

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
MESTRADO EM CIRURGIA E TRAUMATOLOGIA BUCOMAXILOFACIAL

Leonardo Tonietto

Influência da autoclavagem e de diferentes meios de armazenamento em dentes humanos retro-obturados com MTA. Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectrometria por Dispersão de Energia (EDS).

Porto Alegre

2013

Leonardo Tonietto

Influência da autoclavagem e de diferentes meios de armazenamento em dentes humanos retro-obturados com MTA. Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectrometria por Dispersão de Energia (EDS).

Influence of autoclaving and different storage media on human teeth retrofilled with MTA. Analysis by Scanning Electron Microscopy (SEM) and Energy Dispersive Spectrometry (EDS).

Dissertação apresentada como requisito para obtenção de título de Mestre em Odontologia- área de concentração em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial- pela Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Orientador: João Batista Blessmann Weber

Linha de Pesquisa: Diagnóstico e Terapêutica Aplicadas

Porto Alegre

2013

Dedico essa dissertação aos meus pais, **Iria e Lourival**, pelo exemplo, presença e constante incentivo ao crescimento pessoal e profissional.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A **Prof^a. Dra. Marília Gerhardt de Oliveira** pela amizade, pela acolhida, pela orientação durante boa parte deste trabalho e, principalmente, pelo exemplo de conduta em todos os momentos.

Ao **Prof. Dr. Ferdinando De Conto**, pelo inspirador exemplo de dedicação profissional à Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial, pela parceria e pelo apoio constante em todas as fases da elaboração deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. João Batista Blessmann Weber**, pela valiosa e fundamental orientação nas etapas definitivas deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao magnífico Reitor da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, **Prof. Dr. Joaquim Clotet.**

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, na pessoa da coordenadora, a **Profa. Dra. Ana Maria Spohr**

À Faculdade de Odontologia da Universidade de Passo Fundo (FO UPF).

Ao **Prof. Dr. Mateus Ericson Flores**, da FO UPF, pelo apoio técnico nas fases deste trabalho.

A **Prof^a Cristiane Aparecida de Oliveira**, da FO UPF.

À colega de mestrado, **Carolina Cucco**, pela valiosa ajuda nas diversas fases de elaboração desta dissertação.

Aos professores da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, **João Feliz e Berenice Anina Dedavid.**

Aos funcionários do Centro de Microscopia e Microanálises da PUCRS, **Miriam e Wagner.**

Aos professores da área de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial da PUCRS, **Rogério Belle, Rogério Pagnoncelli, Raphael Carlos Drummond Loro, Guilherme Fritscher, Vinícius Viegas e Manoel Sant'ana** pelos ensinamentos e convivência durante minha pós-graduação.

Aos colegas e grandes amigos, **Rodrigo Alberto Cenci e Vinícius Salim Silveira**, pela parceria e bons momentos vividos durante os anos de pós graduação na PUCRS.

À **família Leite**, em especial à **Valeska**, pelo apoio e paciência nos diversos momentos de angústia e aflição inerentes desta etapa acadêmica.

Aos meus irmãos **Luciane, Liselena, Leandro e Letícia**, pelos exemplos que vocês representam e pela unidade familiar que compomos e mantemos com alegria.

A **Deus**.

“Um homem precisa viajar. Por sua conta, não por meio de histórias, imagens, livros ou TV. Precisa viajar por si, com seus olhos e pés, para entender o que é seu. Para um dia plantar as suas próprias árvores e dar-lhes valor. Conhecer o frio para desfrutar o calor. E o oposto. Sentir a distância e o desabrigo para estar bem sob o próprio teto. Um homem precisa viajar para lugares que não conhece para quebrar essa arrogância que nos faz ver o mundo como imaginamos, e não simplesmente como é ou pode ser; que nos faz professores e doutores do que não vimos, quando deveríamos ser alunos, e simplesmente ir ver. É preciso questionar o que se aprendeu. É preciso ir tocá-lo”.

Amyr Klink

RESUMO

As patologias periapicais recidivantes são um desafio ao clínico. A evolução das técnicas e dos materiais utilizados para cirurgia periapical tem aumentado as taxas de sucesso deste tratamento. A padronização dos métodos de esterilização e dos meios de armazenamento dos espécimes em bancos de dentes humanos é fundamental para a fidelidade dos resultados das pesquisas. O objetivo deste trabalho foi avaliar, *in vitro*, os efeitos da autoclavagem e armazenamento de dentes apicectomizados e retro-obturados com agregado trióxido mineral (MTA) em diferentes meios. Utilizou-se 72 dentes (36 autoclavados e 36 não autoclavados), armazenados em três diferentes meios: água destilada a 4°C, água destilada em geladeira de banco de ossos a -85°C e formol a 10%. Todos os dentes foram tratados endodonticamente, apicectomizados com broca em 90° ao longo eixo do dente, retro-preparados com ultrassom e retro-obturados com MTA. Foram avaliados, por microscopia eletrônica de varredura (MEV), a qualidade da retro-obturação através da quantifica o do espaço (*gap*) entre o material retro-obturador e a parede interna do canal e a composi o química do dente e do material retro-obturador por espectrometria de raios x por dispersão de energia (EDS). A análise por MEV demonstrou que a autoclavagem e o armazenamento dos dentes em diferentes meios não influenciou na adapta o marginal do MTA ao dente. A análise por EDS demonstrou que a autoclavagem e armazenamento dos dentes em diferentes meios não alterou a composi o química do dente porém, com rela o ao MTA, houve um aumento significativo do elemento químico silício nas amostras autoclavadas e nas amostras armazenadas em água destilada a 4°C quando comparadas às amostras armazenadas em água destilada em geladeira de banco de ossos a -85°C.

Descritores: Apicectomia; Microscopia Eletrônica de Varredura; Espectrometria; Banco de Dentes Humanos.

ABSTRACT

The recurrent periapical pathologies are a challenge to the clinician. The evolution of techniques and materials used for periapical surgery has increased the success rate of this treatment. The standardization of methods of sterilization and means of storage of extracted human teeth in banks is fundamental to the reliability of the results of the research. The aim of this study was to evaluate the effects of autoclaving and storage apicoectomized teeth and retrofilled with mineral trioxide aggregate (MTA) in different ways. Were used 72 teeth (36 autoclaved and non-autoclaved 36), stored in three different media: distilled water at 4 ° C in distilled water in bone bank refrigerator at -85 ° C and 10% formaldehyde. All teeth were treated endodontically, apicectomized with drill at 90 ° to the long axis of the tooth, made with retro-retro-ultrasound and filled with MTA. Were evaluated by scanning electron microscopy (SEM), the quality of retro-filling through the quantification of space (gap) between the retrofilling material and the inner wall of the root channel and the chemical composition of the material and the dentin surface with energy-dispersive x-ray spectrometry (EDS). SEM analysis showed that the sterilization and storage of teeth in different media did not influence the marginal adaptation of MTA to the tooth. The analysis by EDS shows that the sterilization and storage of the teeth in different media did not alter the chemical composition of the tooth however, with respect to MTA, a significant increase of the chemical element silicon in autoclaved samples and on samples stored in distilled water at 4 ° C compared to samples stored in water in refrigerator bone bank at -85 ° C.

Descriptors: Apicoectomy; Scanning Electron Microscopy; Spectrometry; Human Teeth Bank

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Montagem do dispositivo para tomada radiográfica **25**
- Figura 2.** Em A: detalhe da amostra apicectomizada e retro-ponta ultra-sônica. Em B: retro-preparo **27**
- Figura 3.** Material retro-obturador utilizado (MTA branco- Angelus®) **28**
- Figura 4.** Amostras dispostas e coladas com fita dupla-face sobre lâminas de microscopia óptica (MO), dentro do campo de avaliação do MEV, antes da metalização **30**
- Figura 5.** Áreas/ quadrantes selecionados para posterior aquisição de imagem em 2000x **32**
- Figura 6.** A, quadrante superior; B, quadrante direito; C, quadrante inferior; D, quadrante esquerdo. DE = Dentina; MTA = agregado trióxido mineral **32**
- Figura 7.** Áreas selecionadas para aquisição do EDS, em região de dentina e material retro-obturador (MTA) **33**
- Figura 8.** Amostras retro-obturadas com MTA. Em A: amostra pertencente a um dos grupos armazenados em formol 10% (A3 ou B3), com escurecimento do MTA. Em B: amostra pertencente a um dos grupos armazenados em água destilada (A1, A2, B1 ou B2), com MTA em sua coloração habitual **36**

LISTA DE TABELAS E QUADROS

- Tabela 1.** Distribuição dos grupos experimentais. Grupo A - dentes esterilizados. Grupo B - dentes não esterilizados **29**
- Tabela 2.** Distribuição dos grupos experimentais após preparo das amostras. Grupo A - dentes esterilizados. Grupo B - dentes não esterilizados **35**
- Quadro 1.** Variável dependente: medida do *Gap* para fator ESTERILIZAÇÃO **36**
- Quadro 2.** Variável dependente: medida do *Gap* para o fator ARMAZENAMENTO **37**
- Quadro 3.** Variável dependente: Quantificação por EDS do elemento químico OXIGÊNIO no material retro-obturador. Fator ESTERILIZAÇÃO **38**
- Quadro 4.** Variável dependente: Quantificação por EDS do elemento químico OXIGÊNIO no material retro-obturador. Fator ARMAZENAMENTO **38**
- Quadro 5.** Variável dependente: Quantificação por EDS do elemento químico ALUMÍNIO no material retro-obturador. Fator ESTERILIZAÇÃO **38**
- Quadro 6.** Variável dependente: Quantificação por EDS do elemento químico ALUMÍNIO no material retro-obturador. Fator ARMAZENAMENTO **39**
- Quadro 7.** Variável dependente: Quantificação por EDS do elemento químico SILÍCIO no material retro-obturador. Fator ESTERILIZAÇÃO **39**
- Quadro 8.** Variável dependente: Quantificação por EDS do elemento químico SILÍCIO no material retro-obturador. Fator ARMAZENAMENTO **39**
- Quadro 9.** Variável dependente: Quantificação por EDS do elemento químico CÁLCIO no material retro-obturador. Fator ESTERILIZAÇÃO **40**

Quadro 10. Variável dependente: Quantificação por EDS do elemento químico CÁLCIO no material retro-obturador. Fator ARMAZENAMENTO	40
Quadro 11. Variável dependente: Quantificação por EDS do elemento químico OXIGÊNIO na dentina. Fator ESTERILIZAÇÃO	40
Quadro 12. Variável dependente: Quantificação por EDS do elemento químico OXIGÊNIO na dentina. Fator ARMAZENAMENTO	41
Quadro 13. Variável dependente: Quantificação por EDS do elemento químico FÓSFORO na dentina. Fator ESTERILIZAÇÃO	41
Quadro 14. Variável dependente: Quantificação por EDS do elemento químico FÓSFORO na dentina. Fator ARMAZENAMENTO	41
Quadro 15. Variável dependente: Quantificação por EDS do elemento químico CÁLCIO na dentina. Fator ESTERILIZAÇÃO	42
Quadro 16. Variável dependente: Quantificação por EDS do elemento químico CÁLCIO na dentina. Fator ARMAZENAMENTO	42

LISTA DE ABREVIATURAS

ISO	International Organization for Standardization
%	Porcento
MTA	Mineral Trioxide Aggregate
°	Graus
FDA	Food and Drug Administration
°C	Graus Celsius
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
psi	Unidade de pressão no sistema inglês “libra por polegada quadrada”
EDS	Espectometria de raios X por dispersão de energia
mm	Milímetros
®	Marca registrada
cm	Centímetros
s	Segundos
NaOCl	Hipoclorito de Sódio
RPM	Rotações por minuto
NaCl	Cloreto de Sódio
MO	Microscopia ótica
µm	Micrômetros
KV	Kilovolts
SE	Secondary Electron
GAP	Termo em inglês de significado “lacuna/espaco”
n°	Número
X	Veze
ANOVA	Termo estatístico em inglês: <i>Analysis of Variance</i>
CIV	Cimento de Ionômero de Vidro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISTA DE LITERATURA.....	17
3 OBJETIVOS.....	22
4 METODOLOGIA.....	23
4.1 Seleção das amostras.....	23
4.2 Preparo das amostras.....	24
4.3 Avaliação radiográfica.....	24
4.4 Tratamento endodôntico.....	26
4.5 Apicectomia, retro-preparo e retro-obturaçã.....	27
4.6 Organização dos grupos.....	28
4.7 Avaliação em MEV.....	29
4.8 Aquisição das imagens em MEV.....	31
4.9 Análise das imagens em MEV.....	31
4.10 Análise estatística.....	33
4.11 Aspectos éticos.....	34
5 RESULTADOS	35
6 DISCUSSÃO.....	43
7 CONCLUSÕES.....	48
8 REFERÊNCIAS.....	49
9 ANEXOS.....	55

1. INTRODUÇÃO

A cirurgia paraendodôntica é um procedimento que inclui exposição cirúrgica do ápice comprometido, amputação do mesmo, preparo cavitário e retro-obturação do canal radicular ⁽¹⁻²⁾. O sucesso da cirurgia paraendodôntica está vinculado à realização adequada das diversas etapas desse procedimento cirúrgico.

Os testes *in vitro* são necessários para proporcionar suporte científico nas fases de desenvolvimento de um novo material e servir de embasamento para estudos clínicos. Para executá-los, normalmente, são empregados dentes humanos ou de animais, procurando-se reproduzir as condições mais próximas de interação entre o material e a estrutura dental ⁽³⁾. Uma variedade de métodos para estoque de dentes nos bancos de tecidos tem sido utilizada. Segundo Lório et al., os meios de armazenamento de dentes para pesquisas podem promover diferentes resultados nos estudos de micro-infiltração marginal ⁽⁴⁾.

Em endodontia e cirurgia apical, dentes extraídos são rotineiramente utilizados em pesquisas para avaliar diferentes materiais e técnicas. A resolução técnica da ISO 11405: 2003 que regulamenta os testes de adesão de materiais dentários às estruturas dentais, determina que o armazenamento dos dentes é um importante fator na obtenção de resultados consistentes. Apesar disto, uma padronização para realização destes testes ainda é uma busca constante entre os pesquisadores com a finalidade primordial de obter uma correlação entre as performances laboratorial e clínica dos materiais ⁽⁵⁾.

Diversos estudos têm sido realizados com o objetivo de determinar qual a técnica de apicectomia e preparo das retro-cavidades que proporcione uma menor alteração no 1/3 apical e minimize a micro-infiltração. O preparo da retro-cavidade é executado, tradicionalmente, com o auxílio de brocas, micro-motor e contra-ângulo; entretanto, um sistema ultra-sônico, com pontas menores para preparo das retro-cavidades, foi introduzido recentemente permitindo melhor acesso ao extremo apical. Análises comparativas entre esses dois sistemas têm sido realizadas com alta frequência ⁽⁶⁾.

Muitos estudos têm mostrado que o agregado trióxido mineral (MTA) é um excelente material retro-obturador. Estudos laboratoriais *in vitro* e utilizando modelos animais tem demonstrado que o MTA possui biocompatibilidade e potencial de

reparo dos tecidos perirradiculares superiores aos demais materiais retro-obturadores disponíveis^{7,8,9,10}.

Estudos clínicos comparativos publicados até o momento têm reportado altas taxas de sucesso quando comparado com outros tipos e materiais^{11,12,13,14}, embora as diferenças encontradas não sejam significantes.

A opção por técnica endodôntica, apicectomia, retro-cavitação e retro-obturação, deve ser criteriosamente avaliada para que se possa indicar, com mais segurança, uma rotina de procedimentos com maiores taxas de sucesso, a partir da revista da literatura.

Comparar as diferentes formas de armazenamento dos dentes em bancos de tecidos humanos parece ser relevante no sentido de maximizar recursos de bancos de dentes humanos institucionais objetivando melhor viabilizar pesquisas *in vitro* que possam elucidar questões de pesquisa e qualificar a clínica nesta área do conhecimento.

2. REVISTA DE LITERATURA

A cirurgia periapical é o tratamento ou prevenção da patologia perirradicular por meio de abordagem cirúrgica de um dente que não pode ser tratado pela endodontia convencional ¹⁵. Em geral, incluem-se neste conceito: drenagem de abscessos, cirurgia periapical, cirurgia corretiva das perfurações e reabsorções externas e apicectomia^{16,17}.

A endodontia sempre foi conhecida como uma terapia que permite manter um dente que, de outra maneira, seria extraído. Em algumas situações, as lesões e patologias periapicais não podem ser tratadas pelo tratamento ou retratamento endodôntico, sendo indicado o tratamento cirúrgico periapical^{15,17,18}. As indicações para o tratamento cirúrgico periapical são: canais obstruídos ou materiais extravasados pelo forame apical em dentes com lesões radiolúcidas e/ ou sintomatologia clínica, insucesso do tratamento endodôntico sendo o retratamento contra indicado (presença do istmo, risco de perfuração radicular, sintomatologia aguda persistente) e perfurações radiculares não tratáveis pelo canal radicular¹⁵.

A cirurgia periapical tem mudado radicalmente nos últimos 20 anos, desde alterações na técnica cirúrgica até o desenvolvimento dos biomateriais aplicados ¹⁹. Baseada nisso, a cirurgia apical é considerada uma viável alternativa terapêutica para salvar um dente com patologia apical que não pode ser tratado por terapia endodôntica convencional não cirúrgica ^{17,20}. Taxas de sucesso acima de 90% tem sido relatadas na literatura utilizando as modernas técnicas de cirurgia periapical ²⁰.

Um dos objetivos da cirurgia apical é o selamento hermético do sistema de canais radiculares após a ressecção do ápice e, assim, eliminar as bactérias do sistema de canais radiculares e estabelecer uma barreira efetiva para impedir a passagem de microrganismos e/ ou seus produtos para os tecidos da região apical. O sucesso deste selamento está acompanhado de um bom retro-preparo cavitário apical e um bom material retro-obturador ²¹.

A ressecção do extremo apical pode ser realizada com o auxílio de brocas e micro-motor com contra ângulo ou sistema ultra-sônico. O uso de brocas tem demonstrado significativamente ser o método mais rápido e que promove uma superfície regular e lisa na área apicetomizada ^{22,23}.

O estudo realizado por Gilheany, em 1994, revelou que entre as diferentes técnicas de preparo cavitário avaliadas, o corte com 90° de angulação e 3 mm de

profundidade expõe um menor número de túbulos dentinários e promove uma remoção das ramificações do delta apical mais efetivo¹⁹. A ressecção dos três milímetros apicais remove aproximadamente 98% das ramificações apicais e 94% das canais laterais²⁴. Dessa forma, consegue-se diminuir a micro-infiltração entre as paredes dentinárias e o material retro-obturador bem como a menor exposição de túbulos dentinários seccionados após a apicectomia^{19,25}.

Tradicionalmente, os instrumentos rotatórios foram usados no retro-preparo do canal radicular. Por muitos anos, o retro-preparo cavitário do ápice dental foi realizado por brocas tipo cone invertido para peças de mão de alta rotação, entretanto, esta técnica possui muitas limitações: o eixo de preparação não é paralelo ao canal radicular; há um maior risco de causar perfuração na parede cavitária lingual; insuficiente profundidade do preparo cavitário; o uso de broca convencional diminui a visibilidade durante o procedimento obrigando, assim, a realizar uma apicectomia em ângulo de 45°^{21,26}.

No início dos anos de 1990, a introdução do sistema ultra-sônico revolucionou a técnica de retro-preparo e tem se tornado uma alternativa útil em casos de apicectomias de difícil acesso, devido a forma, tamanho e angulação de sua parte ativa^{17, 21, 22, 27}.

As vantagens observadas no preparo das cavidades com ultra-som incluem a facilidade de acesso nas áreas de espaço limitado, cavidades mais profundas e, seguindo o longo eixo do canal, diminuindo as chances de perfuração lateral. Além disso, a apicectomia pode ser realizada em um ângulo de 90°, já que as retro-pontas ultra-sônicas conseguem atingir a área do canal radicular devido a sua angulação. As paredes cavitárias tornam-se mais paralelas, causando uma melhor distribuição do material da cavidade, proporcionando um vedamento apical mais eficiente^{21,28}. Um estudo mais recente mostrou que, nas retro-cavidades preparadas com ultra-som, ocorre menor infiltração de corante quando comparado com aquelas feitas com broca de aço²⁹.

Diversos materiais são usados para a retro-obturação dos canais radiculares: amálgama, cimento de ionômero de vidro, óxido de zinco e eugenol, compósitos resinosos e, mais recentemente, o agregado trióxido mineral (MTA).

As características desejáveis de um material retro-obturador de reparo incluem: capacidade de selar adequadamente a cavidade, biocompatibilidade,

induzir osteogênese e cementogênese³⁰, ser insolúvel em fluidos teciduais, estável dimensionalmente, não reabsorvível e radiopaco³¹.

As pesquisas com o MTA iniciaram no princípio dos anos de 1990. O primeiro relato na literatura científica ocorreu em 1993³² e, em 1998, o material foi aprovado para uso endodôntico pela *U.S. Food and Drug Administration* (FDA)³³.

O MTA tem mostrado resultados iguais ou superiores aos outros materiais retro-obturadores no que se refere a biocompatibilidade, infiltração bacteriana e de corantes, adaptação marginal, solubilidade e resistência à compressão³⁴.

Além de possuir biocompatibilidade adequada, o MTA demonstra, *in vivo*, uma performance biológica desejável devida à formação de hidroxiapatita quando o material entra em contato com soluções fisiológicas em retro-obturações, reparo das perfurações, capeamentos pulpares, pulpotomias e apicificações³¹. Na presença do MTA, é possível que ocorra a regeneração dos tecidos perirradiculares e do cimento^{8,35}.

Dentes humanos extraídos têm sido utilizados para pesquisas *in vitro*. Os testes laboratoriais são necessários e fornecem suporte científico nas fases de desenvolvimento de um material a ser lançado no mercado⁴. Além disso, o clínico pode comparar a performance de diferentes produtos em estudos *in vivo* e *in vitro*³⁶.

A padronização dos métodos de esterilização e dos meios de armazenamento dos espécimes em bancos de dentes humanos é fundamental para a fidelidade dos resultados das pesquisas.

Para evitar infecções cruzadas, os dentes extraídos e utilizados para pesquisas devem ser esterilizados antes da sua manipulação^{37, 38, 39}. No que se refere ao método de esterilização, diversas técnicas são pesquisadas, como: a esterilização em autoclave, óxido de etileno e radiação gama³⁹. O Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos da América sugere que ciclos de autoclave de 40 minutos a 121°C e 15 psi são suficientes para inibir o crescimento de microrganismos nas estruturas internas e externas do dente^{38, 40}.

Como alternativa ao ciclo de autoclave, a imersão dos dentes em solução de formol a 10% por duas semanas também pode ser utilizada, principalmente naqueles dentes restaurados com amálgama e que, portanto, não podem ser esterilizados em autoclaves^{36, 38, 41}. Os efeitos da autoclavagem, como uma possível alteração da estrutura química e/ou micromecânica influenciando a relação entre materiais dentários e a dentina, ainda permanecem desconhecidos⁴².

Para o armazenamento de dentes nos bancos de tecidos humanos, a ISO 11405:2003, que regulamenta os testes de adesão à estrutura dentária, sugere o armazenamento dos dentes em água destilada a 4°C⁵. Outros meios têm sido utilizados como: formol a 10%^{36, 41, 43}, criopreservação⁴⁴, soro fisiológico 0,9%, Cloramina-T a 0,5%, Hipoclorito de Sódio a 5,25%, Glutaraldeído a 2%³⁶ e dentes mantidos sem hidratação⁴⁵.

O meio de armazenamento de dentes extraídos, entretanto, pode provocar alterações químicas e ópticas na superfície dentinária, afetar a resistência adesiva, influenciar a permeabilidade da dentina e influenciar a própria microinfiltração^{41, 43, 46}. A solução de estoque e os métodos de esterilização podem influenciar como substratos dentários respondem aos materiais dentários aplicados³⁶.

O armazenamento em formol 10% resulta em uma significativa redução na micro-infiltração apical quando comparado a um grupo de dentes não fixado em formol. O mecanismo que produziu este efeito é incerto, mas pode ser relacionado a uma alteração nos tecidos dentários pelas propriedades de fixação do formol⁴³. Outros autores sugerem que a imersão em formol a 10% pode ser a melhor forma de armazenar dentes bovinos com a finalidade de usá-los em testes de adesão *in vitro*, já que a esterilização em autoclave mostrou afetar negativamente a força de adesão dos materiais a superfície dentária quando comparado ao grupo imerso em formol a 10% por duas semanas³⁶.

A criopreservação tem sido utilizada em banco de dentes humanos com o objetivo de manter viáveis células tronco da polpa dentária⁴⁷ e células do ligamento periodontal⁴⁸. Temperaturas entre -85°C e -196°C conseguem manter, sem perda da funcionalidade, células tronco derivadas da polpa⁴⁷. Dentes mantidos em solução e imersos em tanques com nitrogênio líquido a -196°C e dentes não congelados não apresentaram diferenças de dureza, porém 25% dos dentes congelados apresentavam fraturas longitudinais⁴⁸.

Dentes extraídos armazenados de forma não hidratada também já foram utilizados em pesquisas. Alguns autores observaram que no preparo do canal radicular esses dentes apresentaram diferenças significativas na comparação com os dentes armazenados em solução de soro fisiológico. Outros estudos constataram que houve uma maior microinfiltração nos dentes mantidos secos para depois serem re-hidratados quando comparados a outras soluções de armazenamento⁴⁵.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Essa pesquisa objetivou investigar resultados da técnica de retro-obturação com agregado trióxido mineral (MTA) *in vitro*, considerando dois grupos de dentes (autoclavados e não autoclavados) divididos em três subgrupos diferentes de acordo com os três meios de armazenamento das amostras; Têm-se como objetivos específicos:

3.2. Objetivos Específicos

3.2.1 Avaliar quantitativamente o *gap* entre a parede interna do canal e o material retro-obturador, por meio de análise por MEV, nos cortes transversais realizados nas amostras de espécimes retro-obturados com agregado trióxido mineral (MTA), considerando dois grupos de dentes (autoclavados e não autoclavados) divididos em três subgrupos diferentes de acordo com os três meios de armazenamento das amostras;

3.2.2 Avaliar quantitativamente a composição química da dentina e do material retro-obturador, por meio de (EDS) nos cortes transversais realizados nas amostras de espécimes retro-obturados com agregado trióxido mineral (MTA), considerando dois grupos de dentes (autoclavados e não autoclavados) divididos em três subgrupos diferentes de acordo com os três meios de armazenamento das amostras;

4. METODOLOGIA

4.1 Seleção da amostra

A amostra deste trabalho foi constituída por 72 dentes monorradiculares superiores (incisivos e caninos) com anatomia clássica de uma raiz e formação radicular completa. Para a inclusão no estudo, deveriam seguir os seguintes critérios:

- a) Todos os dentes serem obtidos no Banco de Dentes da Faculdade de Odontologia da Universidade de Passo Fundo, a qual possui normas para doação e utilização das unidades dentárias que seguem os fundamentos da Bioética;
- b) Não apresentar fratura radicular, reabsorção dentinária e/ou grandes dilacerações apicais;
- c) Não haver tratamento endodôntico prévio;
- d) Todos os dentes foram armazenados refrigerados em água destilada a 4°C até trinta dias antes do início da manipulação da amostra. O líquido foi trocado periodicamente (a cada 15 dias), para minimizar a deterioração⁵.
- e) Antes do início da manipulação, os 72 dentes foram divididos em dois grupos de 36 dentes (grupos A e B). Trinta e seis dentes foram esterilizados em autoclave, com ciclo de 40 minutos, a 121°C e 15 psi (grupo A). Os trinta e seis dentes restantes não foram submetidos a nenhum processo de esterilização (grupo B);
- f) Trinta dias antes do início do tratamento endodôntico, os 72 dentes foram divididos em seis subgrupos de doze dentes e armazenados da seguinte forma:
 - Doze dentes esterilizados em autoclave foram armazenados em frascos com água destilada e mantidos em geladeira a 4°C (grupo A1);
 - Doze dentes esterilizados em autoclave foram colocados em água destilada em frascos tampados e armazenados em geladeira de banco de ossos a -85°C (grupo A2);

-Doze dentes esterilizados em autoclave foram colocados em frascos contendo formol a 10% (grupo A3);

-Doze dentes não esterilizados foram armazenados em frascos com água destilada e mantidos em geladeira a 4°C (grupo B1);

-Doze dentes não esterilizados foram colocados em água destilada em frascos tampados e armazenados em geladeira de banco de ossos a -80°C (grupo B2);

-Doze dentes não esterilizados foram colocados em frascos contendo formol a 10% (grupo B3);

4.2 Preparo das amostras

Todos os dentes selecionados passaram por rápida limpeza da superfície radicular, com a intenção de uma manipulação mais precisa. A limpeza se limitou à fricção com gaze embebida em solução de Cloreto de Sódio a 0,9% e raspagem dos cálculos da junção amelo-cementária que eventualmente poderiam dificultar a correta identificação desta. Este procedimento faz parte da rotina do Banco de Dentes da Faculdade de Odontologia da Universidade de Passo Fundo (FOUPF).

Com o objetivo de padronizar o comprimento radicular, as coroas dentárias foram seccionadas com discos de carborundum perpendicularmente ao longo eixo do dente a uma distância de 16 mm contando-se a partir do ápice dentário em direção a porção radicular cervical (medida externa, com auxílio de um paquímetro digital de precisão).

Para execução de todas as etapas do experimento, cada dente foi armazenado separadamente em um tubo de ensaio tipo eppendorf, devidamente numerado (01 ao 72) para identificação.

4.3 Avaliação radiográfica

Todas as unidades dentárias foram radiografadas com sensor digital iOX2 da marca Fimet[®] (North Wales, UK) em três momentos distintos: antes do tratamento endodôntico, após o tratamento endodôntico e após a retrobturação para a verificação da qualidade da técnica. Foi padronizada a distância foco-filme de 30cm e o tempo de exposição de acordo com a qualidade da radiografia (de 0,43s).

As raízes foram posicionadas ao longo do maior comprimento e no centro do filme radiográfico. Os dentes foram radiografados no sentido vestibulo-lingual e mesio-distal (Figura 1).

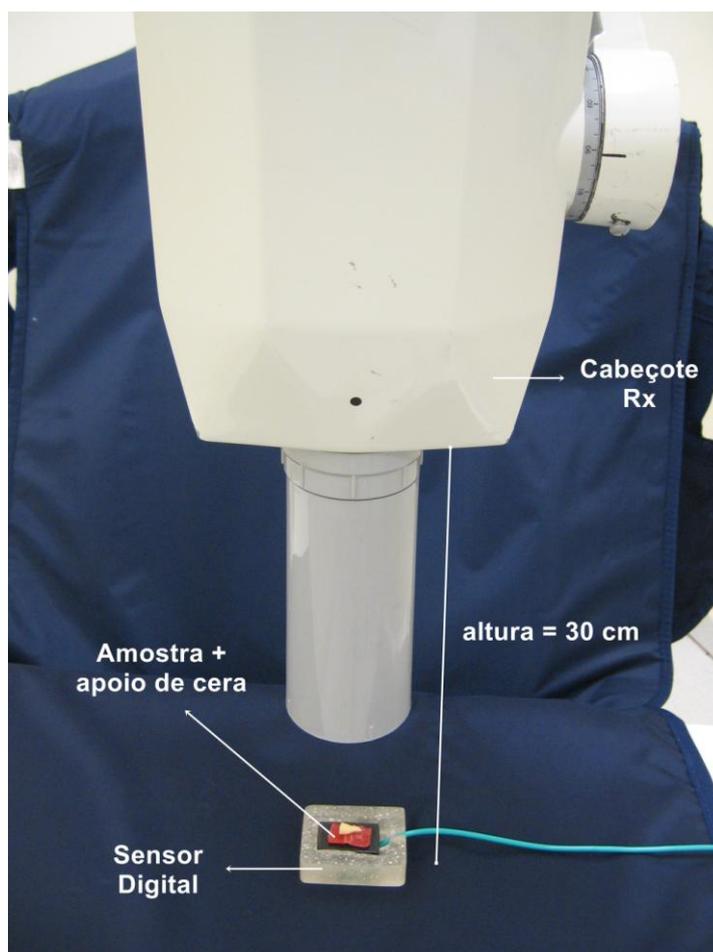


Figura 1. Montagem do dispositivo para tomada radiográfica.

Fonte: Dados da presente pesquisa (PPG/PUCRS, 2013).

O processamento da imagem foi realizado com o software IOX2SCAN 4.7.3.30 próprio do sistema de radiografia digital, no Laboratório de Radiologia da Faculdade de Odontologia da Universidade de Passo Fundo (FOUPF), sob responsabilidade técnica do Professor Dr. Mateus Ericson Flores.

Neste trabalho, as imagens radiográficas foram utilizadas para avaliação anatômica inicial e das técnicas endodôntica e retro-obturadora. Serviram portanto, para padronização das amostras e possível exclusão de alguma amostra que não apresentasse a qualidade técnica adequada.

Os dentes que não estivessem com o tratamento endodôntico ou a retro-obturação adequados seriam descartados.

4.4 Tratamento endodôntico

Os dentes monorradiculares utilizados não deveriam apresentar fraturas visíveis, cárie ou restaurações extensas, rizogênese incompleta ou tratamento endodôntico prévio.

A instrumentação e a obturação endodôntica foram realizados por apenas um cirurgião-dentista especializado. O alargamento da entrada do canal radicular foi realizado utilizando as brocas Gattes Glindden (Moyco Union Broach, York, PA), da seguinte maneira: Gattes #4 até a profundidade de 3mm; Gattes #3 até a profundidade de 6mm; Gattes #2 até a profundidade de 9mm, seguindo a técnica de coroa-ápice. Em seguida, uma lima #15 K-flexofile foi introduzida no canal até que sua ponta fosse visualizada no forame apical e essa medida foi então registrada. O comprimento de trabalho foi definido diminuindo-se 0,5mm dessa medida. Os canais foram preparados utilizando limas K-flexofile (Dentsply, Maillefer, Ballaigues, Suíça). Após a troca de cada lima o canal foi irrigado com 0,5ml de hipoclorito de Sódio (NaOCl) a 2,5% em seringas descartáveis com pontas de irrigação sem bisel 25 x 10 (NaviTips, Ultradent, South Jordan, UT). A aspiração foi feita com cânulas de aspiração (Können, São Paulo, SP) e agulha hipodérmica de aspiração 40 x 20 (Können, São Paulo, SP). Após o preparo do canal, foi feita irrigação com 1ml de NaOCl 2,5% e a patência foi confirmada através da extrusão de NaOCl pelo forame apical. Buscando a padronização do diâmetro da luz do canal após a instrumentação endodôntica, foi estabelecido como instrumento memória a lima #55. A seguir os canais foram secados com pontas de papel absorventes (Dentsply, Maillefer, Ballaigues, Suíça) e a obturação foi conduzida utilizando cones de guta-percha (ISO TP, Dentsply, Maillefer, Ballaigues, Suíça) e cimento a base de óxido de zinco e eugenol (Endo-Fill® Dentsply, Maillefer, Ballaigues, Suíça) através da técnica híbrida proposta por Tagger, que utiliza a condensação lateral com o auxílio de espaçadores manuais e o condensador de McSpadden #55 (Dentsply, Maillefer, Ballaigues, Suíça). O comprimento do condensador foi definido em 4mm aquém do comprimento de trabalho. O extravasamento de guta-percha foi imediatamente removido com o auxílio de uma lâmina de bisturi #15 (Miltek, York, PA). As amostras foram então

armazenadas em estufas a 37°C e 100% de umidade até a próxima etapa (apicectomia, retro-preparo e retro-obturação).

Após a endodontia, os dentes foram novamente radiografados para verificação da qualidade da obturação, constatada a partir da total radiopacidade do canal radicular.

4.5 Apicectomia, retro-preparo e retro-obturação

A apicectomia foi realizada em todos os dentes com uma broca #699 (Jet Carbide Burs, Beavers Dental, ON, Canadá) ²³, a 15.000 rpm, refrigerada com solução fisiológica (NaCl a 0,9%), em 90° de angulação com o longo eixo dental e no mesmo sentido da rotação da broca, a 3 mm do ápice dentário ²⁴.

Para a confecção das retro-cavidades de todos os dentes, foi utilizado o aparelho de ultra-som modelo Jet Sonic Four Plus® (Gnatus – Brasil). Tal aparelho foi aplicado com potência variável, numa escala própria entre um e 10, ajustado conforme orientação do fabricante, para a posição S (scalling). O retro-preparo foi realizado com uma retro-ponta de aço “S12”, desenhada especificamente para esta finalidade, na potência 8, sob irrigação constante de solução fisiológica (NaCl a 0,9%). A largura da cavidade correspondeu ao diâmetro da retro-ponta e a profundidade foi de três milímetros (Figura 2).

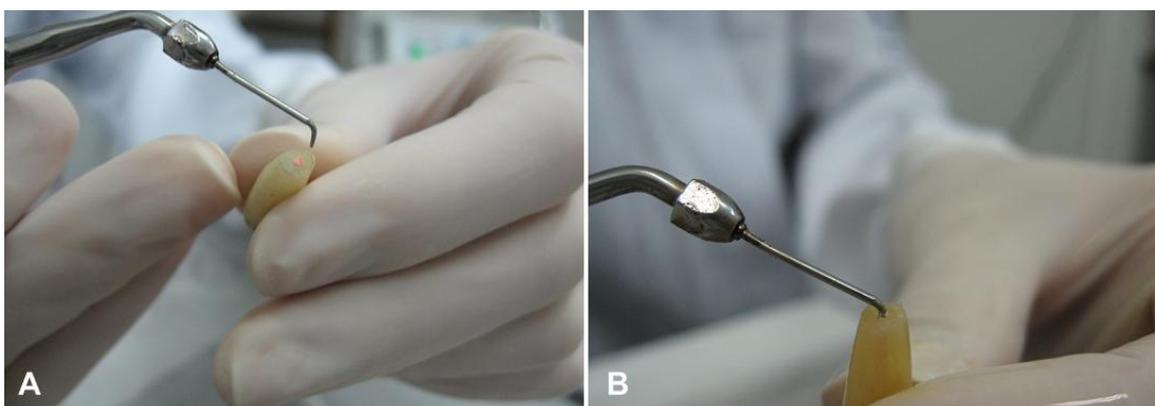


Figura 2. Em A: detalhe da amostra apicectomizada e retro-ponta ultra-sônica. Em B: retro-preparo. Fonte: Dados da presente pesquisa (PPG/PUCRS, 2013)

Todas as amostras foram retro-obturadas com agregado trióxido mineral – MTA (Ângelus®, Londrina, PR, Brasil) manipulado de acordo com as normas do fabricante (Figura 3). O material retro-obturador foi inserido em excesso na retro-

cavidade, utilizando-se porta-amálgama. Após a condensação do material na cavidade, com calcador tipo Paiva de número 11, os excessos foram removidos com uma cureta periodontal de número 1-2.



Figura 3. Material retro-obturador utilizado (MTA branco- Angelus®).
Fonte: Dados da presente pesquisa (PPG/PUCRS, 2013)

Após as apicectomias, retro-preparos e retro-obturações, todos os dentes foram mantidos em ambiente com 100% de umidade, a 37°C por 48 horas⁵, antes do início da manipulação dos espécimes para a aquisição das imagens por MEV.

4.6 Organização dos grupos

Todos os dentes foram retro-obturados com agregado trióxido mineral (MTA) e divididos em dois grupos (autoclavados e não autoclavados), com suas respectivas três subdivisões, conforme tabela abaixo (tabela 1).

Grupo	Subgrupo	Técnica	n
A	A1	Dentes em água destilada a 4°C + Apicectomia +Retro-obturação com MTA	12
	A2	Dentes em água destilada a -85°C + Apicectomia +Retro-obturação com MTA	12
	A3	Dentes em formalina a 10% + Apicectomia +Retro-obturação com MTA	12
B	B1	Dentes em água destilada a 4°C + Apicectomia +Retro-obturação com MTA	12
	B2	Dentes em água destilada a -85°C + Apicectomia +Retro-obturação com MTA	12
	B3	Dentes em formalina a 10% + Apicectomia +Retro-obturação com MTA	12

Tabela 1. Distribuição dos grupos experimentais. Grupo A - dentes esterilizados. Grupo B - dentes não esterilizados.

4.7 Avaliação em MEV

Para otimizar a avaliação das amostras, os dentes já apicectomizados, retro-preparados e retro-obturados foram cortados no sentido transversal a uma distância de quatro milímetros da área apicectomizada, na direção coronal. As amostras apresentavam, portanto, a forma de um disco de quatro milímetros de altura. Essas amostras foram lixadas, para remoção do MTA espalhado pela superfície da dentina, além do canal retro-preparado. As lixas utilizadas tinham granulação crescente de 180 e 400. Na seqüência, foi aplicado sobre as superfícies apicectomizadas ácido poliacrílico 11,5% (Vitro Condicionador, DFL[®], Rio de Janeiro, RJ), friccionando-se levemente sobre a superfície durante 20 segundos, com auxílio de um cotonete, seguindo-se de lavagem abundante em água corrente. Tal medida foi realizada com o objetivo de remover o smear layer produzido durante o lixamento das amostras, que poderia interferir na avaliação da superfície em estudo.

As amostras foram levadas ao Laboratório de Microscopia Eletrônica da PUCRS, onde ficaram no dessecador, por um período aproximado de duas

semanas, a fim de eliminar, lentamente, a água das amostras, para favorecer a visualização no microscópio.

Para a avaliação em MEV, as amostras foram aderidas com fitas adesivas de dupla face sobre uma base de vidro formada por duas lâminas de microscopia óptica (MO) unidas nas suas bordas de maior comprimento. Os espécimes foram então distribuídos dentro do campo de avaliação do Microscópio Eletrônico de Varredura (Figura 4). Após a fixação dos espécimes no campo de avaliação do MEV, o conjunto foi revestido por uma fina camada metálica. O método de metalização utilizado foi o *sputtering*, que proporciona o recobrimento das amostras com uma fina camada de ouro. Esta camada metálica faz com que a amostra se torne condutora de elétrons, possibilitando a formação das imagens pelo microscópio.

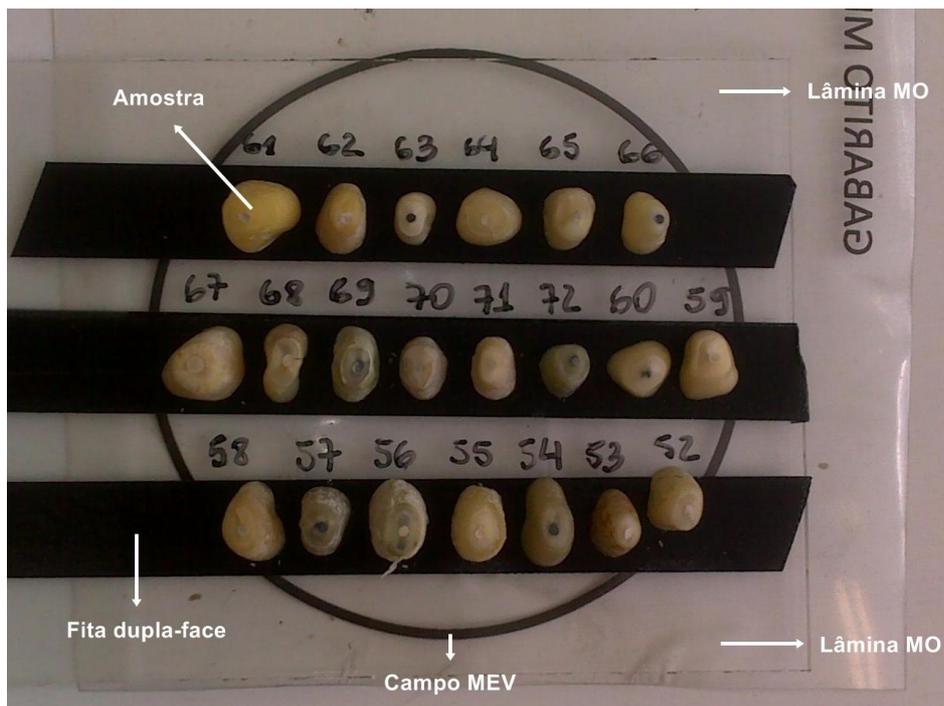


Figura 4. Amostras dispostas e coladas com fita dupla-face sobre lâminas de microscopia óptica (MO), dentro do campo de avaliação do MEV, antes da metalização.

Fonte: Dados da presente pesquisa (PPG/PUCRS, 2013)

As amostras foram observadas no MEV Phillips (Eindhoven, Holanda), modelo XL 30, com poder de resolução de 3,5mm (no modo elétron secundário) e faixa de aumentos de 10 a 400000x, tensão de aceleração de 200V a 30 kV, no Centro de Microscopia e Microanálise da PUCRS.

4.8 Aquisição das imagens por MEV

Foram obtidas imagens de MEV, dos cortes transversais da região periapical apicectomizada, retro-preparada e retro-obturada. A energia do feixe de elétrons será de 20 kV e o diâmetro do feixe de 4,9. A morfologia da superfície das amostras foi avaliada com o detector de elétrons secundários (SE) nas ampliações de 70x (para avaliação geral da superfície) e 2000x (para avaliação quantitativa do *gap* entre o material retro-obturador e as paredes do canal radicular).

4.9 Análise das Imagens de MEV

4.9.1 Avaliação do *gap*

Para a avaliação quantitativa do espaço (*gap*) entre material retro-obturador e a superfície dentinária interna da raiz foi utilizado um aumento de 2000x. A área do canal radicular retro-obturado foi dividida em quatro quadrantes: superior, inferior, direito e esquerdo (Figuras 5 e 6) sendo a medida final do *gap* a média aritmética entre os valores encontrados em cada quadrante. Para a medida do *gap* foi utilizado o *software* Image J.

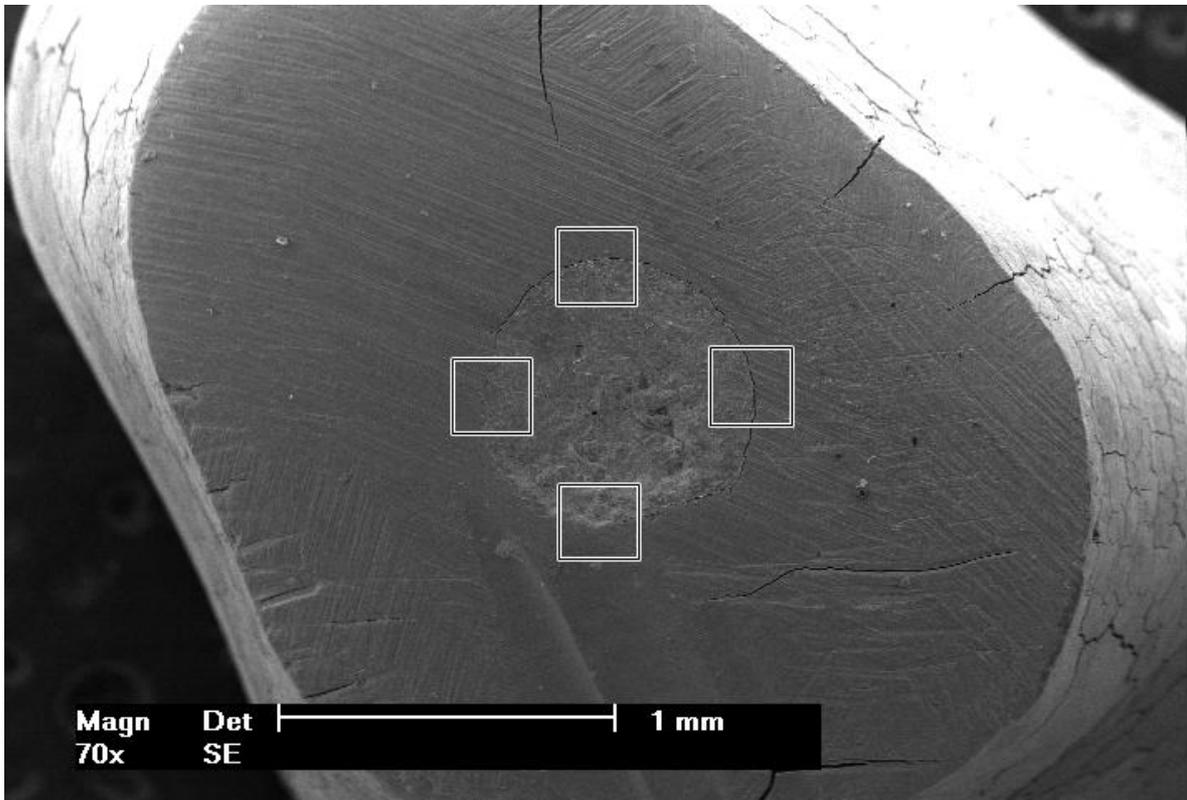


Figura 5. Áreas/ quadrantes selecionados para posterior aquisição de imagem em 2000x.

Fonte: Dados da presente pesquisa (PPG/PUCRS, 2013)

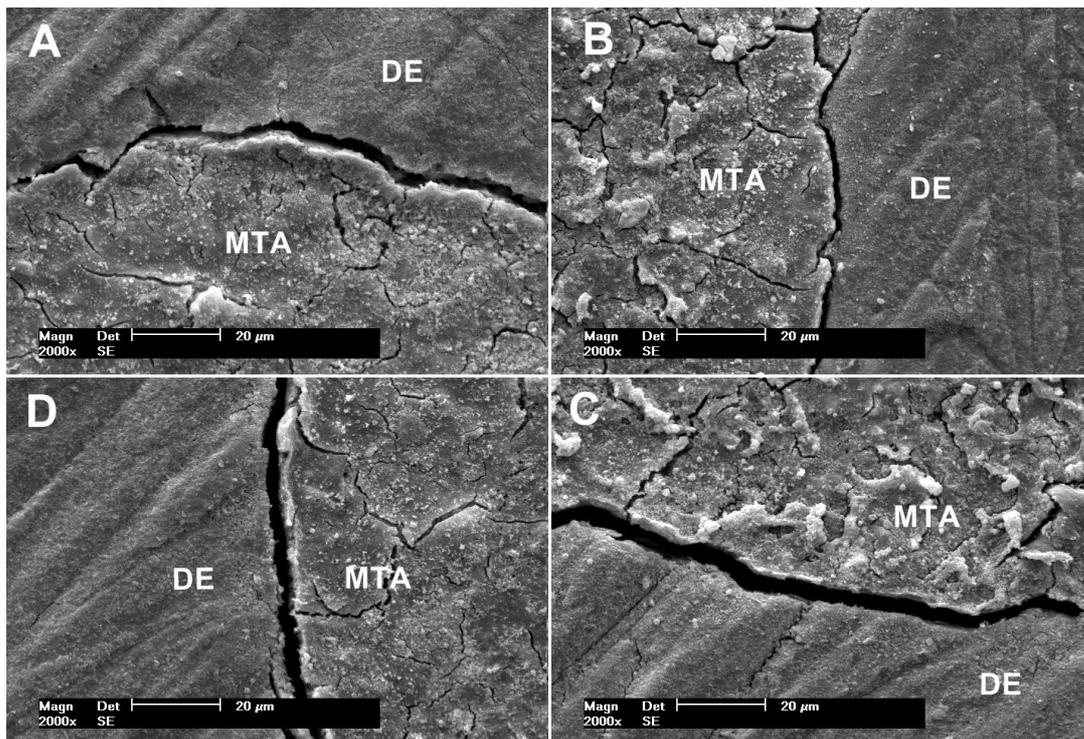


Figura 6. A, quadrante superior; B, quadrante direito; C, quadrante inferior; D, quadrante esquerdo. DE = Dentina; MTA = agregado trióxido mineral.

Fonte: Dados da presente pesquisa (PPG/PUCRS, 2013)

4.9.2 Avaliação em EDS

Foram feitas análises por EDS dos cortes transversais na região de corpo da dentina e no material retro-obturador (Figura 7), para avaliação da composição química nestes locais. Os elementos químicos selecionados para análise foram: 1- no material retro-obturador (MTA): oxigênio, alumínio, silício e cálcio; 2- na dentina: oxigênio, fósforo e cálcio.

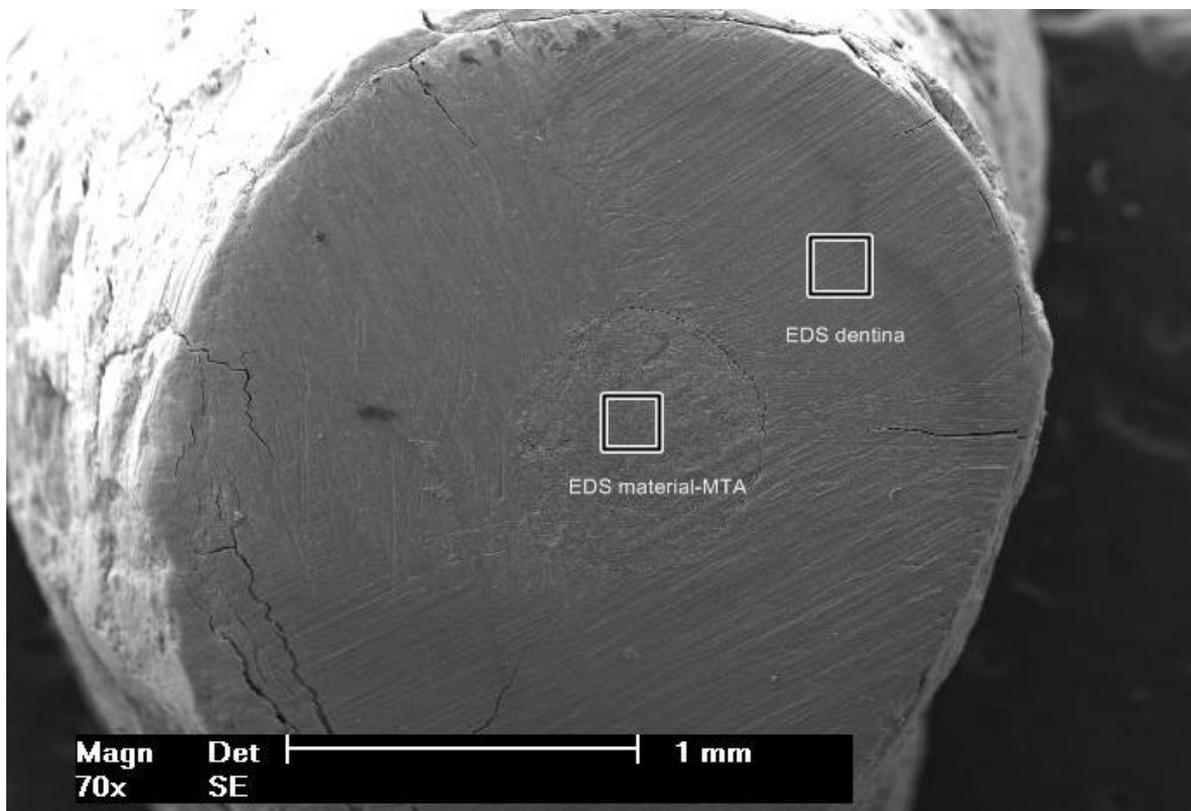


Figura 7. Áreas selecionadas para aquisição do EDS, em região de dentina e material retro-obturador (MTA).

Fonte: Dados da presente pesquisa (PPG/PUCRS, 2013).

4.10 Análise Estatística

Cálculo amostral:

Para a realização de uma análise de variância com seis níveis (grupos) usando um nível de significância de 5% e um poder de 0,80, assumindo um desvio

padrão de 2,14 do artigo de referência ⁴⁹ e supondo uma diferença máxima entre as médias de dois tratamentos de 3,42 (1,6 desvio padrão) fez-se necessário 10 dentes por nível, segundo os cálculos realizados por meio do software Minitab 15.

Análise dos dados:

Para análises de concordância inter observadores, foram utilizadas as escalas de 10 fotomicrografias e os resultados submetidos ao teste Kappa, sendo obtida significância estatística ($p < 0,05$) para a concordância dos avaliadores. ICC (coeficiente de correlação intraclasse) para variáveis quantitativas

Foi utilizado o teste de ANOVA, seguido pelo de Tukey ou de Games-Howell, para as variáveis que se apresentaram distribuídas normalmente; e o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo de Dunn, para as variáveis que não seguiram uma distribuição normal de probabilidade.

A normalidade foi testada por meio do teste de Shapiro- Wilk.

Os dados foram analisados por meio do software SPSS adotando-se um nível de significância de 5%.

Para análise da concordância entre os avaliadores da variável continua referente à medida do *gap* entre o material retro-obturador e a dentina utilizou-se o teste de correlação interclasse, que apresentou um coeficiente de 0,917, considerado excelente. Com base neste dado foram utilizadas, para a análise estatística, as medidas realizadas pelo próprio pesquisador.

4.11 Aspectos éticos:

O projeto para a realização desta pesquisa foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul-CEP/PUCRS 11/05521 (ANEXO 1).

5. RESULTADOS

Durante a fase experimental, duas amostras foram perdidas. O dente 38 (pertencente ao grupo A2), devido à fratura longitudinal durante a apicectomia. O dente 12 (pertencente ao grupo B3), devido à ausência de quantidade suficiente de material retro-obturador para a medida do *gap* durante a análise por MEV. O número de dentes perdidos foi considerado baixo e não prejudicou a análise estatística do estudo (Tabela 2).

Grupo	Subgrupo	Técnica	n
A	A1	Dentes em água destilada a 4°C + Apicectomia +Retro-obturação com MTA	12
	A2	Dentes em água destilada a -85°C + Apicectomia +Retro-obturação com MTA	11
	A3	Dentes em formalina a 10% + Apicectomia +Retro-obturação com MTA	12
B	B1	Dentes em água destilada a 4°C + Apicectomia +Retro-obturação com MTA	12
	B2	Dentes em água destilada a -85°C + Apicectomia +Retro-obturação com MTA	12
	B3	Dentes em formalina a 10% + Apicectomia +Retro-obturação com MTA	11

Tabela 2. Distribuição dos grupos experimentais após preparo das amostras. Grupo A - dentes esterilizados. Grupo B - dentes não esterilizados.

Durante a inspeção visual, após a retro-obturação e presa do MTA, notou-se que, todas as 24 amostras armazenadas em formol a 10% (grupos A3 e B3) apresentavam suas retro-obturações com colora o enegrecida em toda a extensão do material retro-obturador. Já as demais 47 amostras armazenadas em água destilada (grupos A1, A2, B1 e B2), apresentavam suas retro-obturações com colora o branca, habitual do MTA utilizado (Figura 8).

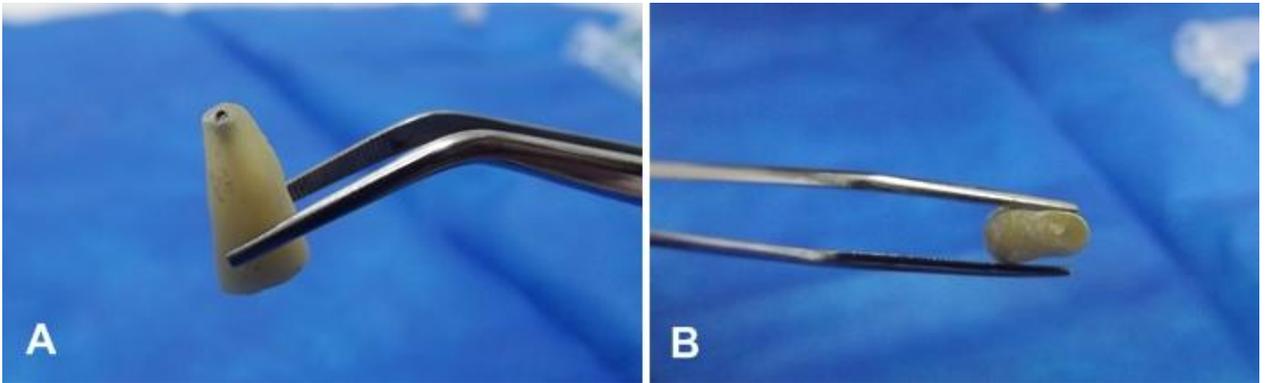


Figura 8. Amostras retro-obturadas com MTA. Em A: amostra pertencente a um dos grupos armazenados em formol 10% (A3 ou B3), com escurecimento do MTA. Em B: amostra pertencente a um dos grupos armazenados em água destilada (A1, A2, B1 ou B2), com MTA em sua coloração habitual. Fonte: Dados da presente pesquisa (PPG/PUCRS, 2013).

5.1 AVALIAÇÃO DO GAP:

A análise de variância (ANOVA) revelou não haver diferença estatisticamente significativa nas medidas do espaço (*gap*) entre o material retro-obturador e a parede dentinária interna da raiz, referente ao fator esterilização dos dentes (amostras autoclavadas versus amostras não autoclavadas), bem como em relação ao fator armazenamento (água destilada em geladeira a 4°C, água destilada em geladeira de banco de ossos a -85°C e formol 10%) (Quadros 1 e 2).

Quadro 1. Variável dependente: medida do *Gap* para fator ESTERILIZAÇÃO

ESTERILIZAÇÃO	Valor <i>Gap</i> (µm)		Intervalo de Confiança de 95%	
	Média	Desvio Padrão	Limite Inferior	Limite superior
SIM	,309	,052	,204	,414
NÃO	,335	,052	,230	,440

* Valor de P= 0,727, não significativo para o nível de 5%

Fonte: Dados da presente pesquisa (PPG/PUCRS, 2013).

Quadro 2. Variável dependente: medida do *Gap* para o fator ARMAZENAMENTO

ARMAZENAMENTO	Valor <i>gap</i> (μm)		Intervalo de Confiança de 95%	
	Média	Desvio Padrão	Limite Inferior	Limite superior
H2O 4°C	,328	,063	,201	,454
geladeira banco osso	,379	,065	,249	,508
formol	,260	,065	,130	,389

* Valor de P = 0,433, não significativo para o nível de 5%

Fonte: Dados da presente pesquisa (PPG/PUCRS, 2013).

5.2 QUANTIFICAÇÃO QUÍMICA POR EDS:

A análise por EDS dos elementos químicos Oxigênio, Alumínio e Cálcio selecionados no material retro-obturador mostrou não haver diferença estatística significativa entre os grupos, tanto no fator esterilização, quanto no fator armazenamento (Quadros 3, 4, 5, 6, 9 e 10).

O elemento químico Silício, no material retro-obturador, apresentou diferença estatística significativa no fator esterilização e no fator armazenamento quando comparados os grupos armazenados em água destilada a 4°C e água destilada em geladeira de banco de ossos a -85°C. Quando estes dois grupos foram comparados com os grupos armazenados no formol, não houve diferença estatística significativa (Quadros 7 e 8).

A análise por EDS dos elementos químicos Oxigênio, Fósforo e Cálcio selecionados na região da dentina mostrou não haver diferença estatística significativa entre os grupos, tanto no fator esterilização, quanto no fator armazenamento (Quadros 11, 12, 13, 14, 15 e 16).

5.2.1 NO MATERIAL RETRO-OBTURADOR (MTA)

5.2.1.1 Oxigênio

Quadro 3. Variável dependente: Quantificação por EDS do elemento químico OXIGÊNIO no material retro-obturador. Fator ESTERILIZAÇÃO

ESTERILIZAÇÃO	Quantificação (%)		Intervalo de Confiança de 95%	
	Média	Desvio Padrão	Limite Inferior	Limite Superior
SIM	28,653	,742	27,171	30,136
NÃO	29,449	,742	27,967	30,932

*Valor de P= 0,451, não significativo para o nível de 5%
Fonte: Dados da presente pesquisa (PPG/PUCRS, 2013).

Quadro 4. Variável dependente: Quantificação por EDS do elemento químico OXIGÊNIO no material retro-obturador. Fator ARMAZENAMENTO

ARMAZENAMENTO	Quantificação (%)		Intervalo de Confiança de 95%	
	Média	Desvio Padrão	Limite Inferior	Limite Superior
H2O 4°C	29,335	,896	27,546	31,124
geladeira banco osso	28,607	,916	26,778	30,436
formol	29,211	,916	27,382	31,041

*Valor de P= 0,833, não significativo para o nível de 5%
Fonte: Dados da presente pesquisa (PPG/PUCRS, 2013).

5.2.1.2 Alumínio

Quadro 5. Variável dependente: Quantificação por EDS do elemento químico ALUMÍNIO no material retro-obturador. Fator ESTERILIZAÇÃO

ESTERILIZAÇÃO	Quantificação (%)		Intervalo de confiança de 95%	
	Média	Desvio Padrão	Limite Inferior	Limite Superior
SIM	4,127	,396	3,336	4,919
NÃO	3,423	,396	2,632	4,215

*Valor de P= 0,214, não significativo para o nível de 5%
Fonte: Dados da presente pesquisa (PPG/PUCRS, 2013).

Quadro 6. Variável dependente: Quantificação por EDS do elemento químico ALUMÍNIO no material retro-obturador. Fator ARMAZENAMENTO

ARMAZENAMENTO	Quantificação (%)		Intervalo de Confiança de 95%	
	Média	Desvio Padrão	Limite Inferior	Limite Superior
H2O 4°C	4,036	,478	3,081	4,991
geladeira banco osso	3,403	,489	2,426	4,379
formol	3,887	,489	2,911	4,864

*Valor de P= 0,630, não significativo para o nível de 5%

Fonte: Dados da presente pesquisa (PPG/PUCRS, 2013).

5.2.1.3 Silício

Quadro 7. Variável dependente: Quantificação por EDS do elemento químico SILÍCIO no material retro-obturador. Fator ESTERILIZAÇÃO

ESTERILIZAÇÃO	Quantificação (%)		Intervalo de Confiança de 95%	
	Média	Desvio Padrão	Limite Inferior	Limite Superior
SIM	20,480	1,464	17,556	23,404
NÃO	16,301	1,464	13,376	19,225

*Valor de P = 0,048, significativo para o nível de 5%

Fonte: Dados da presente pesquisa (PPG/PUCRS, 2013).

Quadro 8. Variável dependente: Quantificação por EDS do elemento químico SILÍCIO no material retro-obturador. Fator ARMAZENAMENTO

ARMAZENAMENTO	Quantificação (%)		Intervalo de Confiança de 95%	
	Média	Desvio Padrão	Limite Inferior	Limite Superior
H2O 4°C	21,325	1,766	17,796	24,853
geladeira banco osso	14,888	1,806	11,281	18,496
formol	18,958	1,806	15,350	22,565

* Valor de P (H2O 4°C x geladeira banco osso)= 0,040, significativo para o nível de 5%

* Valor de P (H2O 4° C x formol)= 1,0, não significativo para o nível de 5%

* Valor de P (geladeira banco osso x formol)= 1,0, não significativo para o nível de 5%

Fonte: Dados da presente pesquisa (PPG/PUCRS, 2013).

5.2.1.4 Cálcio

Quadro 9. Variável dependente: Quantificação por EDS do elemento químico CÁLCIO no material retro-obturador. Fator ESTERILIZAÇÃO

ESTERILIZAÇÃO	Quantificação (%)		Intervalo de Confiança de 95%	
	Média	Desvio Padrão	Limite Inferior	Limite Superior
SIM	47,016	1,824	43,372	50,661
NÃO	50,818	1,824	47,173	54,463

* Valor de P= 0,146, não significativo para o nível de 5%
Fonte: Dados da presente pesquisa (PPG/PUCRS, 2013).

Quadro 10. Variável dependente: Quantificação por EDS do elemento químico CÁLCIO no material retro-obturador. Fator ARMAZENAMENTO

ARMAZENAMENTO	Quantificação (%)		Intervalo de Confiança de 95%	
	Média	Desvio Padrão	Limite Inferior	Limite Superior
H2O 4°C	45,720	2,201	41,322	50,118
geladeira banco osso	53,099	2,251	48,602	57,595
formol	47,933	2,251	43,436	52,429

* Valor de P= 0,064, não significativo para o nível de 5%
Fonte: Dados da presente pesquisa (PPG/PUCRS, 2013).

5.2.2 NA DENTINA DA REGIÃO APICECTOMIZADA

5.2.2.1 Oxigênio

Quadro 11. Variável dependente: Quantificação por EDS do elemento químico OXIGÊNIO na dentina. Fator ESTERILIZAÇÃO

ESTERILIZAÇÃO	Quantificação (%)		Intervalo de Confiança de 95%	
	Média	Desvio Padrão	Limite Inferior	Limite Superior
SIM	20,778	,953	18,874	22,681
NÃO	21,357	,953	19,454	23,261

* Valor de P= 0,669, não significativo para o nível de 5%
Fonte: Dados da presente pesquisa (PPG/PUCRS, 2013).

Quadro 12. Variável dependente: Quantificação por EDS do elemento químico OXIGÊNIO na dentina. Fator ARMAZENAMENTO

ARMAZENAMENTO	Quantificação (%)		Intervalo de Confiança de 95%	
	Média	Desvio Padrão	Limite Inferior	Limite Superior
H2O 4°C	20,944	1,150	18,647	23,241
geladeira banco osso	22,349	1,176	20,000	24,698
formol	19,909	1,176	17,561	22,258

* Valor de P= 0,344, não significativo para o nível de 5%
 Fonte: Dados da presente pesquisa (PPG/PUCRS, 2013).

5.2.2.2 Fósforo

Quadro 13. Variável dependente: Quantificação por EDS do elemento químico FÓSFORO na dentina. Fator ESTERILIZAÇÃO

ESTERILIZAÇÃO	Quantificação (%)		Intervalo de Confiança de 95%	
	Média	Desvio Padrão	Limite Inferior	Limite Superior
SIM	31,204	,593	30,019	32,389
NÃO	30,455	,593	29,270	31,640

* Valor de P= 0,375, não significativo para o nível de 5%
 Fonte: Dados da presente pesquisa (PPG/PUCRS, 2013).

Quadro 14. Variável dependente: Quantificação por EDS do elemento químico FÓSFORO na dentina. Fator ARMAZENAMENTO

ARMAZENAMENTO	Quantificação (%)		Intervalo de Confiança de 95%	
	Média	Desvio Padrão	Limite Inferior	Limite Superior
H2O 4°C	30,628	,716	29,197	32,058
geladeira banco osso	30,286	,732	28,824	31,749
formol	31,575	,732	30,113	33,037

* Valor de P= 0,439, não significativo para o nível de 5%
 Fonte: Dados da presente pesquisa (PPG/PUCRS, 2013).

5.2.2.3 Cálcio

Quadro 15. Variável dependente: Quantificação por EDS do elemento químico CÁLCIO na dentina. Fator ESTERILIZAÇÃO

ESTERILIZAÇÃO	Quantificação (%)		Intervalo de Confiança de 95%	
	Média	Desvio Padrão	Limite Inferior	Limite Superior
SIM	48,016	,599	46,818	49,213
NÃO	48,187	,599	46,990	49,384

* Valor de P= 0,841, não significativo para o nível de 5%

Fonte: Dados da presente pesquisa (PPG/PUCRS, 2013).

Quadro 16. Variável dependente: Quantificação por EDS do elemento químico CÁLCIO na dentina. Fator ARMAZENAMENTO

ARMAZENAMENTO	Quantificação (%)		95% Confidence Interval	
	Média	Desvio Padrão	Limite Inferior	Limite Superior
H2O 4°C	48,425	,723	46,981	49,870
geladeira banco osso	47,364	,739	45,887	48,842
formol	48,515	,739	47,037	49,992

* Valor de P= 0,475, não significativo para o nível de 5%

Fonte: Dados da presente pesquisa (PPG/PUCRS, 2013).

6. DISCUSSÃO:

A metodologia deste trabalho foi baseada em uma linha de pesquisa com uma série de trabalhos publicados referentes ao tratamento da patologia periapical não tratável pela via endodôntica convencional ^{50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60}.

A introdução das modernas técnicas cirúrgicas e micro-cirúrgicas na abordagem da patologia apical tem demonstrado a grande evolução nesta área, traduzidas em altas taxas de sucesso clínico^{20,24}. Essas técnicas incluem: pequena ostectomia para acesso a região periapical; apicectomia com brocas 3mm aquém do ápice dentário e com angulação de 90°; retro-preparo com retro-pontas ultra-sônicas diamantadas e retro-obturação com MTA ^{17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30}.

A anatomia da região apical, com seus sistemas de canais formando um delta complexo, exige um corte durante a apicectomia em 90° com o longo eixo do dente. A ressecção dos três milímetros apicais remove aproximadamente 98% das ramificações apicais e 94% dos canais laterais ²⁴. Dessa forma, consegue-se diminuir a micro-infiltração entre as paredes dentinárias e o material retro-obturador bem como a menor exposição de túbulos dentinários seccionados após a apicectomia ^{19,25}. A aplicação desta metodologia neste trabalho apresentou uma uniformidade no diâmetro dos túbulos dentinários da região.

A utilização das retro-pontas ultra-sônicas trazem vantagens técnicas importantes como a facilidade de acesso, ostectomia reduzida, permite apicectomia em 90° e produz uma retro-cavidade regular, no sentido do longo eixo do dente, o que favorece uma retro-obturação mais homogênea ^{21,28,29,59,60}. Neste estudo, observou-se que as cavidades apresentavam um preparo com profundidade e diâmetro regulares, facilitando a etapa seguinte de inserção do MTA. Além disso, baseado nas baixas medidas de *gap* encontradas, observou-se que a associação entre retro-preparo com ultra-som e utilização do MTA foram efetivos em diminuir a desadaptação do material retro-obtuador.

O MTA tem demonstrado na literatura características adequadas para ser utilizado como material retro-obturador. Dentre suas características favoráveis estão a facilidade de manuseio e inserção, biocompatibilidade, ação estimuladora à reparação dos tecidos perirradiculares e vedamento apical ^{7,8,34,35,49,59}.

Com o objetivo de favorecer a avaliação das variáveis (*gap* e quantificação dos elementos químicos selecionados para EDS) as amostras foram lixadas e

aplicou-se ácido poliacrílico 11,5%. A utilização das lixas objetivou a remoção do MTA espalhado sobre a dentina apicectomizada, que poderia prejudicar a medição do *gap* e a avaliação por EDS da superfície dentinária. A utilização do ácido poliacrílico a 11,5% por 20 segundos objetivou a remoção da *smear layer* gerada pelo atrito com as lixas. Julgou-se relevante esta medida para que fosse favorecida a avaliação fiel do *gap*, já que o mesmo poderia ser obliterado pela *smear layer* gerada. Além disso, obteve-se uma remoção da contaminação da superfície dentinária, o que também favoreceu a avaliação por EDS. A utilização do ácido poliacrílico na concentração e tempo utilizados, não gerou desmineralização da dentina nas amostras, apenas descontaminação da superfície de análise.

Os baixos valores de *gap* encontrados neste trabalho estão de acordo achados de outros estudos e mostram que a retro-obturação com MTA é efetiva em diminuir a desadaptação do material retro-obturador e consequente infiltração marginal^{49 59}.

Kumar et al. 2005⁶¹, testou diferentes formas de desinfecção/ esterilização de dentes humanos: armazenamento em formol 10%, em peróxido de hidrogênio a 3%, em hipoclorito de sódio a 2,6%, mantidos em água a 100°C por 20 minutos e autoclavados em 121°C- 15lbs psi por 30 minutos. Apenas duas formas foram efetivas na esterilização: autoclavagem e imersão em formol⁶¹.

O estudo de Dominici et al. 2001⁶², mostrou que apenas a autoclavagem por 40 minutos 121°C- 20 psi e o armazenamento em formol a 10% foram efetivos em eliminar o *Bacillus stearothermophilus*, uma bactéria resistente ao calor e freqüentemente utilizada para testes de esterilização⁶².

Pantera e Schuster 1990⁴⁰, também relataram a efetividade do processo de autoclavagem durante 40 minutos a 121°C-15psi dos dentes na eliminação completa dos microorganismos nas porções internas e externas dos dentes⁽⁴⁰⁾. Com base nessas referências optou-se como método de esterilização das amostras a autoclavagem por 40 minutos 121°C-15psi.

Diversos estudos apontam a importância da esterilização de dentes antes do seu uso laboratorial, para evitar infecções cruzadas^{37,38,39}. No entanto, muitos estudos *in vitro* não citam em sua metodologia o forma de esterilização utilizada^{28,45,49}. Esses dados sugerem que, apesar de recomendada, a esterilização dos dentes/ amostras antes do seu uso em pesquisas freqüentemente não é realizada.

Os efeitos dos diferentes processos de esterilização sobre a estrutura dentária ainda não estão completamente elucidados. Shaffer et al. 1985⁶³, estudou os efeitos da esterilização/ desinfecção de dentes com glutaraldeído a 2%, hipoclorito de sódio a 1% e autoclavagem a 126°C por 20 minutos na força de adesão de resina composta sobre a superfície de esmalte. Os resultados encontrados mostram que não houve diferença estatística significativa entre os grupos testes e o grupo controle (sem nenhum processo de esterilização/desinfecção).

Lee et al. 2007³⁶, mostrou que a esterilização em autoclave dos dentes previamente armazenados em água destilada e formol afeta negativamente a força de adesão dos materiais dentários à dentina, enquanto dentes armazenados em formol apenas (sem autoclavagem) não apresentaram alterações significativas na força de adesão.

Pimentel 1999⁶³ mostrou que nenhum método de esterilização/ desinfecção estudados (autoclave, óxido de etileno, glutaraldeído a 2% e formol a 10%) alteraram de forma significativa as força de adesão dentinária, em dentes decíduos.

No presente trabalho, após a análise por EDS, não se observou alteração significativa na estrutura química dos dentes (na sua porção dentinária) submetidos a esterilização em comparação aos dentes não esterilizados. No entanto, com relação ao material retro-obturador (MTA), houve um aumento significativo na concentração de silício, sugerindo que o processo de autoclavagem realizado pode interferir na maneira como a estrutura dentinária interage com o biomaterial utilizado (MTA), uma vez que a inserção do material deu-se apenas após a esterilização.

Os meios de armazenamento de dentes extraídos podem provocar alterações químicas na estrutura dentinária, afetar a resistência adesiva, influenciar a permeabilidade da dentina e influenciar a própria microinfiltração^{4,41, 43, 46}. A solução de estoque e os métodos de esterilização podem influenciar como substratos dentários respondem aos materiais dentários aplicados³⁶.

O estudo de De Conto 2011⁵⁹ avaliou as medidas de desadaptação marginal (*gap*) de dois materiais retro-obturadores –MTA e Cimento de Ionômero de Vidro (CIV)- em dentes armazenados de em dois diferentes meios: água comum a 4°C e sem hidratação. Os resultados mostraram que dentes armazenados de forma não hidratada apresentavam valores de *gap* inferiores aos dentes armazenados hidratados em água comum, quando foi utilizado CIV. Quando utilizado MTA, não

houve diferença estatística significativa entre os meios de armazenamento ⁽⁵⁹⁾. Neste estudo, não houve diferença nas medidas de *gap* entre a dentina e o MTA nos diferentes meios de armazenamento utilizados.

George et al. 2006⁴³ avaliou o efeito do armazenamento em formol a 10% na microinfiltração apical de dentes obturados endodonticamente. O estudo conclui que o armazenamento em formol nos períodos de duas e 4 semanas causou uma diminuição significativa na infiltração apical em comparação com o grupo controle, não fixado em formol. Segundo estes autores, o mecanismo que produziu este efeito é incerto, mas pode ser relacionado a uma alteração nos tecidos dentários pelas propriedades de fixação do formol. Ainda, os autores relatam que mais estudos são necessários para investigar as interações potenciais entre a solução desinfetante e a estrutura dentária, a *smear layer* e o material obturador.

No estudo de revisão de DeWalt 1997⁶⁵ foi sugerido que, devido a variabilidade nos resultados encontrados nos testes de adesão em dentes armazenados em formol a 10%, este meio não é recomendado para armazenamento de dentes nos estudos de adesão, pela provável alteração do colágeno(fixação da proteína) pelo formol.

Nesta pesquisa, as amostras dos grupos armazenados em formol a 10% apresentavam suas retro-obturações com coloração escurecida. A análise por EDS, no material retro-obturador, não identificou alterações químicas significativas (apesar da alteração visual evidente) dos elementos químicos estudados (Oxigênio, Alumínio, Silício e Cálcio) na comparação desses grupos armazenados no formol com os demais grupos (água destilada a 4°C e água destilada em geladeira de banco de dentes a -85°C). A explicação para tal ocorrência pode estar na dificuldade de se mensurar de forma fiel com EDS no MEV as concentrações de elementos químicos com baixo peso atômico, como o oxigênio, o carbono e o hidrogênio, constituintes da fórmula química do formol. Esse achado sugere que novas pesquisas sejam realizadas com outras metodologias que permitam avaliar as concentrações dos elementos químicos constituintes do formol.

A pesquisa de Camps et al 1997⁶⁶, realizou testes de agentes de união na dentina de dentes recém extraídos, criopreservados (com congelamento gradativo até -180°C) e armazenados em água com cloramina a 0,5% em geladeria a 4°C. Os resultados mostraram que o congelamento (criopreservação) dos dentes não alterou a microinfiltração. No entanto, o autor sugeriu que mais estudos devem ser

realizados para avaliar os efeitos da criopreservação e do tempo de armazenamento dos dentes congelados na estrutura colágena e força de adesão da dentina, na energia livre de superfície e na biocompatibilidade da dentina criopreservada. Em outro estudo do mesmo autor, a criopreservação não alterou a permeabilidade dentinária⁴⁴.

Titley et al. 1998⁶⁷, analisou a força de cisalhamento de resina composta em dentes bovinos armazenados em diferentes meios. Os autores concordam que a melhor amostra é o dente extraído recentemente. Porém, na impossibilidade de se obter o número suficiente de dentes recém extraídos para o experimento, está indicado o congelamento dos dentes para minimizar possíveis alterações *post mortem*. Portanto, o tempo decorrido entre a extração dentária e a utilização do mesmo no experimento, ou seja, o tempo de armazenamento da amostra, também pode caracterizar um viés de pesquisa.

No presente trabalho, a análise por EDS da porção dentinária mostrou não haver diferença significativa, entre os diferentes meios de armazenamento, dos elementos químicos (oxigênio, fósforo e cálcio) selecionados para estudo naquela região. A partir desses achados e da literatura referida, sugere-se a conservação de dentes em geladeira de banco de ossos a -85°C, pois não interfere nas características estudadas e evita, devida a baixa temperatura, a deterioração da porção orgânica do dente.

O estudo por EDS do material retro-obturador (MTA) mostrou que, quando comparados os meios de armazenamento água destilada a 4°C e água destilada em geladeira de banco de ossos a -85°C houve diferença estatística significativa na concentração do elemento químico silício. Este dado sugere que o fator temperatura pode interferir na forma como o substrato dentinário interage com o material retro-obturador. Quando estes dois meios de armazenamento foram comparados com o formol a 10%, não houve diferença estatística significativa. Esse achado está de acordo com a sugestão de Camps et al. 1997⁶⁶ sobre a necessidade de análises futuras sobre os efeitos da criopreservação na estrutura dentinária (energia livre de superfície e estrutura colágena).

As alterações nos percentuais de silício (nos fatores autoclavagem e armazenamento) comparadas à literatura vigente indicam que são necessárias mais pesquisas com metodologias sistematicamente semelhantes para elucidar as

alterações causadas pela autoclavagem e diferentes temperaturas de armazenamento (-4°C versus -85°C).

7. CONCLUSÕES:

De acordo com a metodologia empregada neste estudo, podemos concluir que:

- O processo de autoclavagem de dentes humanos não provoca alteração na adaptação marginal do material retro-obturador (MTA), nem altera a composição química da estrutura dentinária;
- O armazenamento de dentes em água destilada a -85°C não provoca alteração na adaptação marginal do material retro-obturador, nem altera a estrutura química dentinária, podendo ser uma alternativa viável para a conservação de dentes humanos em Biobancos, diminuindo, desta forma, a deterioração da porção dentária orgânica.

Novos estudos são necessários para elucidar a alteração visual ocorrida no MTA nos grupos armazenados em formol a 10%, bem como as alterações significativas nos percentuais do elemento silício encontradas no material retro-obturador, tanto na comparação entre dentes autoclavados e não autoclavados, quanto entre a temperatura de armazenamento em água destilada (4°C e -85°C).

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 – Marzola C. Cirurgia pré-protética 3^a ed, São Paulo: Ed. Pancast, 2002.
- 2 – Carr GB, Bentkover SK. Cirurgia em endodontia. In: COHENS S, CHIVIAN N. Endodontia Cirúrgica: Um Enfoque Conservador. In: Walton RE, Torabinejad M. Princípios e Práticas em Endodontia. 2 ed. São Paulo, Santos, 2000.
- 3 – Araújo RM, Araújo MAM, Silva R SSP, Gonçalves SEP, Huhtala MFRL, Rodrigues JR. Influência de diferentes meios de armazenamento de dentes extraídos na infiltração marginal. JBC. 1999;3:31-5.
- 4 – Iório LS, Gomes APM, Kubo CH, Carneiro RGF, Carneiro BF, Silva EG. Avaliação da influência de diferentes meios de armazenamento de dentes humanos extraídos na infiltração marginal apical. Revista de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo 2007;19:173-80.
- 5 – International Organization for Standardization. Dental materials. Testing of adhesion to tooth structure. Geneva: ISO/TS 11405:2003.
- 6 – Izquierdo CM, Moraes JFD, Hellwig I, Gerhardt De Oliveira M, Weber JBB. Scanning electron microscopy analysis of two methods of root-end preparation. Minerva Stomatol. 2010;59:333-39.
- 7- Torabinejad M, Hong CU, Pitt Ford TR, Kaiyawasam SP. Tissue reaction to implanted super-EBA and mineral trioxide aggregate in the mandible of guinea pigs: a preliminary report. J Endod. 1995;21:569-71.
- 8- Torabinejad M, Pitt Ford TR, McKendry DJ, Abedi HR, Miller DA, Kariyawasam SP. Histologic assessment of mineral trioxide aggregate as a root-end filling in monkeys. J Endod. 1997;23:225-8.
- 9- Baek SH, Plenk H Jr, Kim S. Periapical tissue responses and cementum regeneration with amalgam, SuperEBA, and MTA as root-end filling materials. J Endod. 2005;31:444-49.
- 10- Shin S. In vitro studies addressing cellular mechanisms underlying the bone and dentin inductive property of mineral trioxide aggregate. Master thesis in oral biology. (Thesis) University of Pennsylvania, 2004.
- 11- Chong BS, Pitt Ford TR, Hudson MB. A prospective clinical study of mineral trioxide aggregate and IRM when used as root-end filling materials in endodontic surgery. Int Endod J. 2003;36:520-26.

- 12- Lindeboom JA, Frenken JW, Kroon FH, van den Akker HP. A comparative prospective randomized clinical study of MTA and IRM as root-end filling materials in single-rooted teeth in endodontic surgery. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005;100:495-500.
- 13- von Arx T, Vinzens-Majaniemi T, Burgin W, Jensen SS. Changes of periodontal parameters following apical surgery: a prospective clinical study of three incision techniques. *Int Endod J.* 2007;40:959-69
- 14- Kim E, Song JS, Jung IY, Lee SJ, Kim S. Prospective clinical study evaluating endodontic microsurgery outcomes for cases with lesions of endodontic origin compared with cases with lesions of combined periodontal–endodontic origin. *J Endodont.* 2008;34:546-51.
- 15- von Arx T, Failed root canals: the case for apicoectomy (periradicular surgery). *J Oral Maxillofac Surg.* 2005;63:832-37.
- 16- Peterson LJ et al.. *Cirurgia Oral e Maxilofacial contemporânea.* 4ª ed. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan S.A., p. 406-429, 2005.
- 17- Von Arx T. Apical surgery: A review of current techniques and outcome. *The Saudi Dental Journal.* 2011;23:9-15.
- 18- Schilder H. Filling root canals in three dimensions. *Dent Clin North Am.* 1967;7:23-44.
- 19- Gilheany PA, Figdor D, Tyas MJ. Apical dentin permeability and microleakage associated with root end resection and retrograde filling. *J Endod.* 1994;20:22-6.
- 20- Sumi Y, Hattori H, Hayashi K, Ueda M. Ultrasonic Root-end Preparation: clinical and radiographic evaluation of results. *J Oral Maxillofac Surg.* 1996;54:590-93.
- 21- Kim S, Kratchman S. Modern endodontic surgery concepts and practice: a review. *J Endodont.* 2006;32:601-23.
- 22- Berbert et al. An in vitro evaluation of apicoectomies and retropreparations using different methods *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010;110:57-63.
- 23- Bernardes RA, Souza Junior JV, Duarte MAH, Moraes IG, Bramante CM. Ultrasonic chemical vapor deposition-coated tip *versus* high-and low-speed carbide burs for apicoectomy: time required for resection and scanning electron microscopy analysis of the root-end surfaces. *J Endod.* 2009;35:265-68.

- 24- Kim S, Pecora G, Rubinstein R. Comparison of traditional and microsurgery in endodontics. In: Kim S, Pecora G, Rubinstein R, eds. Color atlas of microsurgery in endodontics. Philadelphia: W.B. Saunders. 2001:5–11.
- 25- Lopes HP, Siqueira Jr JF. Endodontia: biologia e técnica. Rio de Janeiro: Medsi. 1999.
- 26- Von Arx T, Walker WA. Microsurgical instruments for root-end cavity preparation following apicoectomy: a literature review. *Endod Dent Traumatol*. 2000;16:47-62.
- 27- Tsesis I, Rosen E, Schwartz-Arad D, Fuss Z. Retrospective evaluation of surgical endodontic treatment: traditional versus modern techniques. *J Endodont*. 2006;32:412-16.
- 28- Sutimuntanakul S, Worayoskowitz W, Mangkornkarn C. Retrograde seal in ultrasonically prepared canals. *J Endod*. 2000;26:444-46.
- 29- Gomes APM, Kubo CH, Caetano MAL. Avaliação do selamento de retrobturações realizadas com super-EBA e MTA após preparo cavitario com ultrassom ou brocas. *Cienc Odontol Bras*. 2003;6:20-8.
- 30- Holland R, Souza V, Nery MJ, Otoboni Filho JA, Bernabé PFE, Dezan Jr E. Reaction of dog's teeth to root canal filling with mineral trioxide aggregate or a glass ionomer sealer. *J Endod*. 1999;25:728-30.
- 31- Roberts HW, Toth JM, Berzins DW, Charlton DG. Mineral trioxide aggregate material use in endodontic treatment: a review of the literature. *Dent Mater* 2008;24:149–64.
- 32- Lee SJ, Monsef M, Torabinejad M. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate for repair of lateral root perforations. *J Endod*. 1993;19:541–44.
- 33- Schmitt D, Bogen G. Multifaceted use of ProRoot MTA root canal repair material. *Pediatr Dent*. 2001;23:326–30.
- 34- Torabinejad M, Pitt Ford TR: Root-end filling material: A review. *Endod Dent Traumatol*. 1996;12:161-74.
- 35- Torabinejad M, Hong CU, Lee SJ, Monsef M, Pitt Ford TR. Investigation of mineral trioxide aggregate for root-end filling in dogs. *J Endod*. 1995;21:603-8.
- 36- Lee JJ, Nettey-Marbell A, Cook A Jr, Pimenta LA, Leonard R, Ritter AV. Using extracted teeth for research: the effect of storage medium and sterilization on dentin bond strengths. *J Am Dent Assoc*. 2007;138:1599-603.

- 37- Thomas RZ, Rubem JL, ten Bosch JJ, Huysmans MDNJM, Effect of ethylene oxide sterilization on enamel and dentin demineralization in vitro. J Dent. 2007;35:547-51.
- 38- Centers for Disease Control and Prevention, Guidelines for infection control in dental health care setting: 2003. Morb Mortal Wkly Rep. 2003;52:1–76.
- 39- Brauer DS, Saeki K, Hilton JF, Marshall GW, Marshall SJ. Effect of sterilization by gamma radiation on nano-mechanical properties of teeth. Dent Mater. 2008;24:1137-40.
- 40- Pantera EA, Schuster GS. Sterilization of extracted human teeth. J Dent Educ. 1990;54:283–5.
- 41- Pichardo MR, George SW, Bergeron BE, Jeansonne BG, Rutledge R. Apical Leakage of Root-End Placed SuperEBA, MTA, and Geristore Restorations in Human Teeth Previously Stored in 10% Formalin. J Endod. 2006 32:956-59.
- 42- Parsell DE, Stewart BM, Barker JR, Nick TG, Karns L, Johnson RB. The effect of steam sterilization on the physical properties and perceived cutting characteristics of extracted teeth. J Dent Educ. 1998;62:260–3.
- 43- George SW, Pichardo MR, Bergeon BE, Jeansonne BG. The effect of formalin storage on apical leakage of obturated canals. J Endod. 2006;32:869-71.
- 44- Camps G, Martin P, Ladeque P, Rieu R, Fuseri J. Influence of tooth cryopreservation on human dentin permeability, *in vitro*. Dent Mater 1994;10:210-14.
- 45- Mobarak EH, El-Badrawy W, Pashley DH, Jamjoom H. Effect of pretest storage conditions of extracted teeth on their dentin bond strengths J Prosthet Dent. 2010;104:92-7.
- 46- Ghersel ELA, Guedes-Pinto AC, Ciamponi AL. Influência do modo de armazenamento na microinfiltração de dentes decíduos restaurados com diferentes sistemas adesivos: estudo *in vitro*. Pesqui Odontol Bras. 2001;15:29-34.
- 47- Woods EJ, Perry BC, Hockema JJ, Larson L, Zhou D, Goebel WS. Optimized cryopreservation method for human dental pulp-derived stem cells and their tissues of origin for banking and clinical use. Cryobiology. 2009;59:150-57.
- 48- Oh YH, Che ZM, Hong JC, Lee EJ, Lee SJ, Kim J. Cryopreservation of human teeth for future organization of a tooth bank- A preliminary study. Cryobiology. 2005;51:322-29.
- 49- Xavier CB, Weismann R, Oliveira MG, Demarco FF, Pozza DH. Root-end filling materials: apical microleakage and marginal adaption. J Endod. 2005;31:539-42.

- 50- Cunha Filho JJ. Estudo comparativo in vitro da morfologia de raízes dentárias submetidas a apicectomias com fresas cirúrgicas e diferentes tipos de lasers. Porto Alegre-RS [tese]. Porto Alegre (RS): Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; 2003
- 51- Gerhardt de Oliveira M, Pinheiro ALB, Pozza DH, Xavier CB, Costa AT. Análise atômica comparativa por EDS dos cimentos MTA e Portland. Braz Oral Research. 2004; 41 (1): 157.
- 52- Pozza DH, Mello EDA, Blaya DS, Pinheiro ALB, Oliveira MG. Análise comparativa entre os tempos gastos na apicetomia por ponta diamantada e pelos lasers Co2 e Er:yag. Clin Pesq Odontol. 2005;2 (2) 97-102.
- 53- Pozza DH. Avaliação, por infiltração de corante, de tecnologias Laser em cirurgias paraendodônticas. Salvador-BA [tese]: Universidade Federal da Bahia; 2005.
- 54- Hellwig I. Análise comparativa da microinfiltração marginal em ápices retro-obturados com MTA e cimento de ionômero de vidro. Porto Alegre-RS [Tese] Porto Alegre (RS): Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; 2005.
- 55- Gerhardt de Oliveira M, Pozza DH, Xavier CB et al. Análise comparativa entre duas técnicas de retrobturação. Braz Oral Research. 2005; 19(2): 204.
- 56- Cunha Filho JJ, Puricelli E, Gerhardt de Oliveira M. In vitro comparative study of dental root morphology submitted to drillers and different types of lasers apicoectomies. Int J Oal Maxillofac Surg. 2005; 34(1): 142.
- 57- Oliveira MG, Rockembach MC, Fregapani PW, Xavier CB, Pozza DH. Ultrasonic tips in periradicular surgery. J med biol sci. 2008; 7 (1): 96-102.
- 58- Oliveira MG, Binz MCR, Fregapani PW, Cunha Filho JJ, Puricelli E. Scanning electron microscopy analysis os surfaces after apicoectomy resection with burs and lasers. Chirugia. 2010; 23: 25-30.
- 59- De Conto F. Análise por microscopia eletrônica de varredura de rotinas técnicas periapicais em dentes humanos. Estudo comparativo entre dois modos de armazenamento. Porto Alegre – RS [tese]. Porto Alegre (RS): Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; 2011.
- 60- Zerbinatti LP, Tonietto L, de Moraes JF, de Oliveira MG. Assessment of marginal adaptation after apicoectomy and apical sealing with Nd:YAG laser. Photomed Laser Surg. 2012;30(8) 444-50.

- 61- Kumar M, Sequeira PS, Peter S, Bhat GK. Sterilization of extracted human teeth for educational use. *Indian J Med Microbiol* 2005;23(4): 256-8
- 62- 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.
- 63- Shaffer SE, Barkmeier WW, Gwinnett AJ. Effect of disinfection/sterilization on *in vitro* enamel bonding. *J Dent Educ* 1985;49:658-9.
- 64- Pimentel ELC. Efeito de diferentes métodos de esterilização de dentes humanos na força de adesão dentinária de molares decíduos. Rio de Janeiro- RJ. [Dissertação]. Rio de Janeiro (RJ): Universidade Federal do Rio de Janeiro; 1999.
- 65- DeWalt JP. The use of extracted teeth for in vitro bonding studies: a review of infection control considerations. *Dent Materials* 1997;13(2): 74-81.
- 66- Camps J, Baudry X, Bordes V, Dejoux J, Pignoly C, Ladeque P. Influence of tooth cryopreservation and storage time on microleakage. *Dent. Mater* 1996; 12: 121-26.
- 67- Titley KC, Chernecky R, Rossouw PE, Kulkarni GV. The effect of various storage methods and media on shear bond strengths of dental composite resin to bovine dentine. *Arch Oral Biol* 1998; 43: 305-11.

9. ANEXOS

9.1 Anexo A

66



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

OF. CEP-1488/11

Porto Alegre, 05 de outubro de 2011.

Senhora Pesquisadora,

O Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa registro CEP 11/05521 intitulado **"Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV) de rotinas técnicas periapicais em dentes humanos: estudo comparativo entre dois modos de armazenamento"**

Salientamos que seu estudo pode ser iniciado a partir desta data.

Os relatórios parciais e final deverão ser encaminhados a este CEP.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Rodolfo Herberto Schneider
Coordenador do CEP-PUCRS

Ilma. Sra.
Profa. Marília Gerhardt de Oliveira
FO
Nesta Universidade

PUCRS

Campus Central
Av. Ipiranga, 6690 - 3º andar - CEP: 90610-000
Sala 314 - Fone Fax: (51) 3320-3345
E-mail: cep@pucrs.br
www.pucrs.br/prppg/cep

9.2 Anexo B



**COMISSÃO CIENTÍFICA E DE ÉTICA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA PUCRS (CCEFO)**

Porto Alegre, 08 de janeiro de 2012.

AUTORIZAÇÃO DO USO DE DEPENDÊNCIAS DE LABORATÓRIO

À Comissão de Ciência e Ética da Faculdade de Odontologia-PUCRS

Autorizo, pelo presente, que as dependências do Laboratório de Radiologia Odontológica da Faculdade de Odontologia da Universidade de Passo Fundo, por mim coordenadas sejam utilizadas pelos pesquisadores prof^a Dr^a Marília Gerhardt de Oliveira e Leonardo Tonietto com a finalidade de conduzir experimentos necessários à tese intitulada “**Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectrometria por Dispersão de Energia (EDS) de dentes humanos apicectomizados e retro-obturados submetidos a diferentes meios de armazenamento**”.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Mateus Ericson Flores

Coordenador do Laboratório