

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI

MONIZE FERREIRA FIGUEIREDO DE CARVALHO

AVALIAÇÃO DO FLUORETO DE SÓDIO A 2% COMO UM NOVO MÉTODO PARA
DESINFECÇÃO DE DENTES HUMANOS EXTRAÍDOS.

DIAMANTINA-MG

2014

MONIZE FERREIRA FIGUEIREDO DE CARVALHO

**AVALIAÇÃO DO FLUORETO DE SÓDIO A 2% COMO UM NOVO MÉTODO PARA
DESINFECÇÃO DE DENTES HUMANOS EXTRAÍDOS.**

Dissertação apresentada à Universidade
Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri,
como parte dos requisitos do Programa de Pós-
Graduação em Odontologia, área de
concentração em Clínica Odontológica, para
obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Adriana Maria Botelho

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Karine Taís Aguiar Tavano

DIAMANTINA

2014

Ficha Catalográfica – Serviço de Bibliotecas/UFVJM

Bibliotecário Anderson César de Oliveira Silva, CRB6 – 2618.

Carvalho, Monize Ferreira Figueiredo de

C331a Avaliação do fluoreto de sódio a 2% como um novo método para desinfecção de dentes humanos extraídos / Monize Ferreira Figueiredo de Carvalho. – Diamantina: UFVJM, 2014.

41 p. : il.

Orientador: Adriana Maria Botelho

Coorientador: Karine Taís Aguiar Tavano

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Odontologia) – Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

1. Fluoreto. 2. Autoclave. 3. Desinfecção. 4. Dentes humanos extraídos. 5. Agente Antibacteriano. I. Título II. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

CDD 617.6

Elaborado com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

MONIZE FERREIRA FIGUEIREDO DE CARVALHO

**AVALIAÇÃO DO FLUORETO DE SÓDIO A 2% COMO UM NOVO MÉTODO PARA
DESINFECÇÃO DE DENTES HUMANOS EXTRAÍDOS.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como parte dos requisitos do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, área de concentração em Clínica Odontológica, para obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 05/08/2014

Profa. Dra. Adriana Maria Botelho – UFVJM

Orientadora

Prof. Dr. Evandro Watanabe – USP

Prof . Dr. Janir Alves Soares – UFVJM

Diamantina – MG

2014

AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar presente em todos os momentos da minha vida, nos desafios, nas oportunidades e nas conquistas.

Aos meus pais, por terem me ensinado a lutar e apoiarem os meus sonhos. Por todo suporte e amor. Obrigada pelo exemplo de honestidade e coragem.

À minha irmã, Jamille, por estar presente em mais uma conquista. Apesar da distância, sempre estamos juntas em nossos corações.

Aos meus familiares, que torceram e apoiaram mais essa jornada.

Ao meu namorado, Victor Luiz, obrigada pelo seu amor e por toda paciência e compreensão. Muito obrigada por me incentivar sempre.

Aos meus amigos, de perto ou de longe, que se fizeram presentes em mais esta jornada.

Aos colegas do mestrado, que hoje se tornaram grandes amigos. Obrigada pelos jantares e por dividirem todos os melhores e piores momentos.

À Lissandra Santos, companheira de pesquisa. Obrigada por toda ajuda ao meu trabalho.

À Profa. Adriana Maria Botelho, minha orientadora, por todos os ensinamentos.

À Profa. Karine Taís Aguiar Tavano, minha coorientadora, pelo incentivo.

À Profa. Maria Letícia Ramos Jorge, pelos conselhos, ensinamento e ser um exemplo de competência.

Ao Prof. Leandro Marques, pela dedicação e por estar sempre disposto a lutar por um curso de melhor qualidade.

À Profa. Cíntia Tereza Pimenta de Araújo, por toda ajuda, confiança e amizade.

Ao Prof. Mauro Cruz, pela competência, pela ajuda e confiança. Obrigada por toda ensinamento.

Ao Prof. Janir Soares, por participar da banca e enriquecer este trabalho.

Ao Prof. Evandro Watanabe, por me receber, por me ensinar e ajudar em meu crescimento. Sem você essa pesquisa não teria tornado realidade.

A todos os professores da graduação que de alguma forma me ensinaram a ensinar.

Aos Professores do Programa de Pós-graduação em Odontologia, pelo aprendizado e ensinamento.

À Gislene Santos, secretaria do PPGOdonto, pela atenção, responsabilidade e disponibilidade.

A FAPEMIG pela liberação de bolsas para a realização da pesquisa.

A Empresa Acecil pelo auxílio na esterilização dos elementos dentários para posterior realização dos testes.

RESUMO

CARVALHO, Monize Ferreira Figueiredo. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, agosto de 2014. 41p. Avaliação do fluoreto de sódio a 2% como um novo método para desinfecção de dentes humanos extraídos. Orientadora: Adriana Maria Botelho. Coorientadora: Karine Taís Aguiar Tavano. Dissertação (Mestrado em Odontologia).

Dentes humanos extraídos são usados com frequências em laboratórios e cursos de pré – clínica. Embora não tenha ocorrido nenhum relato da transmissão de doenças com dentes humanos extraídos, a desinfecção/esterilização desses dentes consistem em uma obrigatoriedade. O objetivo deste estudo foi determinar a eficácia da solução de fluoreto de sódio a 2% como um novo método de desinfecção/esterilização de dentes humanos extraídos, usando o microrganismo *E. faecalis* ATCC 29212. Neste estudo, 56 molares hígidos foram contaminados com *E. faecalis*. Os dentes foram divididos aleatoriamente em quatro grupos para desinfecção/esterilização: Grupos n=14 Grupo 1(GI): solução salina; GII: autoclave; GIII: solução de fluoreto de sódio a 2% por 7 dias; GIV: solução de fluoreto de sódio a 2% por 14 dias. Após os procedimentos, cada dente foi então dividido e colocado em frascos individuais contendo o meio de crescimento por até 14 dias. As amostras foram monitoradas quanto a evidência de crescimento (turbidez) e valores de absorbância. Todas os grupos experimentais promoveram redução de *E. faecalis* e diferenças estatisticamente significativa foram observadas entre os grupos (Teste T para amostras independentes) com valor de p< 0,05. Apenas o GII, método autoclave durante 30 minutos a 121° C a 15 psi foi eficaz na prevenção do crescimento bacteriano. Para a solução de fluoreto de sódio a 2% os grupos GII e GIV foram eficientes na redução da carga microbiana. Porém GIV apresentou melhores resultados que GIII, 1,00 ($\pm 0,02$) vs 0,89 ($\pm 0,09$), respectivamente. Esses resultados sugerem que a solução de fluoreto de sódio a 2% pode ser considerado um novo método desinfetante pela capacidade de destruir e reduzir a quantidade do microrganismo *E. faecalis*.

Palavras-chave: Fluoreto, Autoclave, Desinfecção, Dentes humanos extraídos, Agente Antibacteriano.

ABSTRACT

CARVALHO, Monize Ferreira Figueiredo. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, agosto de 2014. 41p. Assessment of sodium fluoride to 2% as a new method of disinfecting extracted human teeth. Advisor: Adriana Maria Botelho. Co – advisor: Karine Taís Aguiar Tavano. Dissertation (Master in Dentistry).

Extracted human teeth are used in many laboratory and preclinical courses. While there has been no report of disease transmission with extracted teeth, desinfection/sterilization should be a concern. The purpose of this study was to determine the effectiveness of sodium fluoride to 2% like a new disinfection/sterilization method of extracted human teeth using *E. faecalis*. In this study, 56 extracted molars without carious lesions were collected and inoculated with *E. faecalis*. Teeth were divided into four groups for disinfection/sterilization: Group I (GI): saline solution; GII: autoclaving; GIII: sodium fluoride to 2% for 1 week; GIV: sodium fluoride to 2% for 2 weeks. Each tooth was then placed in an individual test tube with growth medium. Samples were examined for evidence of growth (turbity) and absorbance values. All experimental groups promoted reduction of *E. faecalis* and a statistically significant difference was observed between groups (test t for independet samples) with $p<0,05$. Only GII, method autoclaving for 30 minutes at 121° C and 15 psi was effective in preventing growth. However, GIV showed better results than GIII, 1,00 ($\pm 0,02$) vs 0,89 ($\pm 0,09$), respectively. These results suggest that the solution of sodium fluoride to 2% can be a new method for disinfecting because of the ability to destroy and reduce the amount of microorganism *E. faecalis*.

Keywords: Fluoride, Autoclaving, Disinfection, Extracted human teeth, Antibacterial agents.

LISTA DE ABREVIATURAS

° C	Grau Celsius
psi	Pressão
K-rad	Dose de radiação
UFC/mL	Unidades Formadoras de Colônia
mL	Mililitro
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa de Seres Humanos
NaF	Fluoreto de Sódio

LISTA DE TABELAS

Tabela I - Grupos experimentais	18
Tabela II - Média (\pm DP; n = 14) do crescimento bacteriano entre os grupos controle, autoclave e fluoreto de sódio a 2%	20

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico I - Média (\pm DP; n = 14) do crescimento bacteriano para os grupos controle e experimentais 20

SUMÁRIO

1.0 CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	11
2.0 ARTIGO.....	15
RESUMO	15
INTRODUÇÃO	16
MATERIAL E MÉTODOS	17
Uniformização dos espécimes	17
Formação de biofilme com <i>E. faecalis</i>	17
Divisão dos grupos experimentais.....	18
Amostras e análise microbiológica.....	18
Análise estatística	19
RESULTADOS.....	19
DISCUSSÃO.....	21
REFERÊNCIAS.....	23
3.0 CONCLUSÕES.....	26
REFÊRENCIAS GERAIS.....	27
ANEXOS	32
1.0 Guia para autores Journal of Applied Microbiology	32
2.0 Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa – UFVJM.....	40

1.0 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Os dentes humanos extraídos são utilizados com frequência em pesquisas laboratoriais (Amaechi, Higham e Edgar, 1999), por estudantes de graduação na prática da clínica e pré - clínica (Dominici *et al.*, 2001; Hashemipour *et al.*, 2013), pois há situações em que não existe um substituto aceitável para os dentes extraídos quando se quer examinar, preparar ou pesquisar. Bem como por pacientes que eventualmente recebam restaurações biológicas (Casellatto *et al.*, 2007).

A utilização dos dentes extraídos pode ser responsável pela transmissão de doenças infecciosas quando não descontaminados corretamente. Pois, essa microbiota bucal pode sobreviver por um longo período de tempo a temperatura ambiente (Miller e Palenik, 1980) e serem assim, responsáveis pelas transmissões de doenças vírais como hepatites B e C, imunodeficiência adquirida e doenças bacterianas (Amaechi, Higham e Edgar, 1998).

Por esse motivo, o órgão responsável pelo controle e prevenção de infecções, *United States Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), publicou uma diretriz a ser seguida por laboratórios de pesquisa e instituições de ensino com o objetivo de controlar as infecções cruzadas. Para isso, expuseram a necessidade da esterilização de dentes humanos extraídos previamente ao seu uso (Hope, Griffiths e Prior, 2013).

Um banco de dentes humanos é uma instituição sem fins lucrativos, que deve estar vinculada a uma faculdade, universidade ou outra instituição. Seu propósito é suprir as necessidades acadêmicas, fornecendo dentes humanos para pesquisa ou atividades didáticas (Nassif *et al.*, 2003).

Elementos dentários são órgãos complexos por apresentarem em sua estrutura polpa, tecidos radiculares e periradiculares (Whitel e Hays, 1995; Attam *et al.*, 2009) e ainda são considerados órgãos altamente contaminados. Há dificuldade na esterilização adequada sem que ocorra alteração das estruturas dentais (Kumar *et al.*, 2005) e consequentemente a não interferência no comportamento de materiais restauradores ou o sucesso das restaurações biológicas (Casellatto *et al.*, 2007), já que uma das vantagens em utilizar os dentes extraídos é conservar as características da "sensação" e de corte da situação clínica.

Procedimentos conhecidos por reduzir ou eliminar os microrganismos presentes nos elementos dentais são os processos de desinfecção ou esterilização, respectivamente. Estes foram

definidos por Molinari e Runnells em 1991, sendo que o processo de desinfecção é quando ocorre a destruição da maioria, mas não necessariamente de todos os microrganismos, como por exemplo, esporos microbianos altamente resistentes. Enquanto, a esterilização é o processo através do qual todas as formas de microrganismos, incluindo vírus, bactérias, fungos e esporos, são destruídos.

Com o intuito de se obter um método eficaz na esterilização de dentes humanos extraídos, diferentes meios físicos ou químicos foram avaliados e descritos na literatura. Porém, alguns métodos propostos não conseguiram eliminar todas as formas de microrganismos apenas reduziram a carga microbiana dos dentes, sendo eles: álcool 70% (Googis, Marshall e White, 1991; Casellatto *et al.*, 2007), micro-ondas (Viana *et al.*, 2010), hipoclorito de sódio (Dominici *et al.*, 2001; Kumar *et al.*, 2005) timol (Dewald, 1997), glutaraldeído 2% (Dominici *et al.*, 2001; Lolayekar, Bhat e Bhat, 2007).

Contudo, outros métodos analisados alcançaram a eficiência na eliminação dos microrganismos, obtendo-se o conceito de esterilização. Os métodos esterilizantes conhecidos na literatura científica são: autoclave (Dewald, 1997; Jaques e Hebling, 2006), formalina a 10% (Dewald, 1997; Kumar *et al.*, 2005) e irradiação gama (White *et al.*, 1994; Attam *et al.*, 2009).

Apesar dos métodos citados promoverem a esterilização dos elementos dentários, e consequentemente garantirem a eliminação de todos os tipos de microrganismos, ainda se é necessário o uso de barreiras protetoras adicionais (equipamentos de proteção individual) como o uso de máscaras, luvas impermeáveis e óculos de proteção durante a manipulação dos dentes extraídos (Dominici *et al.*, 2001; Jaques e Hebling, 2006) com o objetivo de prevenir acidentes físicos.

Para que a autoclave possa garantir eficácia no processo de esterilização dos dentes humanos extraídos, é necessário que a mesma seja manipulada corretamente e avaliados regularmente para assegurar sua temperatura e pressão (Pantera Jr e Schuster, 1990). Para que o procedimento torne-se eficaz, a temperatura, o tempo e a pressão necessários são: 121° C; 30 minutos e 15 psi, respectivamente (White *et al.*, 1994). Esse procedimento foi considerado um método simples, de baixo custo e adequado para o uso rotineiro (Kumar *et al.*, 2005). Porém, estudos indicam que este procedimento pode induzir alterações na estrutura da dentina e na parte orgânica dos órgãos dentários (White *et al.*, 1994; Dewald, 1997; Parsell, D.E. *et al.*, 1998).

A autoclave ainda apresenta a preocupação sobre o seu uso para a esterilização de dentes com restaurações de amálgama, pois, os mesmos, podem liberar vapores de mercúrio no ar e por conseguinte, contaminação ambiental e humana (Kumar *et al.*, 2005; Lolayekar, Bhat e Bhat, 2007).

A solução de formalina a 10% é a única solução capaz de esterilizar o interior da câmara pulpar e túbulos dentinários. Mas, para que ocorra a eliminação dos microrganismos, é necessário que o dente esteja em solução por pelo sete dias (Tate e White, 1991). Esse método foi indicado como uma forma simples, barata e adequada para o uso rotineiro (Kumar *et al.*, 2005). Entretanto, esse material foi classificado pela Agência Internacional de Pesquisas sobre o câncer como um potencial agente carcinogênico humano, além de ser apresentado como um material irritante e perigoso (Schulein, 1994; Cuny e Carpenter, 1997) o que limita seu uso.

Já, a irradiação gama também mostrou capacidade esterilizante dos dentes humanos extraídos, sem alterar a permeabilidade da dentina ou produzir alterações estruturais da mesma. Para que a esterilização seja completa, é necessário uma dose de 173 k-rad junto a uma fonte de radiação de césio (White *et al.*, 1994), apresentando a vantagem de não haver a necessidade de uma alta temperatura e pressão (Carvalho *et al.*, 2009). Esse procedimento foi classificado como uma forma cara e inadequada por não ser um método prontamente disponível (Kumar *et al.*, 2005). Entretanto, o estudo de Titley *et al.*, (1998) indicou falhas atípicas na interface dentina-resina para estudos de resistência adesiva para esse meio.

Pode-se observar que os métodos esterilizantes indicados na literatura científica apresentam desvantagens e divergências quanto aos resultados sobre os testes de resistência à união (Googis *et al.*, 1993; Parsell, D.E. *et al.*, 1998; Casellatto *et al.*, 2007; Viana *et al.*, 2010), neste sentido torna-se fundamental a tentativa de controlar a infecção cruzada, realizando a descontaminação dos elementos dentais sem que o mesmo provoque alteração das estruturas do substrato dental.

Sabe-se, que o fluoreto de sódio é um sal inorgânico de baixo peso molecular (Chouhan e Flora, 2008), derivado do ácido fluorídrico, com atuação consistente na odontologia devido seu papel na prevenção da cárie dentária (Tong *et al.*, 2011), seu papel está bem documentado na literatura científica (Xu *et al.*, 2012). Este material é responsável pela inibição da atividade bacteriana presente na placa dental (Rosin-Grget e Lineir, 2001; Tong *et al.*, 2011). Além disso, o fluoreto apresenta as características de ser antienzimático, microbicida (Clarkson, 1991; Ogard, Seppa e Rolla, 1994) e ser biologicamente ativo mesmo em suas concentrações mais baixas (Chouhan e Flora, 2008).

Dessa forma, o mecanismo de ação do fluoreto de sódio sobre os microrganismos despertou interesse em vários autores e diferentes épocas. Pesquisas realizadas indicaram que o fluoreto era capaz de prevenir a glicólise bacteriana afetando diretamente a enzima enolase e adenosina trifosfatase, e o mesmo poderia inibir o transporte de glicose pela força motriz protônica e o sistema fosfotransferase para o interior das células, pelo excesso de acidificação do citoplasma (Bunick e Kashket, 1981; Sutton, Bender e Marquis, 1987; Hamilton, 1990). Assim, esse sal inorgânico seria conhecido pela inibição do metabolismo das bactérias (Wiegand, Buchalla e Attin, 2007; Carvalho *et al.*, 2009).

Outro importante aspecto é o transporte do fluoreto de sódio por difusão simples. Pois, para que ocorra qualquer efeito microbicida do fluoreto, é necessário que esse se desloque para o interior das membranas celulares (Rosin-Grget e Lineir, 2001). Dessa forma, o fluoreto torna-se capaz de produzir efeitos adversos no metabolismo das células e suas funções, através da interferência na ligação de hidrogênio, da inibição de inúmeras enzimas (Waldbott, Burgstahler e Mckinney, 1978; Emsley *et al.*, 1981) , da inibição de duas proteínas específicas: fosfoseril e a fosfotirosil fosfatase (Everett, 2011) e da acidificação do citoplasma (Hamilton, 1990).

O fluoreto pode apresentar efeitos deletérios sobre os microrganismos e as células, dependendo da concentração e da duração de exposição (Everett, 2011). Íons fluoreto em concentrações maiores que 0,12% já podem apresentar efeitos microbicidas (Andres, Shaeffer e Windeler Jr., 1974; Xu *et al.*, 2012). Um estudo laboratorial realizado em 2001, identificou que o fluoreto de sódio é capaz de inibir o metabolismo de bactérias como, estreptococos, estafilococos e lactobacilos bucais (Balzar Ekenbäck *et al.*, 2001).

Apesar das vantagens apresentadas pelo fluoreto de sódio, a literatura aponta diferentes efeitos tóxicos do fluoreto quando há uma alta exposição à substância, pois o mesmo é capaz de inibir enzimas e realizar a quebra de colágeno, resultando em impactos negativos na saúde como, problemas gastro intestinais, efeitos renais e imunológicos, bem como na saúde oral como, a fluorose dental (Harrison, 2005).

O microrganismos *E. Faecalis* é a bactéria mais comum dos canais radiculares tratados para doença periapical persistente, mas raramente aparece em infecções endodônticas primárias. Essa bactéria apresenta-se como altamente resistente a substâncias antibacterianas (Chai *et al.*, 2007)

Desta forma, o presente estudo tem como objetivo avaliar a eficácia do fluoreto de sódio a 2% na esterilização de dentes de humanos extraídos comparado ao método autoclave.

2.0 ARTIGO

2.1 Avaliação do fluoreto de sódio a 2% como um novo método para desinfecção de dentes humanos extraídos.

Autores: M.F.F. de Carvalho¹, L.C.S. Santos², E. Watanabe³, J. A. Soares¹, A. M. Botelho¹, K. T. A. Tavano¹

¹ Departamento de Odontologia, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), Diamantina – Brasil

² Departamento de Enfermagem Geral e Especializada, Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (EERP-USP), Ribeirão Preto – Brasil

³ Departamento de Odontologia Restauradora, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FORP-USP), Ribeirão Preto – Brasil

RESUMO

Objetivo: O objetivo desta pesquisa foi investigar a ação da solução de fluoreto de sódio a 2% como um novo método de desinfecção/esterilização de dentes humanos extraídos, usando *E. faecalis*.

Método e Resultados: A taxa de sobrevivência do *E. faecalis* ATCC 29212 foi avaliada por meio da absorbância do meio de cultura usando o espectrofotômetro. A avaliação da esterilização foi realizada entre os Grupos (n=14) grupo I (GI) controle, GII: autoclave, GIII: fluoreto de sódio 7 dias, GIV: fluoreto de sódio 14 dias. Com o uso dos métodos autoclave e solução de fluoreto de sódio a 2% a quantidade de bactérias reduziu significativamente em comparação ao grupo controle ($p < 0,001$). Além disso, quando comparado os grupos experimentais entre si, houve uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$).

Conclusão: O resultado sugere que a solução de fluoreto de sódio a 2% pode ser considerada um novo método desinfetante pela capacidade de reduzir a carga de *E. faecalis*.

Significância e Impacto do Estudo: O desenvolvimento de novos agentes desinfetantes são necessários, porque há a uma necessidade do uso constante de dentes humanos extraídos por estudantes e pesquisadores. Este artigo indica que a solução de fluoreto de sódio a 2% pode representar um novo método desinfetante, reduzindo assim as chances de infecções cruzadas.

Palavras-chave: Fluoreto, Autoclave, Desinfecção, Dentes humanos extraídos, Agente Antibacteriano.

INTRODUÇÃO

O controle da infecção cruzada é um dos aspectos críticos na odontologia (Hashemipour *et al.*, 2013). Dentes humanos extraídos são utilizados com frequência por instituições de pesquisa e ensino, para o desenvolvimento científico e de atividades didáticas, respectivamente. Dessa forma, há situações em que não existe um substituto aceitável para os dentes extraídos quando se quer examinar, preparar ou pesquisar (Dominici *et al.*, 2001; Attam *et al.*, 2009).

A estrutura complexa de um órgão dental composta por polpa, tecidos radiculares e periradiculares é um dos principais responsáveis pelas transmissões de doenças infecciosas como o vírus da hepatite B (HBV), da hepatite C (HCV), da imunodeficiência adquirida e de outros patógenos encontrados no sangue (Tate e White, 1991). Por esse motivo, o Occupational Safety and Health Administration (OSHA) considerou os dentes humanos extraídos usados para pesquisa e ensino como uma potencial fonte de microrganismos (Control, 1993). Assim, com o objetivo de controlar as infecções cruzadas, nos Estados Unidos o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), expuseram a necessidade da esterilização de dentes humanos extraídos previamente ao seu uso (Hope, Griffiths e Prior, 2013; Goel *et al.*, 2014).

Com isso, diferentes métodos de desinfecção/esterilização para dentes extraídos tem sido testados e apresentado variadas taxas de sucesso (Lolayekar, Bhat e Bhat, 2007). Dentre os métodos químicos e físicos eficazes, a solução de formalina a 10% e a autoclave são os meios esterilizantes que se apresentam de forma simples, baixo custo e adequada para o uso rotineiro (Kumar *et al.*,

2005). Entretanto, características como potencial irritante e altamente carcinogênico (Cuny e Carpenter, 1997) ou promover alterações na estrutura da dentina (Dewald, 1997) são desvantagens que levam a necessidade de se obter uma alternativa adequada para a desinfecção dos dentes extraídos.

O fluoreto de sódio é utilizado por décadas na prática odontológica como um efetivo agente anticariogênico (Xu *et al.*, 2012). Este sal inorgânico, apresenta ainda a vantagem de ser antienzimático e microbicida (Clarkson, 1991; Ogard, Seppa e Rolla, 1994). Os íons fluoreto são transportados por difusão simples para o interior das células e acabam acarretando efeitos deletérios sobre os microrganismos e as células (Everett, 2011).

Até o momento, nenhum estudo avaliou a eficácia do fluoreto de sódio como um desinfetante de dentes humanos extraídos. O presente estudo tem como objetivo determinar se o fluoreto de sódio à 2% pode ser utilizado como um novo método desinfetante/esterilizante de dentes extraídos e ser assim uma alternativa para o método autoclave.

MATERIAL E MÉTODOS

Uniformização dos espécimes

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa de Seres Humanos (CEP) da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri – UFVJM. Foram selecionados cinquenta e seis molares permanentes extraídos. Após o cálculo do tamanho amostral para comparação de duas proporções, uma proporção de 100% de desinfecção/esterilização para o método autoclave (Dominici *et al.*, 2001), intervalo de confiança de 95% e erro padrão de 5% foram considerados, com o intuito de compensar eventuais perdas, a amostra foi acrescida de 20%. Os molares recém-extraídos eram livres de restaurações, lesões cariosas, fraturas, abrasão e alterações morfológicas. Todos os dentes foram limpos com curetas para a remoção dos debris e polidos com taças de borracha e pasta pedra - pomes em baixa rotação. Os dentes foram armazenados em água destilada estéril até o momento do teste para prevenir desidratação.

Os espécimes ($n=56$) foram divididos aleatoriamente em três grupos experimentais e um grupo controle ($n=14$). Os mesmos foram esterilizados com óxido de etileno (ACECIL, Campinas, SP, Brasil) previamente a análise microbiológica.

Formação de biofilme com *E. faecalis*

Todo procedimento foi realizado em uma cabine de segurança biológica (VecoFlow Ltda, Campinas, SP, Brasil). Inóculo padronizado de *E. faecalis* ATCC 29212 foi obtido por meio de

espectrofotômetro (10^8 UFC/mL). Alíquotas de 1% do inóculo bacteriano padronizado foi transferido para Tryptic Soy Broth (TSB; Difco, Detroit, EUA).

Microplacas contendo os espécimes foram mantidos em microaerofilia em uma incubadora de bancada com agitação orbital (Quimis Aparelhos Científicos Ltda, Diadema, SP, Brasil) a uma temperatura de 37° C por um período de 48 horas. Após 24 horas, o meio de cultura foi renovado sem adição de inóculo microbiano.

Divisão dos grupos experimentais

Três grupos experimentais foram estabelecidos para avaliação do método de esterilização (Tabela I). Os dentes para o grupo autoclave, foram submetidos à esterilização a 121° C por 30 minutos (15 psi) e os grupos com fluoreto de sódio (NaF) à 2% foram submersos na solução por 7 dias ou 14 dias (após a primeira semana a solução foi renovada). Já para grupo o controle, os dentes foram mantidos em solução salina 0,85% por quatorze dias à temperatura ambiente.

Tabela I. Grupos experimentais

Grupos	n	Tratamento	Concentração	Tempo
GI	14	Controle	-	14 dias
GII	14	Autoclave	-	30 minutos
GIII	14	NaF	2%	7 dias
GIV	14	NaF	2%	14 dias

G, grupos

NaF, Fluoreto de sódio

Amostras e análise microbiológica

Após a realização dos tratamentos, os espécimes de cada grupo foram retirados assepticamente com auxílio de uma pinça clínica esterilizada e transferidos para frascos (200mL) contendo Alternative Thiglycollate Medium (NHI; Himedia). Os frascos contendo cada dente foi incubado a 37° C por 14 dias.

Evidência de turvação das amostras foram observadas e uma análise da absorbância da solução foi realizada no espectrofotômetro. Foi realizado o teste de esterilidade em meio de cultura tioglicolato e após a leitura da absorbância do meio com crescimento bacteriano em comprimento de onda de 625nm.

Análise estatística

A análise dos valores de absorbância dos grupos testados foi avaliada usando o teste Shapiro-Wilk, o qual confirmou distribuição normal ($p > 0,05$). Por esse motivo, o teste t para amostras independentes foi utilizado para comparar os valores entre os grupos controle e NaF; autoclave e NaF, os resultados serão expressos pela média \pm desvio – padrão (DP). O nível de significância será o valor de $p < 0,05$. A análise estatística foi realizada utilizando o software SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) versão 21.0.

RESULTADOS

A análise da turvação do caldo com crescimento bacteriano foi realizado para os quatro grupos até 14 dias de incubação. Evidência de turbidez dos caldos indicam crescimento bacteriano e consequentemente inefetividade na esterilização.

O grupo controle negativo, sem tratamento antimicrobiano apresentou turvação nos frascos de Alternative Thiglycollate Medium. Por outro lado, não foi observado crescimento microbiano para o grupo autoclave após incubação (Gráfico I).

A solução NaF a 2% mostrou que os espécimes mantidos em solução por 14 dias apresentou maior redução de carga bacteriana quando comparado com os armazenado por apenas 7 dias (Gráfico I).

A análise estatística realizada pelo teste t para amostras independentes revelou diferenças estatisticamente significante ($p < 0,05$) entre os grupos controle, autoclave, NaF a 2% 7 dias e NaF a 2% 14 dias (Tabela IV).

Gráfico I. Média (\pm DP; n = 14) do crescimento bacteriano para os grupos controle e experimentais.

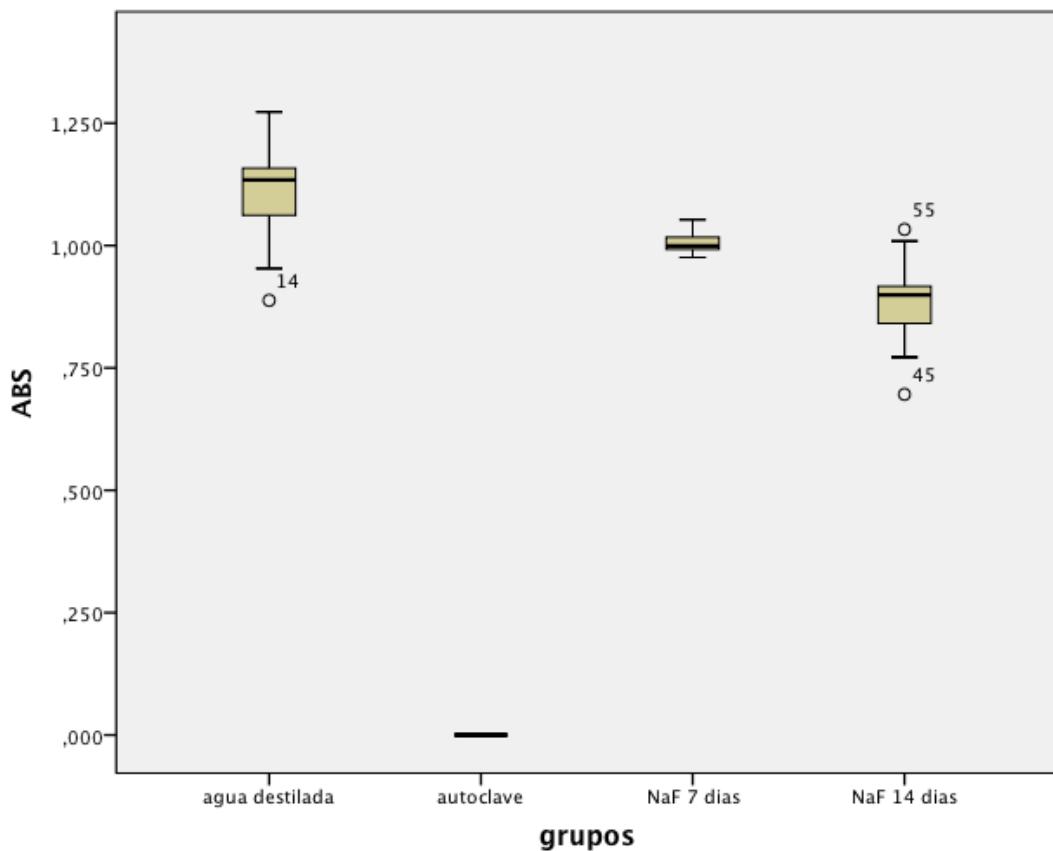


Tabela II. Média (\pm DP; n = 14) do crescimento bacteriano entre os grupos controle, autoclave e fluoreto de sódio a 2%.

Grupos	Média (\pm DP)	p*
GI vs GIII	1,10 (\pm 0,98) vs 1,00 (\pm 0,02)	0,001
GI vs GIV	1,10 (\pm 0,98) vs 0,89 (\pm 0,09)	0,001
GII vs GIII	0,00 (\pm 0,00) vs 1,00 (\pm 0,02)	0,001
GII vs GIV	0,00 (\pm 0,00) vs 0,89 (\pm 0,09)	0,001
GIII vs GIV	1,00 (\pm 0,02) vs 0,89 (\pm 0,09)	0,001

* Diferença estatisticamente significante (teste t, p < 0,05).

DISCUSSÃO

O modelo experimental adotado permitiu a reinfecção dos dentes humanos extraídos fator muito semelhante ao que acontece em situações clínicas (Dornelles-Morgental *et al.*, 2011). O microrganismo *E. faecalis* foi utilizado devido à sua capacidade de formar biofilmes, sobreviver como uma monocultura e ser resistente (Stuart *et al.*, 2006). O presente estudo, indicou que os grupos experimentais autoclave e NaF a 2% reduziram significativamente a presença de *E. faecalis* quando comparado ao grupo controle.

Esse trabalho, demonstrou que o uso da autoclave a 121° C por 30 minutos (15 psi) foi efetivo na esterilização dos dentes humanos extraídos. Este estudo está de acordo com resultados obtidos de pesquisas anteriores, as quais indicam a capacidade deste método em inativar diversos microrganismos como vírus, bactérias, fungos e esporos (Dominici *et al.*, 2001; Kumar *et al.*, 2005; Lolayekar, Bhat e Bhat, 2007). Porém, alguns estudos prévios revelam desvantagem deste método quanto à manutenção das propriedades estruturais dos dentes extraídos (Dewald, 1997; Amaechi, Higham e Edgar, 1999; Viana *et al.*, 2010).

Apesar da solução de NaF a 2% não ter esterilizado os espécimes a redução da carga microbiana foi observada em 7 e 14 dias de tratamento. Dessa forma, nosso estudo sugere uma atividade antibacteriana da solução de NaF a 2%. Esse achado corrobora com estudos anteriores, a qual o fluoreto desempenha papel direto na inibição bacteriana (Hamilton, 1990; Tong *et al.*, 2011). O uso da solução de NaF a 2% por 2 semanas, resultou em uma maior capacidade desinfetante. Pois o mesmo promoveu uma redução estatisticamente significativa da contagem de *E. faecalis* quando comparado a solução de NaF a 2% por 1 semana. Esse resultado, pode ser explicado pelo fato do NaF apresentar efeitos deletérios dependendo da sua concentração e duração de exposição (Everett, 2011).

O mecanismo de ação pelo qual o fluoreto induz a morte microbiana foi objeto de estudo de vários autores em diferentes épocas. Alguns destes atribuem a destruição do microrganismo, pela inibição do transporte de glicose para o interior das células por um excesso de acidificação do citoplasma (Sutton, Bender e Marquis, 1987; Ten Cate e Von Loveren, 1999; Rosin-Grget e Lineir, 2001). Além desta característica, outros trabalhos demonstram a capacidade do fluoreto na inibição de importantes enzimas e proteínas específicas, sendo elas: enolase, adenosina trifosfatase e fosfoseril, fosfotirosil fosfatase; respectivamente (Everett, 2011; Tong *et al.*, 2011; Lussi, Hellwig e

Klimek, 2012). Assim, essas alterações afetariam negativamente o metabolismos dos microrganismos podendo levar a morte celular.

Outro importante aspecto avaliado foi estipular a concentração necessária da solução de NaF com o intuito de promover atividade microbiana. Um estudo prévio indicou que íons fluoreto em altas concentrações ($> 0,12\%$) levariam a um efeito bactericida (Mjor, Moorhead e Dahl, 2000). Já, Chouhan e Flora, 2008 demonstraram que o NaF poderia ser biologicamente ativo mesmo em suas concentrações mais baixas. Este estudo utilizou a solução de NaF a 2%, e os resultados indicaram atividade bactericida significativa sobre o microrganismo *E. faecalis*. Os resultados deste estudo estão de acordo com o trabalho de Tong *et al.*, 2011, que observou fortes efeitos bactericidas do NaF a 2% sobre o biofilme de *S. mutans*, os quais após análise, mostraram uma forma irregular e distorcida da forma original.

Entretanto, o fato da solução de NaF a 2% não ter sido capaz de eliminar todo o microrganismo pode ser explicada pelo estudo de Chouhan e Flora (2008), a qual indicam que o uso do NaF em concentrações mais elevadas são responsáveis por uma reduzida mobilidade iônica e consequentemente uma menor disponibilidade dos íons fluoreto, enquanto baixas concentrações do NaF demonstram melhor mobilidade dos íons para atingir o “alvo” e promover a atividade microbiana.

Na literatura, diferentes métodos têm sido sugeridos para a desinfecção de dentes extraídos, em estudos recentes foram testados materiais como Gigasept PA (Hope, Griffiths e Prior, 2013) e vinagre (Tijare *et al.*, 2014), ambos materiais demonstraram capacidade desinfetante. Porém, o primeiro material é um desinfetante hospitalar de alto nível e, portanto de difícil acesso, enquanto para o segundo material, são necessário novos estudos que tenham como objetivo elucidar o mecanismo de ação do mesmo. Com isso, a solução de NaF a 2% oferece vantagens com relação aos métodos citados, pois, é um material de fácil acesso, baixo custo, simples e rápido.

A radiação gama é conhecida como a melhor técnica para a esterilização de dentes humanos extraídos. Pois, resultados de estudos anteriores indicam a capacidade deste método em não alterar a permeabilidade da dentina ou produzir alterações estruturais da mesma (Dewald, 1997; Kumar *et al.*, 2005). Entretanto, a radiação gama apresenta a desvantagem de ser um método caro, que envolve um processo complexo e acesso limitado (Viana *et al.*, 2010). Por esse motivo, nosso estudo optou por não utilizar este meio, o que pode ser considerado uma limitação do estudo.

A partir dos resultados desta investigação, a solução de NaF a 2% pode ser considerada como uma alternativa viável aos métodos de desinfecção de dentes extraídos. Este procedimento é rápido e requer apenas o pó do NaF e água destilada. No entanto, novos estudos devem ser conduzidos para uma avaliação da solução de NaF como um possível meio de armazenamento. Pois, os meios de desinfecção e armazenamento não devem ser apenas eficazes, mas também precisam garantir a integridade estrutural do dente (Attam *et al.*, 2009). Para isso, novas concentrações devem ser testadas afim de avaliar possíveis trocas iônicas entre a superfície do dente e a solução de NaF e ua interferência no processo da esterilização.

Baseado nos achados do presente estudo, a solução de NaF a 2% pode ser considerado um método efetivo na desinfecção dos dentes humanos extraídos, pela capacidade de reduzir a carga microbiana do microrganismo *E. faecalis*. É necessário ter em mente que os dentes humanos extraídos mesmo após o procedimento de desinfecção devem ser manuseados com cuidado extremo.

AGRADECIMENTOS

Pesquisa realizada com o suporte da FAPEMIG.

REFERÊNCIAS

- Amaechi, B. T., Higham, S. M. and Edgar, W. M. (1999) The Use Of Gamma Irradiation For The Sterilization Of Enamel For Intra-Oral Cariogenicity Tests. *J Oral Rehabil* **26**, 809-813.
- Attam, K., Talwar, S., Yadav, S. and Miglani, S. (2009) Comparative Analysis Of The Effect Of Autoclaving And 10% Formalin Storage On Extracted Teeth: A Microleakage Evaluation. *J Conserv Dent* **12**, 26-30.
- Chouhan, S. and Flora, S. J. (2008) Effects Of Fluoride On The Tissue Oxidative Stress And Apoptosis In Rats: Biochemical Assays Supported By Ir Spectroscopy Data. *Toxicology* **254**, 61-67.
- Clarkson, B. H. (1991) Caries Prevention: Fluoride. *Adv Dent Res* **5**, 41-45.
- Centers for Disease Control (1993) Recommended Infection Control Practices For Dentistry. *Mmwr* **42**, 8-9.
- Cuny, E. and Carpenter, W. M. (1997) Extracted Teeth: Decontamination, Disposal And Use. *Dent Assoc J* **25**, 801-804.

- Dewald, J. P. (1997) The Use Of Extracted Teeth For In Vitro Bonding Studies: A Review Of Infection Control Considerations. *Dent Mater* **13**, 74-81.
- Dominici, J. T., Eleazer, P. D., Clark, S. J., Staat, R. H. and Scheetz, J. P. (2001) Disinfection/Sterilization Of Extracted Teeth For Dental Student Use. *J Dent Educ* **65**, 1278-1280.
- Dornelles-Morgental, R., Guerreiro-Tanomaru, J. M., Faria-Júnior, N. B., Hungaro-Duarte, M. A., Kuga, M. C. and Tanomaru-Filho, M. (2011) Antibacterial Efficacy Of Endodontic Irrigating Solutions And Their Combinations In Root Canals Contaminated With Enterococcus Faecalis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **112**, 396-400.
- Everett, E. T. (2011) Fluoride's Effects On The Formation Of Teeth And Bones, And The Influence Of Genetics. *J Den Res* **90**, 552-560.
- Goel, K., Gupta, R., Solanki, J. and Nayak, M. (2014) A Comparative Study Between Microwave Irradiation And Sodium Hypochlorite Chemical Disinfection: A Prosthodontic View. *J Clin Diagn Res* **8**, 42-46.
- Hamilton, I. R. (1990) Biochemical Effects Of Fluoride On Oral Bacteria. *J Dent Res* **69**, 660-667.
- Hashemipour, M. A. Mozafarinia, R., Mirzadeh, A., Mozafarinia, R., Mirzadeh, A., Aramon, M. and Nassab, S. S. H. G. (2013) Knowledge, Attitudes, And Performance Of Dental Students In Relation To Sterilization/Disinfection Methods Of Extracted Human Teeth. *Dent Res J* **10**, 482-488.
- Hope, C. K., Griffiths, D. A., Prior, D. M. (2013) Finding An Alternative To Formalin Forsterilization Of Extracted Teeth For Teaching Purposes. *J Dent Educ* **77**, 68-71.
- Kumar, M., Sequeira, P. S., Peter, S. and Bhat, G. K. (2005) Sterilisation Of Extracted Human Teeth For Educational Use. *Indian J Med Microbiol* **23**, 256-258.
- Lolayekar, N. V., Bhat, V. S., Bhat, S. S. (2007) Disinfection Methods Of Extracted Human Teeth. *J Oral Health Comm Dent* **1**, 27-29.
- Lussi, A., Hellwig, E., Klimek, J. (2012) Fluorides – Mode Of Action And Recommendations For Use. *Res Science* **122**, 1030-1036.
- Mjor, I. A., Moorhead, J. E., Dahl, J. E. (2000) Reasons For Replacement Of Restorations In Permanent Teeth In General Dental Practice. *Int Dent J* **50**, 361–366.
- Ogard, B., Seppa, L., Rolla, G. (1994) Professionals Topical Fluoride Applications: Clinical Efficacy And Mechanism Of Action. *Adv. Dent. Res* **8**, 190-201.
- Rosin-Grget, K., Lineir, I. (2001) Current Concept On The Anticaries Fluoride Mechanism Of The Action. *Coll. Antropol* **25**, 703-712.
- Stuart, C. H., Schwartz, A.S. , Beeson, T.J. and Owatz, C.B. (2006) Enterococcus Faecalis: Its Role In Root Canal Treatment Failure And Current Concepts In Retreatment. . *J Endod* **32**, 93-98.
- Sutton, S. V., Bender, G. R., Marquis, R. E. (1987) Fluoride Inhibition Of Proton-Translocating Atpases Of Oral Bacteria. *Infect Immun*, **55**, 2597-2603.
- Tate, W. H., White, R. R. (1991) Disinfection Of Human Teeth For Education Purposes. *J Dent Educ* **55**, 583-585.

Ten Cate, J. M., Von Loveren, C. (1991) Fluoride Mechanism. Dent Clin North Am **43**, 713–742.

Tijare, M., Smitha, D., Kasetty, S., Kallianpur, S., Gupta, S. and Amith, H. V. (2014) Tijare Vinegar As A Disinfectant Of Extracted Human Teeth For Dental Educational Use. J Oral Maxil Pathol **18**, 14-18.

Tong, Z., Zhoub, L., Jiang, W., Kuanga, R., Lic, J., Tao, R. and Ni, L. (2011) An In Vitro Synergetic Evaluation Of The Use Of Nisin And Sodium Fluoride Or Chlorhexidine Against Streptococcus Mutans. Peptides **32**, 2021-2026.

Viana, P. S., Machado, A. L., Giampaolo, E. T., Pavarina, A. C. and Vergani, C. E. (2010) Disinfection Of Bovine Enamel By Microwave Irradiation: Effect On The Surface Microhardness And Demineralization/Remineralization Processes. Caries Res **44**, 349-357.

Xu, X., Wang, Y., Liao, S., Wen, Z. T. and Fan, Y. (2012) Synthesis And Characterization Of Antibacterial Dental Monomers And Composites. J Biomed Mater Res B **100b**, 1151-1162.

3.0 CONCLUSÕES

1. Neste estudo, a solução de NaF a 2% demonstrou atividade antibacteriana sobre o microrganismo *E. faecalis*, essa característica foi observada pela quantificação do microrganismo no caldo de crescimento.
2. A solução de NaF a 2% por 2 semanas indicou maior redução da carga microbiana de *E. faecalis* quando comparado ao método solução de NaF a 2% por 1 semana. Há grande evidência de que o maior tempo de exposição à solução tenha levado a esse resultado.
3. O estudo indicou a capacidade de este material ser utilizado como um novo método de armazenamento. Novos estudos são necessários no sentido de investigar se a concentração utilizada neste estudo é capaz de manter a integridade estrutural do dente após o tempo de armazenamento.

REFÊRENCIAS GERAIS

AMAECHI, B. T.; HIGHAM, S. M.; EDGAR, W. M. Effect of sterilisation methods on the structural integrity of artificial enamel caries for intra-oral cariogenicity tests. Elsevier Science, v. 27, p. 313-316, 1998.

AMAECHI, B. T.; HIGHAM, S. M.; EDGAR, W. M. The use of gamma irradiation for the sterilization of enamel for intra-oral cariogenicity tests. Journal of Oral Rehabilitation, v. 26, p. 809-813, 1999.

ANDRES, C. J.; SHAEFFER, J. C.; WINDELER JR., A. S. Comparison of antibacterial properties of stannous fluoride and sodium fluoride mouth-washes. Journal of Dentistry Research, v. 53, p. 457, 1974.

ATTAM, K.; TALWAR, S.; YADAV, S.; MIGLANI, S. Comparative analysis of the effect of autoclaving and 10% formalin storage on extracted teeth: A microleakage evaluation. Journal of Conservative Dentistry, v. 12, n. 1, p. 26-30, 2009.

BALZAR EKENBÄCK, S.; LINDER, L.E.; SUND, M.L.; LONNIS,H. Effect of fluoride on glucose incorporation and metabolism in biofilm cells of streptococcus mutans. European Journal of Oral Sciences, v. 109, p. 182–186, 2001.

BUNICK, F. J.; KASHKET, S. Enolases from fluoride-sensitive and fluoride-resistant streptococci. Infection and Immunity, v. 34, p. 856-863, 1981.

CARVALHO, F. G.; FUCIO, S. B. P.; PASCON, F. M.; KANTOVITZ, K. R.; CORRER-SOBRINHO, L.; PUPPIN-RONTANI, R. M. Effect of gamma Irradiation on fluoride Release and Antibacterial Activity of Resin. Dental Materials. Brazilian Dental Journal, v. 20, n. 2, p. 122-126, 2009.

CASELLATTO, C.; WANDERLEY, M. T.; MARQUEZAN, M.; RAGGIO, D. P.; RODRIGUES, C. R. M. D. Efeito de métodos de descontaminação na resistência de união à dentina de dentes decíduos. RPG Revista Pós Graduação, v. 13, n. 4, p. 307-311, 2007.

CHAI, W. L.; HAMIMAH, H.; CHENG, S.C.; SALLAM, A. A.; ABDULLAH, M. Susceptibility of Enterococcus faecalis biofilm to antibiotics and calcium hydroxide. Journal of Oral Science, v. 49, p. 161-166, 2007.

CHOUHAN, S.; FLORA, S. J. Effects of fluoride on the tissue oxidative stress and apoptosis in rats: biochemical assays supported by IR spectroscopy data. Toxicology, v. 254, n. 1-2, p. 61-67, 2008.

CLARKSON, B. H. Caries prevention: fluoride. Advances in Dental Research, v. 5, p. 41-45, 1991.

Centers for Disease Control. Recommended infection control practices for dentistry. MMWR, v. 42, p. 8-9, 1993.

CUNY, E.; CARPENTER, W. M. Extracted teeth: decontamination, disposal and use. Dent Assoc J, v. 25, p. 801-804, 1997.

DEWALD, J. P. The use of extracted teeth for in vitro bonding studies: A review of infection control considerations. Dental Materials, v. 13, p. 74-81, 1997.

DOMINICI, J. T.; ELEAZER, P. D.; CLARK, S. J.; STAAT, R. H.; SCHEETZ, J. P. Disinfection/Sterilization of Extracted Teeth for Dental Student Use. Journal of Dental Education, v. 65, n. 11, p. 1278-1280, 2001.

DORNELLES-MORGENTAL, R.; GUERREIRO-TANOMARU, J. M., FARIA-JÚNIOR, N. B., HUNGARO-DUARTE, M. A., KUGA, M. C. AND TANOMARU-FILHO, M. Antibacterial efficacy of endodontic irrigating solutions and their combinations in root canals contaminated with Enterococcus faecalis. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology Endodontic, v. 112, p. 396-400, 2011.

EMSLEY, J.; JONES, D.J.; MILLER, J.M.; OVERILL, R.E.; WADDILOVE, R.A. An unexpectedly strong hydrogen bond: ab initio calculations and spectroscopic studies of amide-fluoride systems. Journal of the American Chemical Society, v. 103, p. 24-28, 1981.

EVERETT, E. T. Fluoride's effects on the formation of teeth and bones, and the influence of genetics. Journal Dental Research, v. 90, n. 5, p. 552-560, 2011.

GOEL, K.; GUPTA, R.; SOLANKI, J.; NAYAK, M. A comparative study between microwave irradiation and sodium hypochlorite chemical disinfection: a prosthodontic view. Journal of Clinical and Diagnostic Research, v. 8, n. 4, p. 42-46, 2014.

GOOGIS, H. E.; MARSHALL, G. W.; WHITE, J. M. The effects of storage after extraction of the teeth on human dentine permeability in vitro. Archives of oral Biology, v. 36, n. 8, p. 561-566, 1991.

GOOGIS, H. E.; MARSHALL JR, G.W.; WHITE, J.M.; GEE, L.; HORNBERGER, B.; MARSHALL, S.J..Storage effects on dentin permeability and shear bond strengths. Dental Materials, v. 9, p. 79-84, 1993.

HAMILTON, I. R. Biochemical effects of fluoride on oral bacteria. Journal of Dental Research, v. 69, p. 660-667, 1990.

HARRISON, P. T. C. Fluoride in water: A UK perspective. Journal of Fluorine Chemistry, v. 126, p. 1448–1456, 2005.

HASHEMPOUR, M. A.; MOZAFARINIA,R.; MIRZADEH, A. ;MOZAFARINIA,R.; MIRZADEH, A.; ARAMON, M.; NASSAB, S. S. H. G. Knowledge, attitudes, and performance of dental students in relation to sterilization/disinfection methods of extracted human teeth. Dental Research Journal, v. 10, n. 4, p. 482-488, 2013.

HOPE, C. K.; GRIFFITHS, D. A.; PRIOR, D. M. Finding an Alternative to Formalin for Sterilization of Extracted Teeth for Teaching Purposes. Journal of Dental Education, v. 77, n. 1, p. 68-71, 2013.

JAQUES, P.; HEBLING, J. Influence of Autoclave Sterilization of Human Teeth on Dentin Bonding . Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada, v. 6, n. 1, p. 09-13, 2006.

KUMAR, M.; SEQUEIRA, P. S.; PETER, S.; BHAT, G. K. Sterilisation Of Extracted Human Teeth For Educational Use. Indian Journal of Medical Microbiology, v. 23, n. 4, p. 256-258, 2005.

LOLAYEKAR, N. V.; BHAT, V. S.; BHAT, S. S. Disinfection Methods of Extracted Human Teeth. Journal of Oral Health Community Dentistry, v. 1, n. 2, p. 27-29, 2007.

LUSSI, A.; HELLWIG, E.; KLIMEK, J. Fluorides – Mode of Action and Recommendations for Use. Research and Science, v. 122, n. 11, p. 1030-1036, 2012.

MILLER, C. H.; PALENIK, C. T. Infection control and sterilization of dental instruments. Journal of Indianadental association, v. 59, p. 15-20, 1980.

MJOR, I. A.; MOORHEAD, J. E.; DAHL, J. E. Reasons for replacement of restorations in permanent teeth in general dental practice. International Dental Journal, v. 50, p. 361–366, 2000.

MOLINARI, J. A.; RUNNELLS, R. R. Role of disinfectants in infection control. Dental Clinics of North America, v. 35, p. 323-327, 1991.

NASSIF A. C. S.; TIERI, F.; ANA, P. A.; BOTTA, S. B.; IMPARATO, J. C. P. Structuralization of human teeth bank. Pesquisa Odontológica Brasileira, v.17, p.70-74, 2003.

OGARD, B.; SEPPA, L.; ROLLA, G. Professionals topical fluoride applications: clinical efficacy and mechanism of action. Advances in Dental Research, v. 8, n. 2, p. 190-201, 1994.

PANTERA JR, E. A.; SCHUSTER, G. S. Sterilization of extracted human teeth. Journal of Dental Education, v. 54, p. 283-285, 1990.

PARSELL, D. E.; STEWART, B.M. ; BARKER, J.R. ; NICK, T.G.; KARNS, L.; JOHNSON, R.B. The effect of steam sterilization on the physical properties and perceived cutting characteristics of extracted teeth. Journal of Dental Education, v. 62, p. 260-263, 1998.

ROSIN-GRGET, K.; LINEIR, I. Current Concept on the Anticaries Fluoride Mechanism of the Action. Collegium Antropologicum, v. 25, n. 2, p. 703-712, 2001.

SCHULEIN, T. M. Infection control for extracted teeth in the teaching laboratory. Journal of Dental Education, v. 58, p. 411-413, 1994.

STUART, C. H.; SCHWARTZ, A.S. ; BEESON, T.J. ; OWATZ, C.B. Enterococcus faecalis: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment.. Journal of Endodontics, v. 32, p. 93-98, 2006.

SUTTON, S. V.; BENDER, G. R.; MARQUIS, R. E. Fluoride inhibition of proton-translocating ATPases of oral bacteria. Infection and Immunity, v. 55, n. 2597–2603, 1987.

TATE, W. H.; WHITE, R. R. Disinfection of human teeth for education purposes. Journal of Dental Education, v. 55, n. 9, p. 583-585, 1991.

TEN CATE, J. M.; VON LOVEREN, C. Fluoride mechanism. Dental Clinics North America, v. 43, p. 713–742, 1999.

TIJARE, M.; SMITHA, D.; KASETTY, S.; KALLIANPUR, S.; GUPTA, S.; AMITH, H. V. Tijare Vinegar as a disinfectant of extracted human teeth for dental educational use. Journal of Oral and Maxillofacial Pathology, v. 18, n. 1, p. 14-18, 2014.

TITLEY, K. C.; CHERNECKY, R.; ROSSOUW, P.E.; KULKARNI, G.V. The effect of various storage methods and media on shear bond strengths of dental composite resin to bovine dentine. Archives of Oral Biology, v. 43, n. 4, p. 305-311, 1998.

TONG, Z.; ZHOUB, L.; JIANGA, W.; KUANGA, R.; LIC, J.; TAO, R.; NI, L. An in vitro synergetic evaluation of the use of nisin and sodium fluoride or chlorhexidine against Streptococcus mutans. Peptides, v. 32, n. 10, p. 2021-2026, 2011.

VIANA, P. S.; MACHADO, A. L.; GIAMPAOLO, E. T.; PAVARINA, A. C.; VERGANI, C. E. Disinfection of bovine enamel by microwave irradiation: effect on the surface microhardness and demineralization/remineralization processes. Caries Research, v. 44, n. 4, p. 349-357, 2010.

WALDBOTT, G. L.; BURGSTAHLER, A. W.; MCKINNEY, H. L. Fluoridation: The Great Dilemma. Coronado Press, Lawrence, Kansas., p. 148–174, 1978.

WHITE, J. M.; GOODIS, H.E.; MARSHALL, S.J.; MARSHALL, G.W. Sterilization of teeth by gamma radiation. Journal of Dental Research, v. 73, p. 1560-1567, 1994.

WHITEL, R. R.; HAYS, G. L. Failure of ethylene oxide to sterilize extracted human teeth. Dental Materials, v. 11, p. 231-233, 1995.

WIEGAND, A.; BUCHALLA, W.; ATTIN, T. Review on fluoride-releasing restorative materials-fluoride release and uptake characteristics, antibacterial activity and influence on caries formation. Dental Materials, v. 23, n. 343-362, 2007.

XU, X.; WANG, Y.; LIAO, S.; WEN, Z. T.; FAN, Y. Synthesis and characterization of antibacterial dental monomers and composites. Journal Of Biomedical Materials Research B: Applied Biomaterials, v. 100B, n. 4, p. 1151-1162, 2012.

ANEXOS

1.0 Guia para autores Journal of Applied Microbiology

ARTICLE TYPES

Original Articles

Original Articles comprise most of the Journal and should have as their aim the development of concepts as well as the recording of facts. The manuscript should be prepared for a wide readership and as far as possible should present novel results of a substantial programme of research.

Review Articles

Review Articles will present a substantial survey with an adequate historical perspective of the literature on some facet of applied microbiology. We would prefer to see a distillation of early and present work within the field to show progress and explain the present interest and relevance. The manuscript should not be simply a review of past work or be concentrated largely on unpublished results.

Letters to the Editor

The Chief Editor will consider letters which will provide further debate on a particular topic arising from the publication of a paper in the Journal. Author(s) of the paper will be sent an edited copy of the letter and they will have the right of reply. Both letters will be published in the Journal.

EDITORIAL PROCESS

New manuscripts sent to the Journal will be handled first by the Editorial Office who checks compliance with the guidelines to authors. The manuscript is assigned to a handling Editor by the Chief Editor, and goes through a rapid screening process at which stage a decision to reject or to go to full review is made. This step ensures a rapid rejection of unsuitable manuscripts for the journal. Manuscripts that go to full review are assigned a minimum of two reviewers. Following the return of two reports, the handling Editor provides a report to the Chief Editor, who takes the decision to accept, revise or reject the manuscript. Revised manuscripts are directly handled by the Chief Editor who decides whether or not the manuscript should go back to the handling Editor for additional comments from the reviewers. Following the return of a report from the handling Editor and reviewers, the Chief Editor makes the decision to accept, further revise or reject the manuscript.

Authors may be advised that short papers not exceeding four published pages would be better placed in *Letters in Applied Microbiology*. Sequential publication of numbered papers will not be permitted.

EDITORIAL POLICY

To ensure responsible publication practices, this Journal adheres to Wiley Blackwell's [publication ethics policies](#), which include guidelines on handling suspected publication misconduct and complaints about the Journal. This Journal is a member of, and subscribes to the principles of, the [Committee on Publication Ethics](#).

Authorship

Qualification for authorship should comprise (1) substantial contribution to conception and design or the acquisition and analysis of data, (2) drafting or critically revising the manuscript, and (3) approval of the final submitted version. All authors must satisfy all three criteria, and all those who do satisfy this criteria must be included in the list of authors when the paper is submitted to the Journal. By submission of a manuscript to the Journal, all authors warrant that they have the authority to publish the material and that the paper, or one substantially the same, has neither been published previously, nor is being considered for publication elsewhere. Submissions may be subject to testing for textual similarity to other published works via the CrossCheck software employed by the Journal.

Conflict of interest disclosure

Journal of Applied Microbiology requires that all authors disclose any potential sources of conflict of interest. Any interest or relationship, financial or otherwise, that might be perceived as influencing an author's objectivity is considered a potential source of conflict of interest. These must be disclosed when directly relevant or indirectly related to the work that the authors describe in their manuscript. Potential sources of conflict of interest include but are not limited to patent or stock ownership, membership of a company board of directors, membership of an advisory board or committee for a company, and consultancy for or receipt of speaker's fees from a company. The existence of a conflict of interest does not preclude publication in this journal.

If the authors have no conflict of interest to declare, they must also state this at submission. It is the responsibility of the corresponding author to review this policy with all authors and to collectively list in the cover letter to the Chief Editor, in the manuscript (in the Conflict of Interest section), and in the online submission system ALL pertinent commercial and other relationships.

Ethics of experimentation

The Journal will only accept manuscripts in which there is evidence of the ethical use of animals or harmful substances. The care and use of experimental animals must comply with all relevant local animal welfare laws, guidelines and policies, and a statement of such compliance should be provided upon submission. Where possible, alternative procedures that replace the use of animals, either partially or completely, for example *in vitro* biological systems, should be used. Where this is not possible, the minimum number of animals should be used and pain and suffering reduced, consistent with attaining the scientific objectives of the study. All reasonable steps must be taken to ensure the humane treatment of animals, so as to minimize discomfort, distress and pain. Animals in pain or moribund should be painlessly killed according to local euthanasia regulations. The Journal encourages corresponding authors of manuscripts involving animal research to refer to the [ARRIVE guidelines](#) before submission of a manuscript.

Potential threat to security

The Journal expects that all authors will conform to the [National Science Advisory Board for Biosecurity \(NSABB\)](#) guidelines for Dual Use Life Sciences Research. Where a reviewer is concerned that an article might include information that could be a threat to security then the Editor will treat the article as possible DURC (dual use research of concern) and may consult a specialist reviewer. Their advice will be taken into account by the Editor in making any final decision on publication.

Antibiotic antimicrobial testing and microbial resistance

A number of methods like disc diffusion, Etest, agar dilution, broth microdilution and broth macrodilution, are suitable for *in vitro* antimicrobial susceptibility testing. However, the test used must be performed in accordance with an internationally accepted procedure; for example tests published by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), the British Society for Antimicrobial Chemotherapy (BSAC), the Deutsches Institut für Normung e.V. (DIN) and the Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM). Further guidance and interpretation of MIC 50 and MIC 90 values as well as guidance for the interpretation of multiresistance can be found in Schwarz *et al.* J. Antimicrobial Chemother 2010; 65: 601-604.

Data availability

Data that is integral to the paper must be made available in such a way as to enable readers to replicate, verify and build upon the conclusions published in the paper. Any restriction on the availability of this data must be disclosed at the time of submission. Data may be included as part of the main article where practical. We recommend that data for which public repositories are widely used, and are accessible to all, should be deposited in such a repository prior to publication. The appropriate linking details and identifier(s) should then be included in the publication and where possible the repository, to facilitate linking between the journal article and the data. If such a repository does not exist, data should be included as supporting information to the published paper or authors should agree to make their data available upon reasonable request.

- Nucleotide sequence data should be deposited in the EMBL/GenBank/DDBJ Nucleotide Sequence Data Libraries and the accession number referenced in the manuscript text, e.g. “E. coli (GenBank accession no. EUXXXXXX.X)”. Sequence data should only be included if they are new (unpublished), complete (no unidentified nucleotides included) and if the sequence information itself provides important new biological insights of direct relevance to the question addressed in the manuscript. Generally sequences should not be submitted if the same gene has been reported in another species unless a comparison with related sequences contributes important new information.
- Presentation of nucleotide sequences should include clear indications of nucleotide numbers and points of interest, e.g. promoter sequences, ribosome binding sites, mutations, insertions, probe sequences, etc. In the case of comparisons, nucleotides which differ between the sequences should be readily visible to the reader, e.g. by the use of bold face, shading, boxing or by the use of a dash to represent identical nucleotides. The font size used in the manuscript should facilitate appropriate reduction of the figure.

Copyright Transfer Agreement

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

For authors signing the copyright transfer agreement

If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below: CTA Terms and Conditions http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp

OnlineOpen

For authors choosing OnlineOpen

If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA):

Creative Commons Attribution License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

Referrals to the Open Access Journal *MicrobiologyOpen* and *Food Science & Nutrition*

This journal works together with two of Wiley's open access journals, *MicrobiologyOpen* and *Food Science & Nutrition* to enable rapid publication of good quality research that is unable to be accepted for publication by our journal. Authors may be offered the option of having the paper, along with any related peer reviews, automatically transferred for consideration by one of these two journals. *MicrobiologyOpen* and *Food Science & Nutrition* are Wiley open access

journals and article publication fees apply. For more information, please go to www.microbiologyopen.com/info and www.foodscience-nutrition.com/info.

SUBMISSION

Authors should submit their manuscripts online at <http://mc.manuscriptcentral.com/appliedmicrobiology>. The main text of a manuscript must be submitted as a Word document (.doc) or Rich Text Format (.rtf) file. All original files that you upload will be available for the Editorial Office to access.

Cover letter

The cover letter should contain answers to the following two questions, which will help the Editors in determining whether your manuscript should be sent for full peer review (~50 words per answer):

1. How does this work fits the Aims and Scope of the Journal?
2. In what way is this work novel?

The cover letter should also disclose any potential sources of conflict of interest that Editors may consider relevant to their manuscript.

Suggesting reviewers

Authors are invited to suggest at least two reviewers. It is not appropriate for reviewers to be members or former members of the authors' organization(s), or to have been associated with them. Conversely, authors may identify 'non-preferred' reviewers or institutions that they would rather were not approached. Authors should give justification for choosing non-preferred reviewers or institutions in their cover letter. Authors are advised that handling Editors reserve the right to select reviewers of their choice.

MANUSCRIPT PREPARATION AND PRESENTATION

Manuscripts should be drafted as concisely as possible. As space in the Journal is at a premium, the Editors always reserve the right to require authors to reduce the length of their manuscripts. Manuscripts will not be reviewed unless the English is of a publishable standard.

It is strongly recommended that you use the [author submission checklist](#) to help you to prepare your submission to the Journal.

The main text of the manuscript should be prepared as a Word document (.doc) or Rich Text Format (.rtf) file. Text must be double-spaced, and the pages of the manuscript must be numbered consecutively.

The title page should show the title of the manuscript; the names of authors and place(s) where the work was done; an abbreviated running headline not exceeding 35 letters and spaces; and the complete contact details for the corresponding author.

Original Articles should contain the following sections in this order:

- ABSTRACT: A brief summary of about 150-200 words, should give the major findings of the investigation under the following four headings: Aims; Methods and Results; Conclusions; Significance and Impact of Study. A list of between five and eight keywords should be added;
- INTRODUCTION: A balance must be struck between the pure and applied aspects of the subject;
- MATERIALS AND METHODS: Ensure that the work can be repeated according to the details provided. By submission of a manuscript, the authors consent that biological material, including plasmids, viruses and microbial strains, unobtainable from national collections will be made available to members of the scientific community for non-commercial purposes subject to national and international regulations governing the supply of biological material. In the case of a new diagnostic PCR, you should consider the need for an internal amplification control (JAM 2004 96(2):221; available [here](#)).
- RESULTS: Well-prepared tables and figures must be a cardinal feature of the 'Results' section because they convey the major observations to readers who scan a paper. Information provided in tables and figures should

not be repeated in the text, but focus attention on the importance of the principal findings of the study. In general, journal papers will contain between one and seven figures and tables;

- DISCUSSION: This must not recapitulate the results and authors must avoid the temptation of preparing a combined 'Results and Discussion' section;
- ACKNOWLEDGEMENTS: Contributors who do not qualify as authors should be acknowledged and their particular contribution described. All sources of funding for the work reported, for all the authors, must be acknowledged. Both the research funder and the grant number (if applicable) should be given for each source of funds;
- CONFLICT OF INTEREST: If no conflict of interest exists, then 'no conflict of interest declared' should appear within this section. Otherwise, authors should list all pertinent commercial and other relationships that may be perceived as a potential source of conflict of interest.
- REFERENCES;
- SUPPORTING INFORMATION (if applicable): Supporting Information can be a useful way for an author to include important but ancillary information with the online version of an article. Examples of Supporting Information include additional tables, data sets, figures, movie files, audio clips, 3D structures, and other related nonessential multimedia files. Supporting Information should be cited within the article text. The availability of supporting information should be indicated in the main manuscript by a section headed 'Supporting Information', under which should be appropriate legends for the material. It is published as supplied by the author, and a proof is not made available prior to publication; for these reasons, authors should provide any Supporting Information in the desired final format. For further information on recommended file types and requirements for submission, please visit: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/suppinfo.asp>

Review Article manuscripts must normally not exceed 32 pages (A4) including references, figures and tables. As references can make a heavy demand on the pages available to you, it is suggested that you select key references only. The headings in Review Articles are of the author's choice, but the manuscript should begin with a short SUMMARY of 150-200 words.

References

The Harvard system should be used. Citation of references having three or more names should be cited in the text as Jones *et al.* (1992) at the first and subsequent times of quoting the reference. A series of references should be given in ascending date order (Green and Smith 1946; Jones *et al.* 1956). Names with the prefixes de, do van, von, etc. will be placed in alphabetical order of the first letter of the prefix, e.g. von Braun would appear under 'V'. Different publications having the same author(s) and year will be distinguished by, for example, 1992a, 1992b. Papers or other publications having no obvious author(s) should usually be cited as 'Anon.' with the year in the text and bibliography. Web sites should be quoted in the text with an access date. Abbreviate journal titles according to Index Medicus (http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/terms_cond.html). Personal communications should be cited in the text with initials and family name of all individuals.

The following is an example of order and style to be used in the manuscript:

Fricker, C.R. (1995) Detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* in water. In Protozoan Parasites in Water ed. Betts, W.B., Casemore, D., Fricker, C.R., Smith, H.V. and Watkins, J. pp.91-96. London: The Royal Society of Chemistry.

Garner, J.S. and Favero, M.S. (1985) *Guidelines for Handwashing and Hospital Environment Control*. US Public Health Service, Centers for Disease Control HHS No. 99-117. Washington DC: Government Printing Office.

Laverick, M.A., Wyn-Jones, A.P. and Carter, M.J. (2004) Quantitative RT-PCR for the enumeration of noroviruses (Norwalk-like viruses) in water and sewage. *Lett Appl Microbiol* **39**, 127-135.

Tables

Tables must be prepared using the same word processing package as the manuscript text. They should not be embedded but be placed immediately following the main text. Do not submit tables separately. Tables must not include ruled vertical or horizontal lines with the exception of headers and a footer (see example). The use of explanatory footnotes is

permissible and they should be marked by the following (shown in order of preference): *, †, ‡, §, ¶, **, †† etc. For an example of table style, [click here](#).

Figures

Figures may be uploaded to the online submission site as separate files or included within the main manuscript file following the text and tables. Authors are advised that poor quality figures may delay the publication of their paper. Symbols or keys representing data series in graphs and charts must not be shown on the figure itself but be included in the legend typed on a separate sheet. For an example of figure style, [click here](#).

Photographs must be of good quality and high contrast. The magnification must be indicated by adding a bar representing a stated length. Composite photographs can reduce the numbers that require publication. The Journal will not accept figures illustrating SDS-PAGE and agarose gels, with multiple lanes, where lane order has been rearranged using digital imaging software. The figure should also show sufficient of the gel to reveal reference markers (e.g. the sample origin and a tracker dye, or a lane of molecular mass markers).

Please save line art (vector graphics) in encapsulated PostScript (EPS) format. Photographic images should be saved as Tagged Image Format Files (TIFF). Please indicate any form of file compression used (e.g. Zip). Detailed information on the submission of electronic artwork can be found at: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp>.

Colour figures

Online-only colour in figures is free of charge, however it is essential in these cases that the figure legends apply equally well to both printed greyscale and online colour versions, and do not specifically refer to the colour. Alternatively you can opt to pay for colour in the print and online versions. If your paper is accepted and you have opted for colour in print and online, we will need a completed Colour Work Agreement Form. This form can be downloaded as a PDF from [here](#) and should be sent to the provided address on acceptance.

English usage, abbreviations and units

Use 'z' spelling where possible, except analyse, dialyse, hydrolyse, etc.; sulfur, sulfate, etc. When using numbers in the text, one to nine should be written in full and 10 and above should be written as numerals. The Journal uses SI units: g l⁻¹ not g/l; d, h, min, s (time units) but week and year in full; mol l⁻¹ (not M or N); probability is P; centrifugation conditions relative to gravity (g). Please refer to the Biochemical Journal 'Instructions to Authors' www.biochemj.org/bj/bji2a.htm.

Please [click here](#) for some examples of common abbreviations used in the Journal.

Microbial nomenclature

The Latin binomial name of micro-organisms, plants and animals (other than farm animals) must be given at first mention in the text; thereafter the generic name will be abbreviated in such a way that confusion is avoided when dealing with several genera all beginning with the same letter, viz. *Pseudomonas*, *Proteus*, *Pediococcus*, etc. (see list of abbreviations below). Subspecies are italicized (*Corynebacterium diphtheriae* subsp. *mitis*); groups and types are printed in Roman and designated by capital letters or Arabic figures (e.g. *Staphylococcus aureus* group A). Common names will not have an initial capital letter nor will they be underlined in the manuscript, viz. pseudomonad, salmonellas. The specific name will be given in full in the captions to tables and figures. Major ranks are written in Roman with an initial capital (e.g. Enterobacteriaceae).

Please [click here](#) for a list of abbreviations currently in use for common generic names and for notes on referring to plant pathogenic bacteria.

Gnotobiotic animals

The terminology for describing the environmental status of animals in gnotobiotic experiments has established itself by usage. *Germ-free* implies freedom from any detectable microorganisms or viruses and it is limited by the tests used to detect contaminants. *Conventional animals* have a full complement of associated microbes. *Open conventional animals*

are housed in a standard animal house. *Isolator conventional animals* are maintained in isolators and associated with full flora. *Ex-germ-free* animals are those with an associated flora which have become conventional.

Statistics

Tests must be presented clearly to allow a reader with access to the data to repeat them. Statistical tests used in the study should be clearly indicated in the Materials and Methods section. It is not necessary to describe every statistical test fully, as long as it is clear from the context what was done. In particular, null hypotheses should be clearly stated.

Authors are urged to give consideration to the assumptions underlying any statistical tests used and to assure the reader that the assumptions are at least plausible. Authors should be prepared to use nonparametric tests if the assumptions do not seem to hold.

Footnotes

Not permitted other than on the first page of a manuscript where they are used to show the author's change of address and the address for correspondence.

Experimental hazards

Chemical or microbiological hazards that may be involved in the experiments must be explained. Authors should provide a description of the relevant safety precautions adopted or cite an accepted 'Code of Practice'.

English-language editing service

Authors for whom English is a second language may choose to have their manuscript professionally edited before submission to improve the English. A list of independent suppliers of editing services can be found [here](#). All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

AFTER ACCEPTANCE

Proofs

The corresponding author will receive an email alert containing a link to a web site. A working email address must therefore be provided for the corresponding author. The proof can be downloaded as a PDF file from this site and corrections made following the instructions sent with the proofs. Excessive changes made by the author in the proofs, excluding typesetter errors, may be charged separately.

Early View

Journal of Applied Microbiology is covered by Wiley Online Library's Early View service. Early View articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Articles are therefore available as soon as they are ready, rather than having to wait for the next scheduled print issue. Early View articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. The nature of Early View articles means that they do not yet have volume, issue or page numbers, so Early View articles cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article. More information about DOIs can be found at: <http://www.doi.org/faq.html>.

Offprints

A PDF offprint of the online published article will be provided free of charge to the corresponding author, and may be distributed subject to the Publisher's terms and conditions. Free access to the final PDF offprint or your article will be available via author services only. Please therefore sign up for author services if you would like to access your article

PDF offprint and enjoy the many other benefits the service offers. Paper offprints of the printed published article may be purchased if ordered via the method stipulated on the instructions that will accompany the proofs. Printed offprints are posted to the correspondence address given for the paper unless a different address is specified when ordered. Note that it is not uncommon for printed offprints to take up to eight weeks to arrive after publication of the Journal.

Note to NIH Grantees

Pursuant to NIH mandate, Wiley Blackwell will post the accepted version of contributions authored by NIH grant-holders to PubMed Central upon acceptance. This accepted version will be made publicly available 12 months after publication. For further information, see www.wiley.com/go/nihmandate.

Author material archive policy

Please note that unless specifically requested, Wiley Blackwell will dispose of all hardcopy or electronic material submitted 2 months after publication. If you require the return of any material submitted, please inform the Managing Editor or Production Editor.

Disclaimer

Whilst every effort is made by the Publishers and Editorial Board to see that no inaccurate or misleading data, opinion or statement appears in this Journal, they wish to make it clear that the data and opinions appearing in the articles and advertisements herein are the sole responsibility of the contributor or advertiser concerned. Accordingly, the Publishers and Editors and their respective employees, officers and agents accept no responsibility or liability whatsoever for the consequences of any such inaccurate or misleading data, opinion or statement

2.0 Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa – UFVJM



UNIVERSIDADE FEDERAL DOS
VALES DO JEQUITINHONHA E
MUCURI (FAFEID-UF)



PARECER CONSUSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Titulo da Pesquisa: Técnica de Esterilização e Armazenamento de dentes humanos: Investigação para padronização.

Pesquisador: Monize Ferreira Figueiredo de Carvalho

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 17511213.3.0000.5108

Instituição Proponente: Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 525.297

Data da Relatoria: 04/02/2014

Apresentação do Projeto:

Os elementos dentários extraídos são considerados potenciais fontes de microrganismos e por isso são capazes de transmitir doenças virais e bacterianas à aqueles que os manipulam sem os cuidados necessários. Desta forma, é necessário que os mesmos passem por procedimentos de desinfecção/esterilização, porém esses procedimentos devem permitir a manutenção das propriedades dos substratos dentários. O objetivo do presente estudo é comparar um novo método de desinfecção/esterilização (Fluoreto de Sódio a 2%) com procedimentos encontrados na literatura (Autoclave, Microndas, Formalina 10%). Será selecionada uma amostra representativa para os testes que serão realizados: teste microbiológico e de resistência adesiva que se subdividirá em teste de microcislhamento e de microtração. A análise estatística será realizada por meio do SPSS 20.0.

A variável dependente (esterilização) será associada com as variáveis independentes: teste microbiológico através do teste estatístico quiquadrado, e os testes de microcislhamento e microtração, os valores obtidos das variáveis serão anotados, tabulados e submetidos à interpretação estatística para verificação distribuição da normalidade. Verificando-se os pré-requisitos para realização de uma análise paramétrica, os dados serão avaliados através de Análise de Variância two-way.

Endereço: Rodovia MG7 367 - Km 583, nº 5000
Bairro: Alto da Jacuba CEP: 39.100-000
UF: MG Município: DIAMANTINA
Telefone: (38)3532-1240 Fax: (38)3532-1200 E-mail: cep@ufvjm.edu.br

Continuação do Parecer: 525.297

Recomendações:

- Segundo a Carta Circular nº. 003/2011/CONEP/CNS, de 21/03/11, há obrigatoriedade de rubrica em todas as páginas do TCLE pelo sujeito de pesquisa ou seu responsável e pelo pesquisador, que deverá também apor sua assinatura na última página do referido termo.
- Relatório final deve ser apresentado ao CEP ao término do estudo em 01/09/2014. Considera-se como antiética a pesquisa descontinuada sem justificativa aceita pelo CEP que a aprovou.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto atende aos preceitos éticos para pesquisas envolvendo seres humanos preconizados na Resolução 466/12 CNS.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

DIAMANTINA, 11 de Fevereiro de 2014

Assinador por:

Thais Peixoto Gaiad Machado
(Coordenador)