol. Também foi observada diferenças entre os meios de armazenagem após a ciclagem de pH, sendo que as amostras que foram armazenadas em formol apresentaram valores significativamente menores quando comparados às amostras armazenadas em timol ($p < 0,05$) (Figura 4).

Tabela 2. Dureza de superfície (g/cm^2) antes e após a ciclagem de pH (Média $\pm$ DP)

	Timol	Formol
Antes da ciclagem de pH	368,6 $\pm$ 38,8 A,a	367,4 $\pm$ 31,1 A,a
Após a ciclagem de pH	191,0 $\pm$ 11,2 B,a	164,2 $\pm$ 29,0 B,b

Letras maiúsculas distintas indicam diferenças estatísticas antes e após a ciclagem de pH no mesmo grupo; Letras minúsculas distintas indicam diferenças significantes entre os tratamentos ($p < 0,05$).

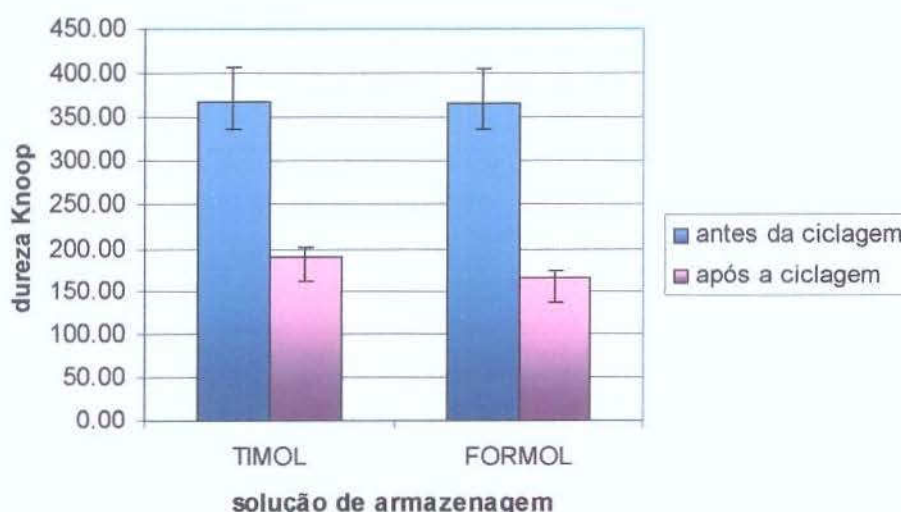


Figura 4. Média e desvio padrão da dureza Knoop superficial em dentes previamente armazenados em timol ou formol.

Ao se analisar os resultados da dureza longitudinal para as amostras armazenadas em ambos os meios (Tabela 3), verifica-se que nas distâncias próximas a superfície (10, 20 30 e 40 μm) não houve diferenças entre os meios

de armazenagens ($p > 0,05$), entretanto para a distância de 50 μm houve diferenças sendo que as amostras na solução de Timol apresentaram maiores valores para dureza ($p < 0,05$). Entretanto, quando se analisa os valores de dureza dentro de um mesmo grupo referentes a distância verifica-se que as diferenças foram significantes, aumentando os valores de dureza de 10 para 50 μm ($p < 0,05$) (Tabela 3 e Figuras 5 e 6).

Tabela 3. Dureza Knoop (g/cm^2) longitudinal do esmalte dental, após a ciclagem de pH, armazenado em timol ou formol para diferentes distâncias (em μm)

Distâncias	10	20	30	40	50
Timol	25,7 $\pm$ 21,5 A,a	99,3 $\pm$ 7,9 A,b	206,0 $\pm$ 25,2 A,c	249,0 $\pm$ 44,2 A,d	392,7 $\pm$ 19,0 A,e
Formol	39,23 $\pm$ 19,4 A,a	87,6 $\pm$ 19,5 A,b	148,0 $\pm$ 49,1 B,c	243,29 $\pm$ 66,9 A,d	323,1 $\pm$ 79,5 B,e

Letras maiúsculas indicam diferenças entre as soluções de armazenagem ($p < 0,05$).

Letras minúsculas indicam diferenças entre as distâncias ($p < 0,05$).

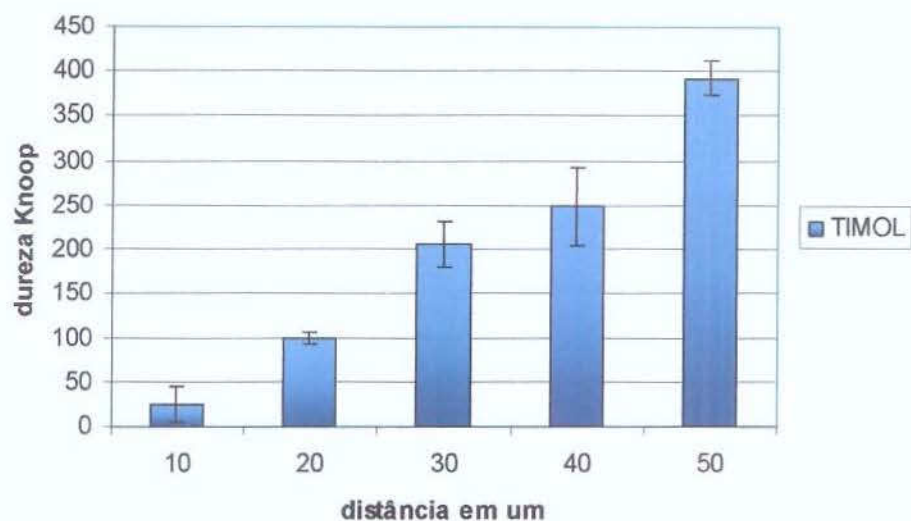


Figura 5. Média e desvio padrão da dureza longitudinal em amostras armazenadas em timol e submetidas à ciclagem de pH.

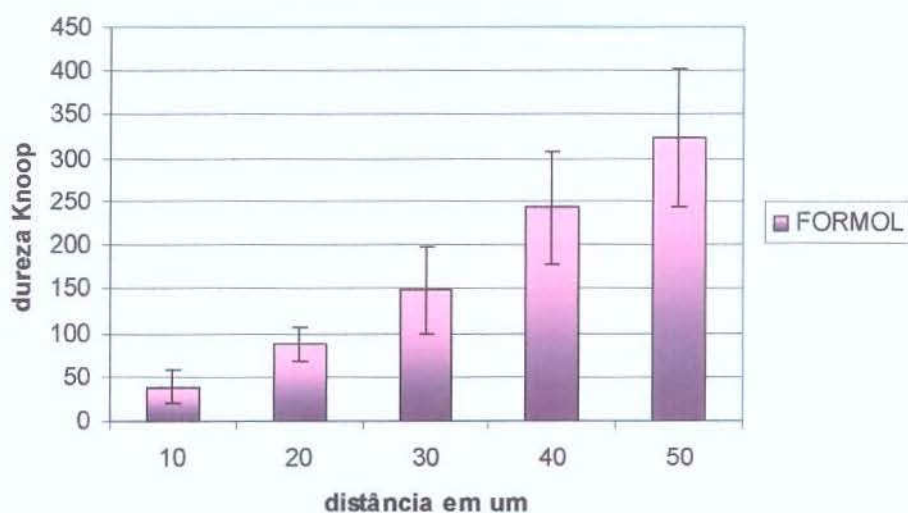


Figura 6. Média e desvio padrão da dureza longitudinal em amostras armazenadas em formol e submetidas à ciclagem de pH.

Discussão

A desinfecção de dentes utilizados para pesquisa é essencial para evitar infecção cruzada, sendo que a seleção da solução desinfetante deve levar em consideração se a mesma altera a estrutura dental ou a reação da mesma frente a experimentos. O Centro para Controle de Doença e Prevenção (CDC) (1993) recomenda que dentes extraídos usados para fins educativos ou de pesquisa devam ser desinfetados por hipoclorito ou soluções químicas germicidas. No entanto, o hipoclorito de sódio pode aumentar a porosidade do esmalte por desproteneização (Robinson et al., 1990; Bitter, 1992). Desta forma, foram utilizadas duas soluções amplamente utilizadas para a desinfecção de espécimes dentais: timol a 0,01% e formol a 2%.

Os modelos de ciclagem de pH são amplamente utilizados para estudos sobre terapias preventivas e potencial cariogênico, sendo que esta metodologia mimetiza as alterações de pH da curva de Stephan (citar autor), onde as amostras são submetidas a baixo pH por um período do dia e permanecem em pH neutro no restante do dia. Neste trabalho, analisou-se a influência da solução de armazenagem na desmineralização dental, por meio de modelo de ciclagem de pH proposto por Featherstone et al. (1986) e modificado por Argenta et al. (2003), onde amostras são imersas em solução desmineralizante por 3 horas e solução remineralizante por 21 horas, por 5 dias.

A determinação da microdureza de superfície do esmalte tem sido aceita para avaliar perda e ganho de minerais, sendo que esta técnica possui como vantagem a preservação da amostra, permitindo avaliações antes e após o

tratamento (Arends et al., 1980). Neste estudo, apesar de não existirem diferenças estatísticas para a dureza superficial de amostras armazenadas em timol e formol antes da ciclagem de pH, os resultados de dureza superficial após a ciclagem indicaram as amostras armazenadas em formol sofreram maior desmineralização dental que as amostras armazenadas em timol ($p < 0,05$).

Ainda, o efeito das soluções de armazenagem na progressão de cárie foi avaliado por meio da determinação da dureza do esmalte seccionado longitudinalmente, sendo esta análise realizada nas mesmas amostras utilizadas para a análise de dureza superficial. Este método é amplamente utilizado pois, segundo Featherstone et al. (1983), há correlação entre dureza Knoop e a porcentagem de mineral da lesão de cárie. Para a dureza longitudinal, diferenças estatísticas foram verificadas apenas para as profundidades 30 e 50 μm , onde amostras armazenadas em formol apresentaram menores valores de dureza ($p < 0,05$). No entanto, quando a média das distâncias foi analisada, não houve diferenças estatísticas entre os grupos.

Estes resultados não estão de acordo com Moura et al. (2004), que encontraram maiores valores de dureza longitudinal para amostras armazenadas em formol. Esta diferença pode ser justificada pelo fato de que no estudo citado, a dureza era analisada a 800 μm da linha amelocementária, sendo que nesta distância há a presença de proteínas orgânicas, que eram fixadas pela presença do formol, o que impedia a difusão de ácidos pela estrutura dental. No presente trabalho, as amostras foram obtidas seccionando ao meio a porção coronária dos dentes, sendo que, desta forma, não houve a influência de proteínas orgânicas presentes no ligamento periodontal. No entanto, não existem relatos na literatura

sobre os efeitos específicos do timol na superfície dental, que possam justificar os valores encontrados.

Conclusão

De acordo com os resultados encontrados conclui-se que a solução de armazenagem influenciou na desmineralização dental, sendo que as amostras previamente armazenadas em timol apresentaram maiores valores de dureza superficial. Quanto aos valores de dureza longitudinal, menores valores foram encontrados para dentes armazenados em formol apenas nas distâncias 30 e 50 μm .

Referências Bibliográficas

Amaecha BT, Higham SM, Edgar WM. Efficacy of sterilization methods and their effect on enamel demineralization. *Caries Res* 1998;32:441-446.

Ansari, G., et al., Caries detector dyes--an in vitro assessment of some new compounds. *J Oral Rehabil*, 1999. 26(6): p. 453-8.

Arends J, Shuthof J, Jongebloed WG. Lesion depth and microhardness indentations on artificial whit spot lesions. *Caries Res* 1980;14:190-195.

Argenta RMO, Tabchoury CPM, Cury JA. A modified pH-cycling model to evaluate fluoride effect on enamel demineralization. *Pesqui Odontol Bras* 2003;17(3):241-6.

Barbosa SV, Safavi KE, Spangberg LSW. Influence of sodium hypochlorite on the permeability and structure of cervical human dentine. *Int End J* 1994;27: 309-12.

Bitter NC. A scanning electron microscopy study of effect of bleaching agents on enamel. *J Prosthet Dent* 1992;67(6):852-5.

Cardoso, P.E., R.R. Braga, and M.R. Carrilho, Evaluation of micro-tensile, shear and tensile tests determining the bond strength of three adhesive systems. *Dent Mater*, 1998. 14(6): p. 394-8.

Carrilho, M.R., et al., Mechanical stability of resin-dentin bond components. *Dent Mater*, 2005. 21(3): p. 232-41.

Ceballos, L., et al., Microtensile bond strength of total-etch and self-etching adhesives to caries-affected dentine. *J Dent*, 2003. 31(7): p. 469-77.

Center of Disease Control and Prevention (1993). Recommended Infection-control practices for dentistry. US Dept. Health and Human Services, MMWR,42,RR-8,1-11 (disponível on line em: www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00021095.html).

Cury, JA. et al. Effect of dentifrice containing fluoride and/or baking soda on enamel demineralization/remineralization: an in situ study. *Caries Res*,2001, v 35, p.106-10.

De Castro, F.L., et al., Effect of 2% chlorhexidine on microtensile bond strength of composite to dentin. *J Adhes Dent*, 2003. 5(2): p. 129-38.

De Munck, J., et al., Four-year water degradation of total-etch adhesives bonded to dentin. *J Dent Res*, 2003. 82(2): p. 136-40.

Doi, J., et al., Micro-tensile bond strength of self-etching primer adhesive systems to human coronal carious dentin. *J Oral Rehabil*, 2004. 31(10): p. 1023-8.

Featherstone JDB, ten Cate JM, Shariati M, Arends J. Comparison of artificial caries-like lesions by quantitative microradiography and microhardness. *Caries Res* 1983;17(5):385-91.

Featherstone JDB, O'Reilly MM, Shariati M, Brugler S. Enhancement of remineralization in vitro and in vivo. In: Leach SA. Factors relating to demineralization and remineralization of the teeth. IRL Press; 1986. p.23-34.

Goodis HE, Marshal GW, White JM. The effects of storage after extraction of the teeth on human dentine permeability in vitro. *Arch Oral Biol* 1991;36(8):561-66.

Goodis HE, Marshall GW Jr, White JM, Gee L, Hornberger B, Marshall SJ. Storage effects on dentin permeability and shear bond strengths. *Dent Mater*. 1993 Mar;9(2):79-84.

Hashimoto, M., et al., Degradation patterns of different adhesives and bonding procedures. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2003. 66(1): p. 324-30.

Hebling, J., et al., Chlorhexidine Arrests Subclinical Degradation of Dentin Hybrid Layers in vivo. *J Dent Res*, 2005. 84(8): p. 741-6

Inaba D et al. The effects of sodium hypochlorite treatment on demineralized root dentin. *Eur J Oral Sci* 1995;103(6):368-74.

Jacobsen, T. and K.J. Soderholm, Some effects of water on dentin bonding. *Dent Mater*, 1995. 11(2): p. 132-6.

Kern M, Fechtug T, Strub, SR. Influence of water and thermal cycling on the fracture strength of all-porcelains, resin bonded fixed partial dentures. *J Prosthet Dent* 1994; 71(3):251-56.

Leddy PD. Practical research planning and design New Jersey, 6th edition ed. 1997.

Moura JS, Rodrigues LKA, Del Bel Cury AA, Lima EMCX, Garcia RCM. Influence of storage solution on enamel demineralization submitted to pH cycling. *J Appl Oral Sci* 2004;12(3):205-8.

Paes Leme, AF. Efeito da associação da aplicação tópica profissional de dentifrício fluoretado na desmineralização do esmalte e na composição bioquímica e microbiológica da placa dental. Piracicaba 2002: [Dissertação de Mestrado – Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP].

Pashley EL, Tao L, Pashley DH. Sterilization of human teeth: its effect on permeability and bond strength. *Am J Dent* 1993;6:189-91.

Robinson C, Hallsworth AS, Shore RC, Kirkham J. Effect of surface zone deproteinisation on the access of mineral ions into subsurface carious lesions of human enamel. *Caries Res* 1990;24:226-30.

Reis, A., J.R. de Oliveira Bauer, and A.D. Loguercio, Influence of crosshead speed on resin-dentin microtensile bond strength. *J Adhes Dent*, 2004. 6(4): p. 275-8.

Reis, A., et al., Durability of resin dentin interfaces: effects of surface moisture and adhesive solvent component. *Dent Mater*, 2004. 20(7): p. 669-76.

Reis, A., et al., The influence of storage time and cutting speed on microtensile bond strength. *J Adhes Dent*, 2004. 6(1): p. 7-11.

Rodrigues LKA. Carga bacteriana de dentes humanos e efeitos da radiação gama sobre o esmalte dental. Piracicaba 2002: [Dissertação de Mestrado – Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP].

Salai M, Vansover A, Pritch M, Von Versen R, Horozowski H. Human immunodeficiency virus (HIV) inactivation of banked bone by gamma irradiation. *Ann Transplant* 1997;2:55-6.

Tate WH, White RR Disinfection of human teeth for education purposes. *J Dent Educ* 1991;55(9):583-5. TORO MJ in vitro fluoride dose-response study of sterilized enamel lesions. *Caries Res* 2000;34:246-53.

Wheatherell JÁ, Robinson A, Hallsworth AS. Changes in the distribution of fluoride in enamel surface of human teeth. *Arch Oral Biol* 1973;18 (9):1175-89.

White JM, Goodis HE, Marshall SJ. Sterilization of teeth by gamma radiation. *J Dent Res* 1994;73:1560-7



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



CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa **"Influência da solução de armazenagem na resistência do esmalte dental humano a desmineralização"**, protocolo nº 211/2004, dos pesquisadores **ALTAIR ANTONINHA DEL BEL CURY e SIMONE YUMI SUDO**, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 16/02/2005.

The Research Ethics Committee of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that project **"Influence of storage solutions on human dental enamel resistance to demineralization"**, register number 211/2004, of **ALTAIR ANTONINHA DEL BEL CURY and SIMONE YUMI SUDO**, comply with the recommendations of the National Health Council – Ministry of Health of Brazil for researching in human subjects and was approved by this committee at 16/02/2005.

Handwritten signature of Cinthia Pereira Machado Tabchoury
 Cinthia Pereira Machado Tabchoury

Secretária
 CEP/FOP/UNICAMP

Handwritten signature of Jacks Jorge Júnior
 Jacks Jorge Júnior
 Coordenador
 CEP/FOP/UNICAMP