



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA



MARY STEFANY ANDRADE CARVALHO

**EFEITO DOS MEIOS DE ARMAZENAMENTO NA
COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA DENTINA
HUMANA**

UBERLÂNDIA

2019

MARY STEFANY ANDRADE CARVALHO

**EFEITO DOS MEIOS DE ARMAZENAMENTO NA
COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA DENTINA
HUMANA.**

Trabalho de conclusão de curso apresentado
a Faculdade de Odontologia da UFU, como
requisito parcial para obtenção do título de
Graduado em Odontologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Veridiana Resende
Novais Simamoto.

Coorientador: Ms. Rafael Resende de
Miranda.

UBERLÂNDIA

2019

AGRADECIMENTOS

À Deus, por cuidar de mim com tanto carinho, obrigada pelo seu amor misericordioso e infinito, pelas pessoas que colocou em meu caminho e por sempre lembrar-me que estás sempre ao meu lado.

À Nossa Senhora, minha mãe, que passou a frente de todos os meus projetos, minhas decisões sempre intercendendo junto ao Pai pela minha vida.

Aos meus pais, Nice e José, muito obrigada pelo amor incondicional, pelos sacrifícios que tiveram que fazer por mim, sou muito grata. Vocês são o meu exemplo, a minha força, o meu porto seguro. Agradeço também aos meus irmãos Diego e André pelo apoio e por estarem ao meu lado em todos os momentos.

À minha avó Selvina, ao meu avô Belarmino, obrigada pelo apoio, pelas preocupações e por todo carinho, agradeço também à minha avó Rosa, pois sei que de onde ela estiver, está sempre rezando por mim. Agradeço também à toda a minha família, por realizarem esse sonho junto comigo.

À tia Nádia e ao tio Kesley, obrigada por terem aceitado o papel de serem os meus pais aqui em Uberlândia, agradeço pelos ensinamentos, exortações e por todo o amor que têm por mim e serei eternamente grata ao Padre Junio, um anjo que Deus colocou em minha vida para iluminar os meus passos aqui na terra.

À professora Veridiana Resende, obrigada por ter me dado a honra de ser sua orientada, agradeço a Deus pela sua vida e por Ele ter proporcionado o nosso encontro, você é um exemplo de profissional para mim, lembro da nossa primeira aula com você, naquele momento a semente da docência foi plantada em meu coração, muito obrigada. Agradeço imensamente ao Ms. Rafael Resende, a Renata Borges e a Laura Quagliato pelo apoio durante todo o trabalho realizado.

Ao grupo PET Odontologia, o qual fez parte da minha graduação durante 4 anos, obrigada à todos os alunos e professores que escreveram essa história com o grupo junto comigo, e agradeço principalmente ao professor Adriano Loyola, obrigada por nos fazer pensar além dos muros da Universidade e pelas conversas sobre a minha cidade Montes Claros, obrigada por todos os ensinamentos. Agradeço também às ligas de Odontologia Hospitalar e de Estomatologia.

Aos meus amigos de faculdade, Mírian, Tatiane, Jéssica, Rafael, Tatiana, Letícia, muito obrigada por tornarem esses 5 anos os melhores da minha vida, agradeço pelo companheirismo, pela amizade e principalmente pela paciência comigo. Obrigada a todos da 81ª turma de Odontologia da UFU.

Aos técnicos e todos os professores da Faculdade de Odontologia, eu cheguei até aqui graças a vocês. Muito obrigada, serei eternamente grata aos profissionais que influenciaram diretamente a minha vida.

Às minhas amigas de Montes Claros, que mesmo com a distância sempre se fizeram presente, Carol Novais, Mariana Paranhos e Anna Carolina. E aos meus eternos amigos do grupo de Jovens no Espírito Santo (Jes).

Aos meus amigos da Paróquia São Judas Tadeu, Luiz Gustavo, Gabriel, Lucas, João Paulo, Ezequiel, Vanessa, Marianny, Cecília, Julia e aos tios Jairson, Juliana, Fernanda e Raydersson. A todos integrantes do EJC São Judas, o meu muito obrigada.

Ao meu namorado, Arnaldo Buso Neto, agradeço a Deus por ter você em minha vida, Ele nos apresentou no momento certo, sou grata pela sua paciência, compreensão e principalmente pelo seu companheirismo. Muito Obrigada.

“A alegria não chega apenas no encontro do achado, mas faz parte do processo da busca. E ensinar e aprender não pode dar-se fora da procura, fora da boniteza e da alegria.”

Paulo Freire

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	07
RESUMO	08
ABSTRACT	09
INTRODUÇÃO E REFERENCIAL TEÓRICO	10
OBJETIVO	15
DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	15
MATERIAL E MÉTODOS	15
RESULTADOS	19
DISCUSSÃO	30
CONCLUSÃO	34
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AU	Água ultrapura
ATR	Reflexão total atenuada
C:M	Razão carbonato/mineral
CT	Controle
DC	Dentes congelados
DE	Água deionizada
DI	Água destilada
FTIR	Espectroscopia Infravermelha Transformada de Fourier
IR	Luz infravermelha
M:M	Razão mineral/matriz
SA	Saliva artificial
SS	Solução salina

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de diferentes meios de armazenamento de dentes para estudos in vitro na composição química da dentina. Setenta terceiros molares hígidos foram selecionados e divididos em 7 grupos de acordo com o tipo de armazenamento (n=10): Grupo CT, amostras preparadas e analisadas em menos de 24 horas da exodontia, não sendo armazenadas em nenhum meio; Grupo DI, amostras armazenadas em água destilada; Grupo DE, amostras armazenadas em água deionizada; Grupo AU, amostras armazenadas em água ultrapura; Grupo SS, amostras armazenadas em soro fisiológico; Grupo SA, amostras armazenadas em saliva artificial; Grupo DC, amostras congeladas a -20° C. Os dentes foram cortados e após 30 dias e 90 dias de armazenamento as amostras foram avaliadas utilizando Espectroscopia Infravermelha Transformada de Fourier (FTIR/ATR), por meio das razões: fosfato/amida I (M:M); carbonato/fosfato (C:M); e amida I/amida III. Os dados foram analisados com teste paramétrico One-way ANOVA, em seguida, submetidos ao teste de Dunnett ($\alpha=0,05$) e dentro de cada grupo experimental foi realizado um teste T-pareado para comparar os dois tempos de armazenamento. No FTIR, houve diferença significativa para as razões C:M, M:M e amida I/amida III em todas as amostras armazenadas e seus respectivos meios. Conclui-se que diferentes meios e tempos de armazenamento podem alterar as propriedades químicas da dentina, alterando suas porções orgânicas e inorgânicas.

Palavras-chaves: Dentina, FTIR, Propriedades Químicas.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of different teeth storage media for in vitro studies on dentin chemical composition. Seventy healthy third molars were selected and divided into 7 groups according to the type of storage (n= 10) : CT Group , samples prepared and analyzed within 24 hours of extraction , not being stored in any medium; DI group , samples stored in distilled water; DE group , samples stored in deionized water; AU Group, samples stored in ultrapure water; SS Group, samples stored in saline; SA Group , samples stored in artificial saliva; AD Group, frozen samples at - 20 C. The teeth were cut out and after 30 days and 90 days of storage the samples were analyzed using Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR / ATR) by means of reasons: phosphate / amide I (M : M) ; carbone / phosphate (C: M); and amide I / amide III. The data were analyzed with the One-way ANOVA parametric test , then submitted to Dunnett's test ($\alpha = 0.05$) and Within each experimental group, a paired T-test was performed to compare the two storage times. In the FTIR, there was a significant difference for the C: M, M: M ratios and the amide I / amide III in all samples stored in their respective media. It follows that different means and time storage of the can change the chemical properties of the dentin, changing their portions organics and inorganics .

Keywords: Dentin, FTIR, Chemical Properties.

1. INTRODUÇÃO E REFERENCIAL TEÓRICO

As pesquisas laboratoriais na área odontológica frequentemente utilizam como unidade amostral dentes humanos extraídos, com o intuito de prever o comportamento clínico de novos materiais e técnicas. O reaproveitamento desses dentes tem sido extensivamente divulgado por meio de publicações científicas, demonstrando a importância desses para o avanço técnico-científico da odontologia (Endo et al., 2017).

Situações laboratoriais que simulem as condições do meio bucal é um fator crucial para o correto desenvolvimento das pesquisas, buscando excelência e veracidade nos resultados encontrados. Entretanto, experimentos *in vitro* precisam estar atentos à conservação das características das estruturas dentárias, tendo um cuidado especial desde a coleta e armazenamento das amostras, até chegar aos testes experimentais propriamente ditos, objetivando resultados mais fidedignos e confiáveis (Aires et al., 2015).

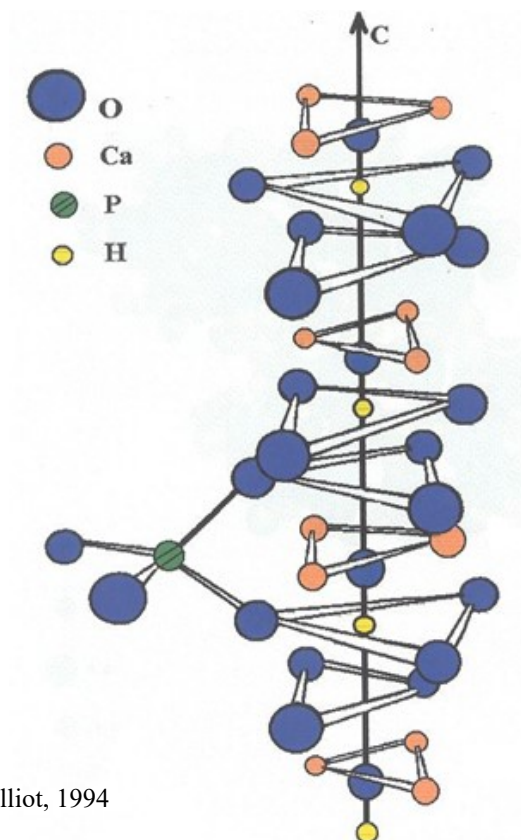
A composição química da estrutura dental apresenta uma influência direta nas suas propriedades e no seu desempenho clínico (Marshall et al., 1993). Diante disso, o estudo sobre a composição dos substratos dentários e os fatores que podem interferir neles é essencial para a realização de trabalhos *in vitro*. Anatomicamente, os dentes humanos apresentam dois tecidos duros, esmalte e dentina, sendo este último um tecido mineralizado, elástico, duro e avascular, que sustenta o esmalte e envolve a câmara pulpar central. Em maior escala, a dentina é composta por túbulos dentinários que tem várias funções incluindo a hidratação do dente, transdução de sinais físicos para respostas sensoriais e funcionando como uma âncora na ligação adesiva com os materiais dentários. Essa rede de canais se estende radialmente para fora da polpa em direção à junção amelodentinária e cemento. A densidade e o diâmetro dos túbulos são mais baixos na junção amelodentinária e aumentam com a proximidade da polpa (Arola et al., 2017).

Na coroa, a chamada dentina do manto, é uma camada externa menos mineralizada e, conseqüentemente, essa dentina pode ser adaptada para dissipar pressões ou forças que de outra forma induziriam fissuras no esmalte e destacamento do esmalte fragmentado da junção amelodentinária. A dentina

circumpulpar forma a maior parte da camada de dentina, onde é formada pela dentina intertubular (entre os túbulos dentinários), enquanto a dentina peritubular é encontrada ao redor do lúmen dos túbulos (Goldberg et al., 2011).

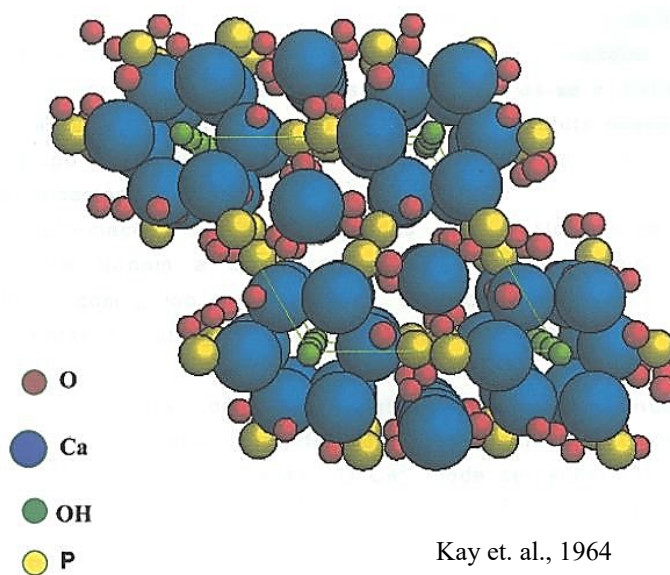
Microscopicamente, a dentina é constituída por aproximadamente 70% de mineral, 20% de matriz orgânica e 10% de água em peso e corresponde respectivamente a 45%, 33% e 22% em volume (Nanci, 2003). A parte orgânica contém cerca de 90% de proteínas fibrosas (principalmente colágeno do tipo I) e o restante lipídeos e proteínas não colagênicas da matriz (Xu e Wang, 2012). Já a fase mineral compõe-se principalmente em fosfato de cálcio na forma de cristais de hidroxiapatita (HA) ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) e o teor de cálcio e fósforo varia de 34 a 39% e 16 a 18% em peso, respectivamente (Kang et al., 2004).

Na estrutura da hidroxiapatita os átomos de cálcio e fósforo formam um arranjo hexagonal no plano perpendicular ao eixo cristalino (eixo c, figura 1). Colunas constituídas pelo empilhamento de triângulos equiláteros de íons óxidos (O^{2-}) e de íons cálcio (Ca^{2+}) estão ligados entre si por íons fosfato (Elliot, 1994). Os átomos de oxigênio dos íons hidroxila estão situados a 0.9 Å abaixo do plano formado pelos triângulos de cálcio e a ligação O-H forma um ângulo de aproximadamente 30° com a direção C (figura 2). Dos quatro átomos de oxigênio que constituem os grupos fosfatos, dois estão situados em planos perpendiculares à direção C e os outros dois são paralelos a esta direção (Kay et al., 1964).



Elliot, 1994

Fig. 1. Estrutura da Hidroxiapatita ao longo do eixo C.



Kay et. al., 1964

Fig. 2. Estrutura da Hidroxiapatita – célula unitária.

A dentina apresenta os cristais de hidroxiapatita dispostos de maneira orientada, com seu longo eixo paralelo ao eixo da fibrila da proteína predominante da matriz, o colágeno. Estão na forma de placas achatadas com dimensões aproximadas de 60 a 70 nm de comprimento, 20 a 30 nm de largura e 3 a 4 nm de espessura. A orientação, o tamanho e o local de formação desses cristais são regulados por componentes da matriz extracelular (Teruel et al., 2015).

Na estrutura apatítica frequentemente ocorrem substituições iônicas, que é quando um íon é substituído por outro do mesmo sinal, mas de carga diferente (Elliot, 1994). Substituições acopladas de íons carbonato, por exemplo, são de extrema importância porque a natureza mineral da dentina consiste principalmente de hidroxiapatita carbonatada (CHAp), contendo 4-6% em peso de carbonato (Sonju e Ruyter, 1997; Xu e Wang, 2012). O íon carbonato sob diferentes condições pode ocupar dois locais diferentes da hidroxiapatita, pois pode substituir os grupos hidroxila (OH) originando hidroxiapatita carbonatada tipo A e pode substituir o sítio fosfato (PO_4^{3-}) formando hidroxiapatita carbonatada tipo B. Tais ocupações ocorrem numa razão de 10:1 e essa substituição iônica pode afetar a solubilidade da dentina (Rohanizadeh et al., 1999), ou seja, os grupos carbonatos não alteram a cristalinidade da hidroxiapatita em si, mas podem acelerar os processos de dissolução da estrutura, que são verificados em cáries dentárias e processos de reabsorção óssea.

Além do carbonato, a estrutura da hidroxiapatita permite que vários outros íons sejam incorporados em seus centros catiônicos (Ca^{2+}) e aniônicos (OH, PO_4^{3-}) com grande facilidade (Sonju e Ruyter, 1997). Por exemplo, sódio (Na^+), potássio (K^+) e magnésio (Mg^{2+}) podem substituir o sítio de cálcio (Ca^{2+}), fluoreto (F^-) e cloreto (Cl^-) por sua vez e serem encontrados na posição hidroxila dando origem à fluorapatita e cloroapatita, respectivamente. Essas substituições determinam diferentes comportamentos físico-químicos e biológicos da estrutura, pois podem alterar os parâmetros de rede, cristalinidade, textura superficial, dimensões dos cristais, solubilidade e estabilidade da estrutura da hidroxiapatita (Kay et al., 1964).

As substituições podem causar interferência no arranjo da estrutura química da dentina devido a alguns fatores determinantes, como o método de

armazenamento, o tempo e o tipo de substância utilizada para estocagem de dentes em estudos experimentais *in vitro* (Aquilino et al., 1987; Sultana et al., 2006; Santana et al., 2008). Assim, sempre que se trabalha com tecidos dentais é importante que eles sejam submetidos a métodos de desinfecção e armazenados em meios adequados para manter, o máximo possível, a condição normal de seus substratos (Goodis et al., 1993; Silva et al., 2006; Humel et al., 2007).

Pesquisas *in vitro* têm utilizado uma grande variedade de meios para o armazenamento de dentes humanos extraídos, tais como: água destilada, água deionizada (com ou sem agentes antibacterianos acrescidos), álcool, azida sódica, cloramina T, formol, glutaraldeído, hipoclorito de sódio, saliva artificial, soro fisiológico e timol (Goodis et al., 1991; Straw et al., 1996; Secilmis et al., 2013; Kantoor et al., 2015; Montagner et al., 2015; Takamizawa et al., 2015; Nik et al., 2017; Curylofo-Zotti et al., 2018). Devido à composição química, alguns desses produtos podem interagir com os compostos químicos dos tecidos dentais, alterando características e propriedades intrínsecas (Kantoor et al., 2015).

Além do meio de armazenamento, o tempo em que as amostras são armazenadas também é fundamental para a execução dos experimentos. Habelitz et al. (2002) descobriram que após 1 semana as propriedades mecânicas do elemento dental caíram abaixo de 50% de seus valores iniciais, atribuindo isto a um processo de desmineralização durante o armazenamento. Aydin et al. (2015) investigaram a microdureza de amostras armazenadas por 2 e 12 meses, sendo que as amostras analisadas após 12 meses demonstraram uma diminuição significativa da microdureza do esmalte e da dentina.

Porém, ainda não há na literatura uma padronização do melhor meio de armazenamento para ser utilizado após a extração do elemento dental (Goodis et al., 1993; Straw et al., 1996; Sultana et al., 2006; Humel et al., 2007). Assim, efeitos mais aprofundados desses vários meios de armazenamento e do tempo de estocagem sobre a estrutura dentária não são totalmente esclarecidos. Portanto, faz-se necessário estudar qual meio de armazenamento menos altera a composição química dos tecidos dentais e, conseqüentemente, suas propriedades físico-

químicas. A hipótese desse estudo é que diferentes meios de armazenamento e tempos são capazes de alterar a composição química da dentina.

2. OBJETIVO

Avaliar o efeito de diferentes meios de armazenamento de dentes *in vitro* sobre a composição química da dentina humana em diferentes tempos.

3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

A) Unidade experimental: Blocos de dentina obtidos de terceiros molares humanos.

B) Fatores em estudo: Meios de armazenamento em 7 níveis (Grupo controle - não armazenado em nenhum meio; Grupo armazenado em água destilada; Grupo armazenado em água deionizada; Grupo armazenado em água ultrapura; Grupo armazenado em soro fisiológico; Grupo armazenado em saliva artificial e Grupo congelado a -20°C); e tempo de armazenamento em 2 níveis (1 e 3 meses).

C) Variável resposta: Composição química (amida I, fosfato, amida III, carbonato, razão fosfato/amida I, razão carbonato/fosfato e razão amida I/amida III).

D) Método de análise: Espectroscopia Infravermelha Transformada de Fourier (FTIR/ATR).

E) Métodos estatísticos: Os dados quantitativos foram analisados com teste paramétrico ANOVA One-way seguido de Dunnett ($\alpha=0,05$) e o teste T-pareado para comparar os dois tempos de armazenamento.

4. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Obtenção e preparo das amostras

Após a aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia (parecer número 3.610.734), 70 terceiros molares humanos não cariados foram coletados. Os dentes foram obtidos nas clínicas de cirurgia da Faculdade de Odontologia da UFU. Todos os dentes possuíam indicação clínica de exodontia e foram utilizados na pesquisa após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido pelos pacientes. Após a coleta, os dentes foram

limpos com curetas periodontais para remoção de cálculos e restos orgânicos e foi realizada a profilaxia com pedra-pomes (SS White, RJ, Brasil) e água destilada com o auxílio de escova tipo Robson (KG Sorensen, SP, Brasil) montada em micromotor. Em seguida, os dentes foram examinados usando um microscópio estereoscópico (Leica MS5; Leica Microscopy Systems Ltd, Heerbrugg, Suíça) para verificar ausência de cáries e outros defeitos estruturais. Assim, os dentes foram divididos aleatoriamente em 7 grupos (n=10), de acordo com o meio de armazenamento: CT - controle (não armazenado em nenhum meio); DI - água destilada; DE - água deionizada; AU - água ultrapura; SS - solução salina; SA - saliva artificial; e DC - dentes congelados a -20° C.

Depois da coleta e limpeza, os dentes foram cortados usando disco diamantado de dupla face (Isomet, diamante 15HC; Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, EUA) montado em cortadeira de precisão (Isomet 1000; Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, EUA) sob refrigeração. Foram realizados três cortes perpendiculares ao longo do eixo de cada dente: 1º - na junção cimento-esmalte, separando a coroa da raiz; 2º - 2mm em direção à coroa; 3º - 4mm na mesma direção para remoção do terço oclusal. A fatia do terço médio foi usada para análise e o esmalte foi removido na cortadeira para obter apenas amostras de dentina. Em seguida, todas as fatias foram seccionadas longitudinalmente nas direções mésio-distal e vestibulo-lingual, resultando em quatro hemissecções. As amostras foram armazenadas em tubos tipo eppendorf em geladeira. No grupo controle, as amostras foram cortadas e analisadas imediatamente após a extração dentária, não sendo armazenadas em nenhum meio. Nos grupos testes, as hemissecções vestibulares mesiais foram analisadas após 1 mês de armazenamento e as hemissecções vestibulares distais após 3 meses (figura 3). A solução utilizada como meio de armazenamento foi trocada semanalmente, exceto para o grupo de dentes congelados.

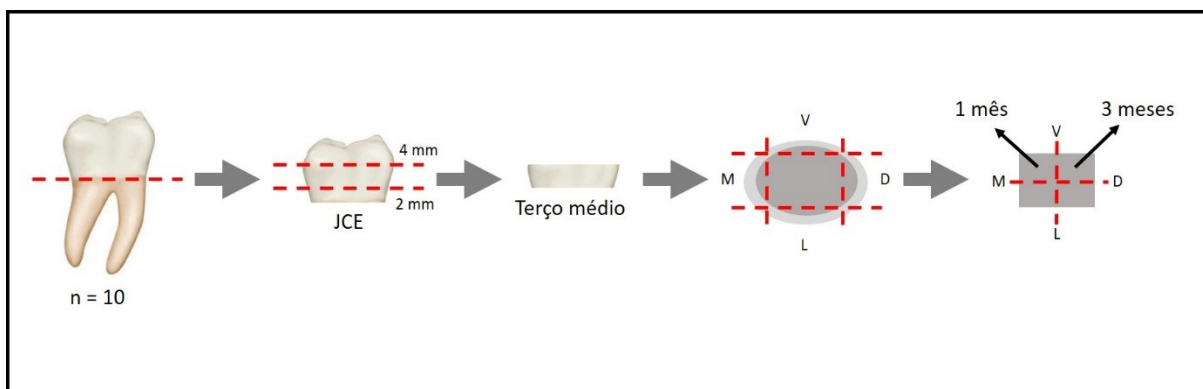


Fig. 3. Desenho esquemático do preparo das amostras.

5.2. Espectroscopia Infravermelha Transformada de Fourier (FTIR /ATR)

A composição química das amostras foi avaliada usando a técnica de reflexão total atenuada no Espectrômetro Infravermelho com Transformada de Fourier (ATR/FTIR; Vertex 70, Bruker, Ettlingen, Alemanha) (figura 4). As amostras foram removidas do meio de armazenamento e secas com papel absorvente. Em seguida, a superfície testada foi posicionada em contato com o cristal de diamante da unidade ATR e uma pressão constante foi aplicada para facilitar a leitura (figura 5). O espectro final de cada amostra foi obtido a partir de um escaneamento de 32 vezes no intervalo de 400 a 4000 cm^{-1} , em uma resolução de 4 cm^{-1} . Os espectros obtidos foram analisados com o software OPUS 6,5 (Bruker, Ettlingen, Alemanha).

Após correção da linha de base e normalização, foram calculadas as áreas integradas de bandas relativas ao conteúdo orgânico e inorgânico da dentina. As bandas avaliadas foram: amida I ($\text{C}=\text{O}$ que se estende a 1655 cm^{-1}), amida III (alongamento $\text{C}-\text{N}$ a 1235 cm^{-1}), carbonato ν_2 (872 cm^{-1}) e fosfato ν_1 , modo de alongamento ν_1 , ν_3 (960 cm^{-1} e 1040 cm^{-1}). Em seguida, os seguintes parâmetros químicos foram analisados: (1) Razão mineral/matriz (M:M), dada pela razão entre as bandas em 1035 e 1655 cm^{-1} , atribuídas à vibração do íon fosfato e ao alongamento $\text{C}=\text{O}$ da amida I, respectivamente; (2) Razão carbonato/mineral (C:M), dada pela relação das áreas integradas do carbonato a 872 cm^{-1} para o fosfato a 1035 cm^{-1} ; (3) Razão amida I/amida III, indicada pela relação das áreas integradas da amida I a 1655 cm^{-1} para a amida III a 1235 cm^{-1} (Liu et al., 2014; Toledano et al., 2015; Miranda et al., 2019).



Fig. 4. ATR / FTIR; Vertex 70, Bruker, Ettlingen, Alemanha.

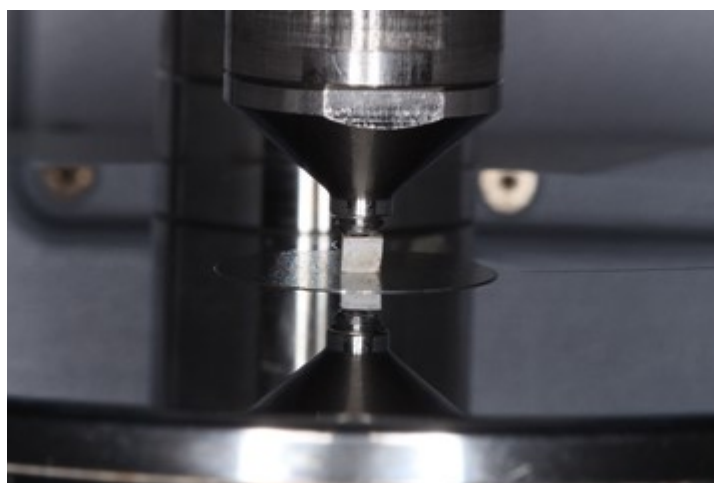


Fig. 5. Amostra posicionada sobre o cristal de diamante.

5.3. Análise estatística

Os dados foram testados quanto à distribuição normal (Shapiro-Wilk) e igualdade de variância (teste de Levene). Após isso, cada parâmetro químico foi submetido à análise de variância de fator único (ANOVA One-way), seguido pelo teste de Dunnett. Além disso, dentro de cada grupo experimental foi realizado um teste T-pareado para comparar os dois tempos de armazenamento. O software estatístico Sigma Plot (versão 12.0, Systat Software, Inc., San Jose, CA, EUA) foi

utilizado para análise e um valor de p menor que 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

5. RESULTADOS

A tabela 1 apresenta a média das áreas integradas de cada componente químico avaliado individualmente no FTIR/ATR. Para a amida I, os grupos SA (1mês), SA (3 meses), AU (3 meses) e DC (3 meses) apresentaram diferença em relação ao grupo CT. Para o fosfato, os grupos AU (1 mês), DE (3 meses), SA (3 meses) e AU (3 meses) diferiram do CT. Para a amida III, os grupos DI (1 mês) e AU (3 meses) foram diferentes do CT. Já para o carbonato, os grupos DE (1 mês), AU (1 mês), DI (3 meses), SS (3 meses), DE (3 meses), SA (3 meses) e DC (3 meses) apresentaram diferença em relação ao CT.

Tabela 1 – Média e desvio-padrão (DP) das áreas integradas de cada componente químico avaliado individualmente no FTIR/ATR.

	Amida I	Fosfato	Amida III	Carbonato
CT	2,17 (0,17)	11,66 (1,74)	0,30 (0,11)	1,80 (0,12)
DI (1 mês)	2,03 (0,16)	10,72 (2,46)	0,14 (0,02)*	1,66 (0,21)
SS (1 mês)	2,13 (0,29)	11,47 (2,69)	0,20 (0,09)	1,60 (0,21)
DE (1 mês)	2,18 (0,29)	13,39 (0,76)	0,28 (0,10)	1,68 (0,18)*
SA (1 mês)	1,52 (0,29)*	10,21 (2,44)	0,27 (0,19)	1,27 (0,39)
AU (1 mês)	2,46 (0,44)	7,09 (1,59)*	0,34 (0,08)	1,02 (0,21)*
DC (1 mês)	2,06 (0,25)	12,43 (1,38)	0,37 (0,16)	1,78 (0,13)
DI (3 meses)	1,93 (0,38)	11,84 (1,71)	0,29 (0,06)	1,42 (0,27)*
SS (3 meses)	2,01 (0,30)	12,12 (0,77)	0,25 (0,05)	1,39 (0,16)*
DE (3 meses)	1,80 (0,40)	13,63 (0,33)*	0,42 (0,19)	1,33 (0,30)*
SA (3 meses)	1,56 (0,27)*	15,02 (0,39)*	0,30 (0,11)	1,39 (0,25)*
AU (3 meses)	3,42 (0,77)*	14,97 (0,40)*	0,69 (0,15)*	1,50 (0,13)
DC (3 meses)	1,12 (0,15)*	13,41 (0,29)	0,29 (0,06)	1,23 (0,11)*

* Indica diferença significativa do grupo experimental em relação ao controle.

Em relação as razões analisadas, os grupos AU (1 mês), DE (3 meses), SA (3 meses) e DC (3 meses) tiveram valores da razão M:M diferentes do grupo CT. Para a razão C:M, os grupos DE (1 mês), SA (1 mês), DI (3 meses), SS (3 meses), DE (3 meses), SA (3 meses), AU (3 meses) e DC (3 meses) diferiram estatisticamente do CT. Já para a razão amida I/amida III, os grupos DI (1 mês), SS (1 mês), DE (3 meses), AU (3 meses) e DC (3 meses) apresentaram diferenças quando comparados ao CT (tabela 2).

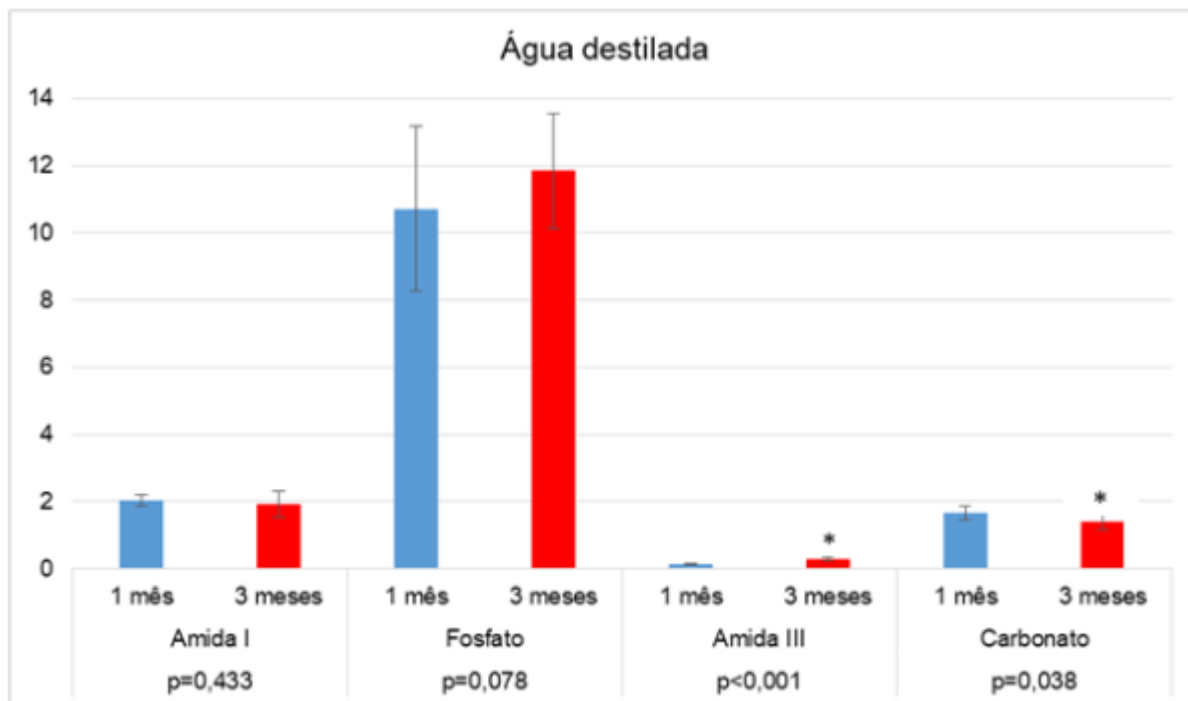
Tabela 2 – Média e desvio-padrão (DP) das razões Fosfato/Amida I (M:M), Carbonato/Fosfato (C:M) e Amida I/Amida III analisadas no FTIR/ATR.

	M:M	C:M	Amida I/Amida III
CT	5,41 (0,94)	0,16 (0,02)	8,58 (3,96)
DI (1 mês)	5,29 (1,25)	0,16 (0,03)	14,93 (2,53)*
SS (1 mês)	5,36 (0,97)	0,14 (0,02)	12,63 (3,78)*
DE (1 mês)	6,29 (1,41)	0,13 (0,02)*	8,78 (3,05)
SA (1 mês)	6,78 (1,62)	0,12 (0,02)*	7,16 (2,60)
AU (1 mês)	2,93 (0,66)*	0,15 (0,01)	7,69 (1,75)
DC (1 mês)	6,18 (1,34)	0,15 (0,02)	7,58 (5,67)
DI (3 meses)	6,38 (1,84)	0,12 (0,03)*	7,04 (2,16)
SS (3 meses)	6,16 (1,06)	0,12 (0,02)*	8,28 (2,15)
DE (3 meses)	7,89 (1,70)*	0,10 (0,02)*	5,01 (2,32)*
SA (3 meses)	9,85 (1,51)*	0,09 (0,01)*	5,75 (1,66)
AU (3 meses)	4,68 (1,51)	0,10 (0,01)*	4,98 (0,68)*
DC (3 meses)	12,21 (1,64)*	0,09 (0,01)*	3,46 (1,08)*

* Indica diferença significativa do grupo experimental em relação ao controle.

Com relação ao armazenamento em água destilada, o grupo avaliado após 3 meses apresentou valores estatisticamente diferentes para amida III e carbonato em relação ao grupo avaliado com 1 mês ($p < 0,001$ e $p = 0,038$, respectivamente), conforme pode ser observado no gráfico 1.

Gráfico 1 – Média e desvio-padrão das áreas integradas de cada componente químico analisado nos grupos armazenados em água destilada.



* Indica diferença significativa do grupo experimental em relação ao controle.

Ainda em relação ao armazenamento em água destilada, o grupo avaliado após 3 meses apresentou valores estatisticamente diferentes para as razões C:M e Amida I/Amida III quando comparado ao grupo avaliado com 1 mês (p=0,017 e p<0,001, respectivamente), como pode ser visto na tabela 3.

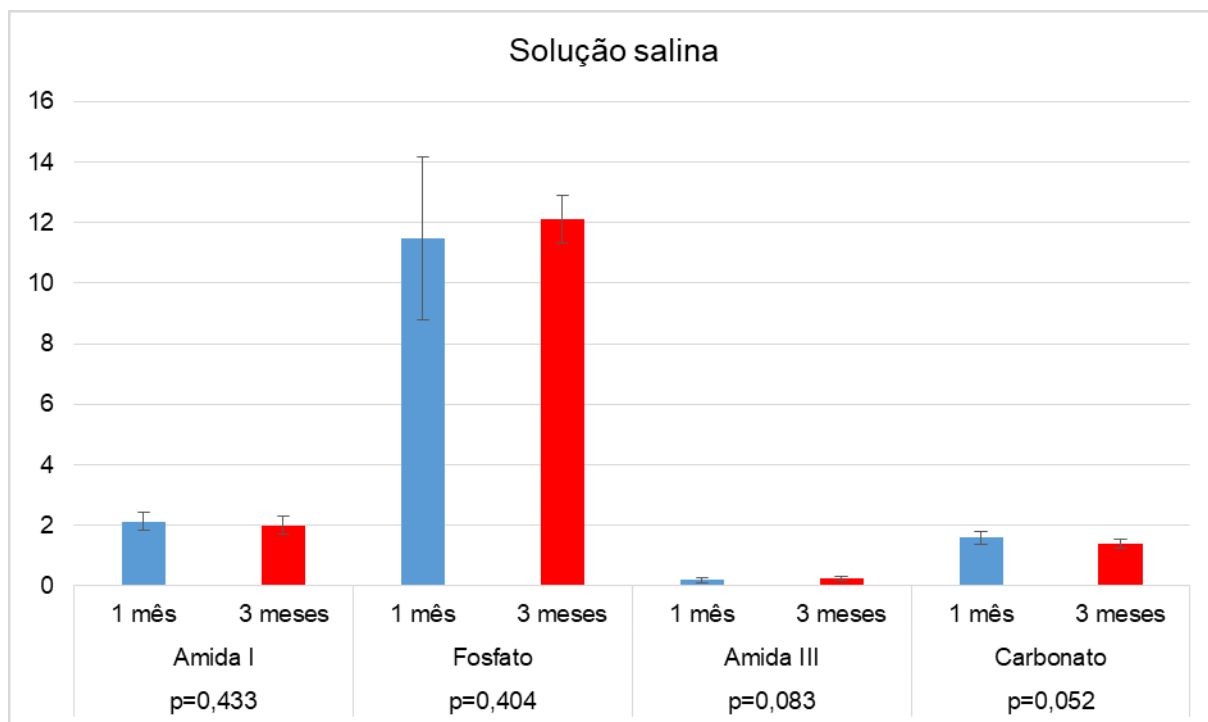
Tabela 3 – Média e desvio-padrão (DP) das razões Fosfato/Amida I (M:M), Carbonato/Fosfato (C:M) e Amida I/Amida III analisadas nos grupos armazenados em água destilada.

Água destilada	M:M		C:M		Amida I/Amida III	
	1 mês	3 meses	1 mês	3 meses	1 mês	3 meses
	5,29 (1,25)	6,28 (1,84)	0,16 (0,03)	0,12 (0,03)*	14,93 (2,53)	7,04 (2,16)*
	p=0,201		p=0,017		p<0,001	

* Indica diferença significativa entre os grupos.

Já os grupos armazenados em solução salina não apresentaram diferenças nos componentes químicos isolados na comparação de 1 e 3 meses, como pode ser observado no gráfico 2 abaixo.

Gráfico 2 – Média e desvio-padrão das áreas integradas de cada componente químico analisado nos grupos armazenados em solução salina.



* Indica diferença significativa do grupo experimental em relação ao controle.

Entretanto, ao se analisar as razões, o grupo armazenado 3 meses em solução salina apresentou valores estatisticamente diferentes para as razões C:M e

Amida I/Amida III quando comparado ao grupo armazenado 1 mês ($p=0,014$ e $p=0,011$, respectivamente), como pode ser visto na tabela 4.

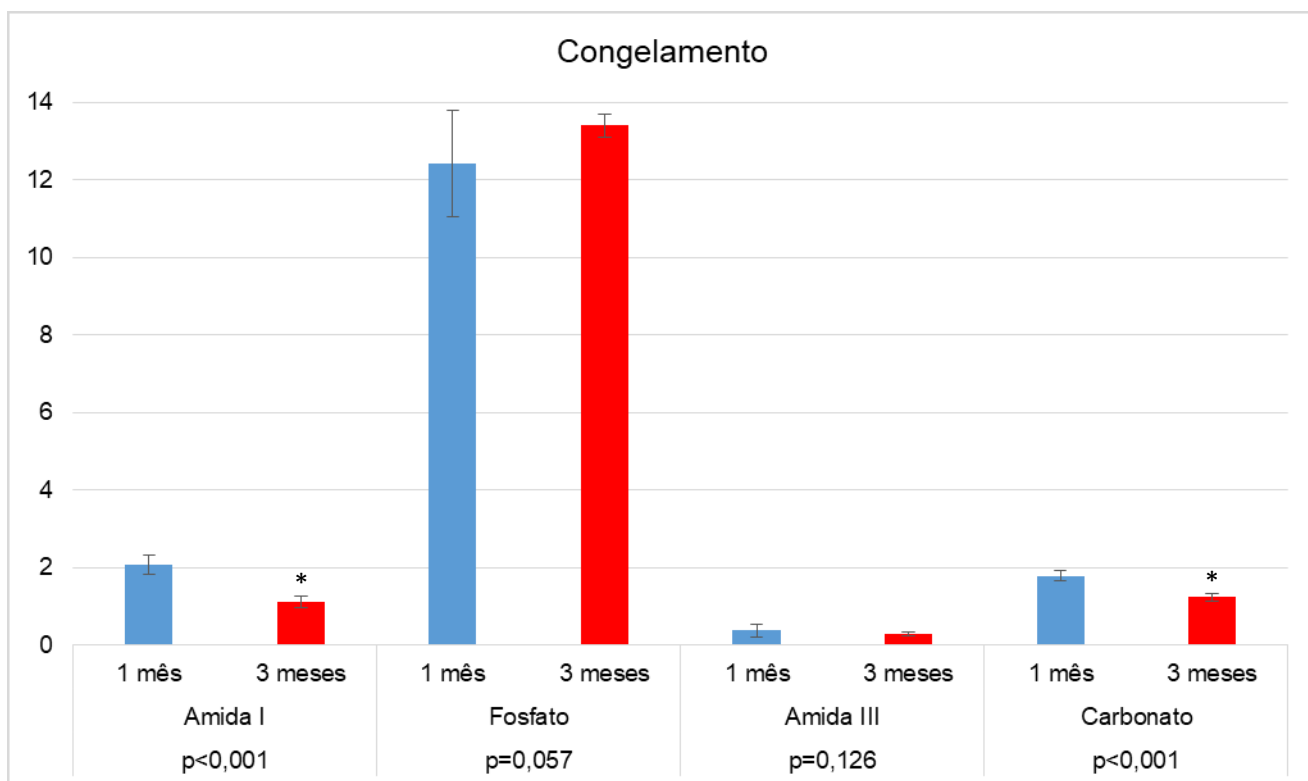
Tabela 4 – Média e desvio-padrão (DP) das razões Fosfato/Amida I (M:M), Carbonato/Fosfato (C:M) e Amida I/Amida III analisadas nos grupos armazenados em solução salina.

Solução salina	M:M		C:M		Amida I/Amida III	
	1 mês	3 meses	1 mês	3 meses	1 mês	3 meses
	5,36 (0,97)	6,16 (1,06)	0,14 (0,02)	0,12 (0,02)*	12,63 (3,78)	8,28 (2,15)*
	p=0,056		p=0,014		p=0,011	

* Indica diferença significativa entre os grupos.

Em relação aos grupos congelados, o grupo avaliado após 3 meses apresentou valores estatisticamente diferentes para amida I e carbonato em relação ao grupo avaliado com 1 mês ($p<0,001$ para ambos), como pode ser observado no gráfico 3.

Gráfico 3 – Média e desvio-padrão das áreas integradas de cada componente químico analisado nos grupos congelados.



* Indica diferença significativa do grupo experimental em relação ao controle.

Ainda em relação aos grupos congelados, o grupo avaliado após 3 meses apresentou valores estatisticamente diferentes para as razões M:M e C:M quando comparado ao grupo avaliado com 1 mês ($p<0,001$ para ambas), como pode ser visto na tabela 5.

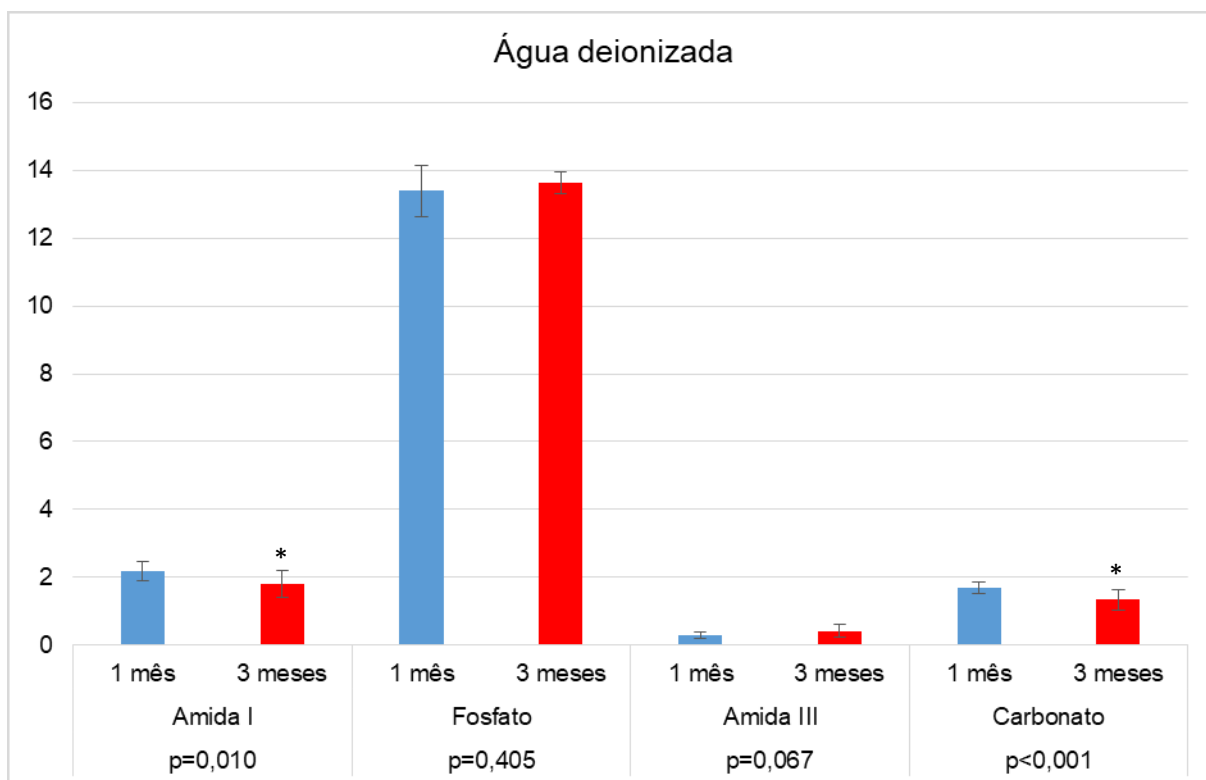
Tabela 5 – Média e desvio-padrão (DP) das razões Fosfato/Amida I (M:M), Carbonato/Fosfato (C:M) e Amida I/Amida III analisadas nos grupos congelados.

Dentes congelados	M:M		C:M		Amida I/Amida III	
	1 mês	3 meses	1 mês	3 meses	1 mês	3 meses
	6,18 (1,34)	12,21 (1,64)*	0,15 (0,02)	0,09 (0,01)*	7,58 (5,67)	3,96 (1,08)
	p<0,001		p<0,001		p=0,061	

* Indica diferença significativa entre os grupos.

Com relação ao armazenamento em água deionizada, o grupo avaliado após 3 meses apresentou valores estatisticamente diferentes para amida I e carbonato em relação ao grupo avaliado com 1 mês ($p=0,010$ e $p<0,001$, respectivamente), conforme pode ser observado no gráfico 4.

Gráfico 4 – Média e desvio-padrão das áreas integradas de cada componente químico analisado nos grupos armazenados em água deionizada.



* Indica diferença significativa do grupo experimental em relação ao controle.

Da mesma forma, o grupo armazenado 3 meses em água deionizada apresentou valores estatisticamente diferentes para todas as razões analisadas quando comparado ao grupo armazenado 1 mês (M:M $p=0,004$; C:M $p<0,001$; Amida I/Amida III $p=0,006$), como pode ser visto na tabela 6.

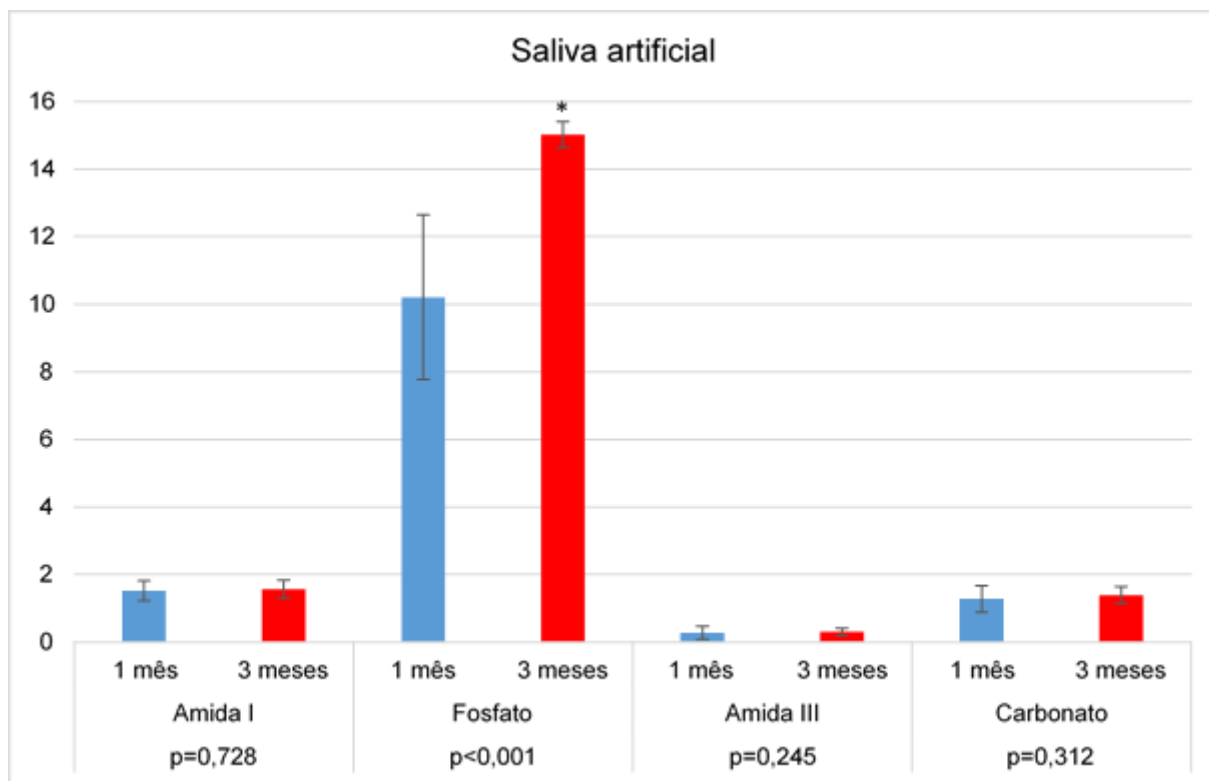
Tabela 6 – Média e desvio-padrão (DP) das razões Fosfato/Amida I (M:M), Carbonato/Fosfato (C:M) e Amida I/Amida III analisadas nos grupos armazenados em água deionizada.

	M:M		C:M		Amida I/Amida III	
	1 mês	3 meses	1 mês	3 meses	1 mês	3 meses
Água deionizada	6,29	7,89	0,13	0,10	8,78	5,01
	(1,41)	(1,70)*	(0,02)	(0,02)*	(3,05)	(2,32)*
	$p=0,004$		$p<0,001$		$p=0,006$	

* Indica diferença significativa entre os grupos.

Já para o armazenamento em saliva artificial, o grupo avaliado após 3 meses apresentou valores estatisticamente diferentes somente para o componente químico fosfato quando comparado ao grupo avaliado com 1 mês ($p<0,001$), como pode ser observado no gráfico 5.

Gráfico 5 – Média e desvio-padrão das áreas integradas de cada componente químico analisado nos grupos armazenados em saliva artificial.



* Indica diferença significativa do grupo experimental em relação ao controle.

Analisando-se as razões, o grupo avaliado após 3 meses de armazenamento em saliva artificial apresentou valores estatisticamente diferentes para as razões M:M e C:M quando comparado ao grupo avaliado após 1 mês ($p=0,002$ e $p<0,001$, respectivamente), como pode ser visto na tabela 7.

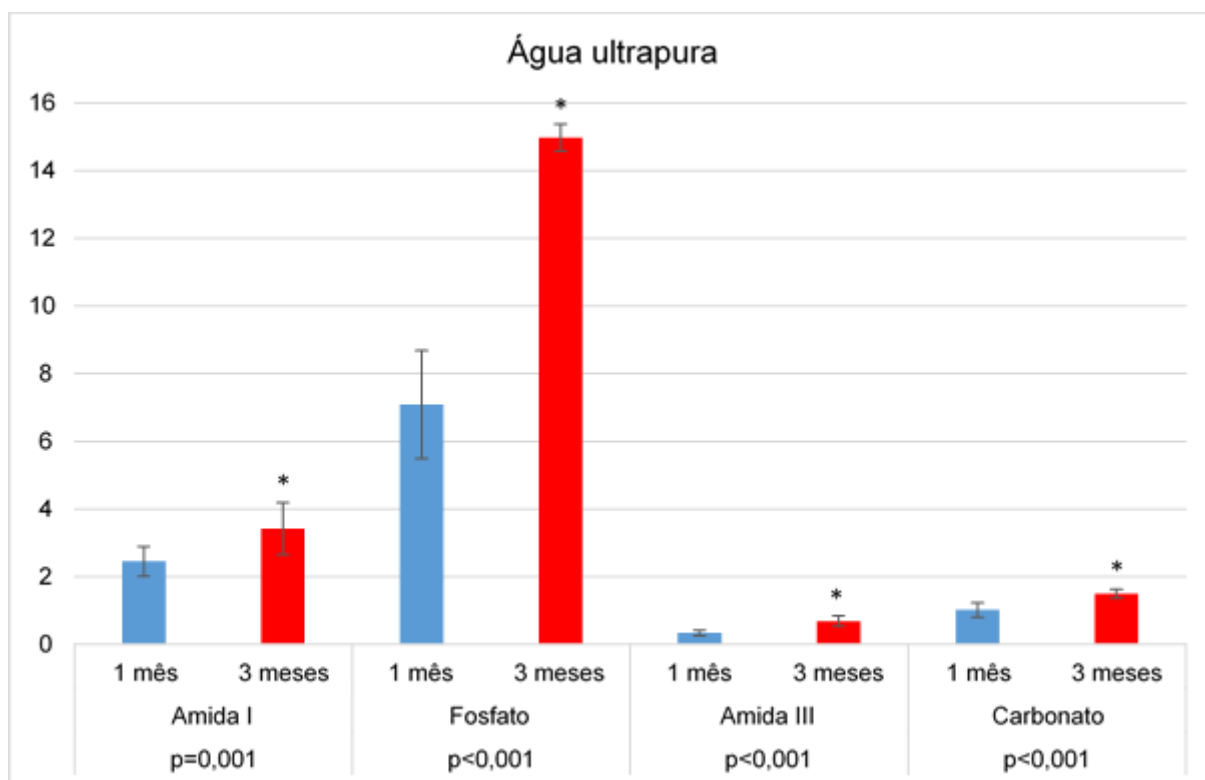
Tabela 7 – Média e desvio-padrão (DP) das razões Fosfato/Amida I (M:M), Carbonato/Fosfato (C:M) e Amida I/Amida III analisadas nos grupos armazenados em saliva artificial.

Saliva artificial	M:M		C:M		Amida I/Amida III	
	1 mês	3 meses	1 mês	3 meses	1 mês	3 meses
	6,78 (1,62) p=0,002	9,85 (1,51)*	0,12 0,02 p<0,001	0,09 (0,01)*	7,16 (2,60) p=0,105	5,75 (1,66)

* Indica diferença significativa entre os grupos.

Com relação ao armazenamento em água ultrapura, o grupo avaliado após 3 meses apresentou valores estatisticamente diferentes para todos os componentes químicos analisados (amida I, $p=0,001$; fosfato $p<0,001$; amida III $p<0,001$; carbonato $p<0,001$) em relação ao grupo avaliado com 1 mês, conforme pode ser observado no gráfico 6.

Gráfico 6 – Média e desvio-padrão das áreas integradas de cada componente químico analisado nos grupos armazenados em água ultrapura.



* Indica diferença significativa do grupo experimental em relação ao controle.

Da mesma forma, o grupo armazenado 3 meses em água ultrapura apresentou valores estatisticamente diferentes para todas as razões analisadas quando comparado ao grupo armazenado 1 mês (M:M $p=0,004$; C:M $p<0,001$; Amida I/Amida III $p<0,001$), como pode ser visto na tabela 8.

Tabela 8 – Média e desvio-padrão (DP) das razões Fosfato/Amida I (M:M), Carbonato/Fosfato (C:M) e Amida I/Amida III analisadas nos grupos armazenados em água ultrapura.

	M:M		C:M		Amida I/Amida III	
	1 mês	3 meses	1 mês	3 meses	1 mês	3 meses
Água ultrapura	2,93	4,68	0,15	0,10	7,69	4,98
	(0,66)	(1,51)*	(0,01)	(0,01)*	(1,75)	(0,68)*
	$p=0,004$		$p<0,001$		$p<0,001$	

6. DISCUSSÃO

A hipótese do estudo foi aceita, diferentes meios e tempos de armazenamento alteraram a composição química da dentina, através de modificações na parte orgânica e inorgânica desse tecido. Isso se deve ao fato de que alguns meios de armazenamento podem interagir com os compostos químicos dos tecidos dentais, alterando suas características e propriedades intrínsecas (Kantoor et al., 2015).

A metodologia utilizada nessa pesquisa representa a medida do comprimento de onda e intensidade da absorção da luz infravermelha (IR) por uma amostra. A luz infravermelha é energética o suficiente para provocar vibrações moleculares em níveis mais altos de energia (Cui et al., 2012). Os estados excitados resultam em vibrações moleculares (isto é, alongamento, flexão, torção e oscilação fora do plano) ocorrendo em números de ondas variáveis (ou frequências) na região IR do espectro

da luz (Lopes et al., 2018). O número de ondas de cada pico de absorvância é determinado pelas propriedades físico-químicas intrínsecas da molécula correspondente. Em particular, o uso do FTIR no modo ATR atrai muita atenção devido à bem controlada profundidade de penetração e ao comprimento correspondente da luz infravermelha na amostra (Kasarian e Chan, 2013; Griffiths e Haseth, 2007). Além disso, uma das vantagens desse método é que ele é uma técnica não destrutiva, permitindo o uso da mesma amostra para diferentes avaliações (Zieba-Palus e Kunicki, 2006).

A falta de padronização dos métodos de armazenamento dos dentes utilizados em estudos *in vitro* é um tema relevante. Dependendo da solução de armazenamento, novos íons e componentes químicos podem ser incorporados às amostras (da Cunha et al., 2017). O conteúdo mineral da dentina consiste principalmente em cristais de hidroxiapatita formados por fosfato de cálcio ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) (Nanci, 2003). Sob diferentes soluções de armazenamento, por exemplo, o íon carbonato (CO_3) pode ocupar dois locais diferentes na estrutura de hidroxiapatita dos dentes: pode substituir grupos hidroxila OH (hidroxiapatita carbonatada tipo A) e fosfato (PO_4^{3-}) (hidroxiapatita carbonatada tipo B) (Sonju e Ruyter, 1997; Xu e Wang, 2012). Todos os grupos armazenados 3 meses apresentaram diferença para algum componente inorgânico (fosfato ou carbonato) em relação ao grupo controle, possivelmente devido à uma troca iônica entre o meio e a amostra. Essa substituição iônica pode afetar a cristalinidade e a solubilidade da dentina (Rohanizadeh et al., 1999; LeGeros, 1999). O meio de armazenamento água ultrapura, mesmo na avaliação de 1 mês, apresentou um menor valor de carbonato e fosfato em relação ao controle. Isso significa que menos CO_3 foi incorporado à estrutura mineral da dentina, o que pode ser explicado pelos conceitos de polaridade e solubilidade das soluções. Assim como o CO_3 , a água ultrapura também é uma solução altamente polar; então, essa interação dificulta a adsorção de CO_3 na hidroxiapatita, que ocorre mais facilmente em soluções menos polares, como as soluções de álcool (Lee e Lin, 1997). Além disso, a ausência total de íons na água ultrapura aumenta o potencial químico de dissolução do fosfato (Habelitz et al., 2002).

Em termos de variações da matriz orgânica, a região espectral das amidas I e III é adequada para o estudo de alterações estruturais em proteínas. A amida I é a principal banda de absorção de proteínas e é governada principalmente pelas vibrações de alongamento de C=O (70-85%) e C-N (10-20%) (Kirchner, 1997; Wang et al., 2002). A banda da amida III é detectada de forma reduzida, pois é uma banda muito complexa, dependente dos detalhes do campo de força, da natureza das cadeias laterais e da ligação de hidrogênio presentes em sua estrutura orgânica (Fang e Yang e Wu, 2002). Os valores alterados para amida I das amostras armazenadas em saliva artificial após 1 e 3 meses podem ser explicados devido ao efeito do tampão eletrolítico que gerou uma reorganização dos componentes químicos, alterando a estrutura do colágeno das amostras (Raum et al., 2007). Já as alterações detectadas nas amostras armazenadas em água ultrapura após 3 meses podem ser justificadas pelo forte processo de dissolução que ocorre nas soluções de íons livres (Goodis et al., 1991), levando a uma quebra das ligações químicas que alteram a organização estrutural do colágeno (Habelitz et al., 2002). Já para o grupo de amostras congeladas e avaliadas após 3 meses, os dados alterados podem ser porque, após a extração do dente, podem ocorrer alterações *post-mortem* que modificam o comportamento e as propriedades da dentina (Titley et al., 1998).

A partir desses resultados, foi possível calcular também razões que ilustram as relações entre componentes orgânicos e inorgânicos, trazendo mais informações sobre a estrutura do colágeno e da hidroxiapatita. A razão M:M diz respeito à quantidade de matriz orgânica em relação à inorgânica (Jiang et al., 2007), a análise desse fator demonstrou diferença significativa nas amostras armazenadas em água ultrapura 1 mês, água destilada 3 meses, saliva artificial 3 meses e dentes congelados 3 meses, dessa forma, é possível inferir que o meio de armazenamento teve efeito sobre a estrutura dos componentes inorgânicos e orgânicos da dentina (Kielbassa et al., 2000; Gonçalves et al., 2014). A razão C:M é importante porque mostra o conteúdo mineral de carbonato na hidroxiapatita (Toledano et al., 2015). Sendo assim, as amostras armazenadas em água deionizada 1 mês, saliva artificial 1 mês e todos os grupos armazenados 3 meses demonstraram diferença em relação ao controle, portanto infere-se que a hidroxiapatita tenha sofrido alteração em sua

estrutura, levando a uma provável mudança nas propriedades mecânicas da dentina, por exemplo (Kantoor et al., 2015).

Ao mesmo passo, a razão amida I/amida III representa a organização do colágeno no interior de uma amostra (Toledano et al., 2015). Assim, as amostras armazenadas em água destilada 1 mês, solução salina 1 mês, água deionizada 3 meses, água ultrapura 3 meses e congeladas 3 meses apresentaram valores alterados dessa razão, indicando uma desorganização das fibrilas colágenas. Assim, trabalhos que utilizem tais meios e tempos de armazenamento e estejam testando adesão de materiais à dentina podem ter seus resultados alterados e não fidedignos, já que o colágeno das amostras estará desorganizado, podendo implicar em uma adesão de menor qualidade (Breschi et al., 2018).

Analisando estritamente o fator tempo, alguns meios de armazenamento apresentaram alterações significativas nos seus componentes químicos após 3 meses, podendo implicar em diminuição de suas propriedades mecânicas e menor resistência à dissolução ácida, por exemplo. Dentre todos os meios de armazenamento analisados, a água ultrapura apresentou os valores mais alterados comparando-se 1 e 3 meses de armazenamento, provavelmente devido à ausência total de íons nesse tipo de água, já mencionada aqui anteriormente (Habelitz et al., 2002). Opostamente, as amostras armazenadas em solução salina foram as que se mantiveram mais estáveis com o decorrer do tempo, acredita-se que esse comportamento é justificado pelo fato de ser uma solução não tóxica, além de apresentar um pH balanceado (Moazami et al., 2011).

A ideia do grupo controle com análise imediata foi avaliar as propriedades da dentina assim que o dente era extraído da cavidade bucal. Essa situação seria considerada ideal em todos os estudos, porém na execução dos trabalhos laboratoriais torna-se inviável, visto que as etapas de coleta, seleção e preparo de amostras são difíceis de serem executadas em um curto intervalo de tempo. Com base nisso e nos resultados do presente trabalho, o grupo de dentes congelados após 1 mês foi o que mais se assemelhou da situação ideal quando os dentes são analisados imediatamente pós-exodontia, porém não apresentou os mesmos resultados após 3 meses de congelamento, o tempo é um fator importante que pode

levar à contaminação das amostras, e os túbulos são favoráveis nichos de sobrevivência microbiana (Taschieri et al., 2014). Os meios de armazenamento que menos alteraram a composição da dentina após 3 meses foram a água destilada e a solução salina, que alteraram somente o carbonato. Assim, é importante que novos estudos investiguem outros meios e tempos de armazenamento amplamente utilizados na literatura, avaliando também suas propriedades mecânicas, morfológicas e adesivas, na tentativa de estabelecer o meio de armazenamento ideal para amostras dentais em estudos *in vitro*.

7. CONCLUSÃO

Diferentes meios e tempos de armazenamento podem alterar as propriedades químicas da dentina, alterando suas porções orgânica e inorgânica. A água ultrapura mostrou-se como o pior meio de armazenamento para análises envolvendo composição química da dentina, independentemente do tempo. Na análise após 1 mês, o congelamento foi considerado o melhor meio de armazenamento de dentes, pois preservou de maneira satisfatória os parâmetros químicos da dentina. Ao mesmo passo, após 3 meses a água destilada e a solução salina foram as que menos alteraram os componentes químicos da dentina. Nenhum meio de armazenamento após 3 meses foi capaz de preservar a composição química da dentina igual ao do grupo controle.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aires, Caio Augusto Martins. Biossegurança em transporte de material biológico no âmbito nacional: um guia breve. **Revista Pan-amazônica de Saúde**, 2015; [s.l.], v. 6, n. 2, p.73-81, jun. Instituto Evandro Chagas. <http://dx.doi.org/10.5123/s2176-62232015000200010>.
2. Anchieta RBM, Machado LS, Martini AP, Santos PH, Giannini M, Janal M, Tovar N, Sundfeld RH, Rocha EP, Coelho PG. Effect of long-term storage on nanomechanical and morphological properties of dentin–adhesive interfaces. **Dental Materials**, 2015; [s.l.], v. 31, n. 2, p.141-153, fev. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dental.2014.11.010>.
3. Aquilino SA, Williams VD, Svare CW. the effect of storage solutions and mounting media on the bond strengths of a dentinal adhesive to dentin. **Dent Mater**, 1987; Jun,3 (3):131-4.
4. Arola D, Gao S, Zhang H, Masri R. The Tooth. **Dental Clinics Of North America**, 2017; [s.l.], v. 61, n. 4, p.651-668, out. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cden.2017.05.001>.
5. Aydin B, Pamir T, Baltaci A, Orman MN, Turk T. Effect of storage solutions on of crown enamel and dentin. **European Journal Of Dentistry**, 2015; [s.l.], v. 09, n. 02, p.262-266, abr. Georg Thieme Verlag KG. <http://dx.doi.org/10.4103/1305-7456.156848>.
6. Breschi L, Maravic T, Cunha SR, Comba A, Cadenaro M, Tjäderhane L, Pashley DH, Tay FR, Mazzoni A. Dentin bonding systems: From dentin collagen structure to bond preservation and clinical applications. **Dental Materials**, 2018; [s.l.], v. 34, n. 1, p.78-96, jan. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dental.2017.11.005>.
7. Curylofo-zotti FA, Lorencetti-Silva F, de Almeida Coelho J, Monteiro RM, Watanabe E, Corona SAM. Human teeth biobank: Microbiological analysis of the teeth storage solution. **Microscopy Research And Technique**, 2018; [s.l.], v. 81, n. 3, p.332-337, 17 jan. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jemt.22984>.

8. Cui Y, Fung KH, Xu J, Ma H, Jin Y, He S, Fang NX. Ultrabroadband light absorption by a sawtooth anisotropic metamaterial slab. **Nano Letters**. 2012; 12(3):1443–1447
9. da Cunha SR, Fonseca FP, Ramos PAMM, Haddad CMK, Fregnani ER, Aranha ACC. Effects of different radiation doses on the microhardness, superficial morphology, and mineral components of human enamel. **Archives of Oral Biology**, 2017; 80, 130-135.
10. de Miranda RR, Silva ACA, Dantas NO, Soares CJ, Novais VR. Chemical analysis of in vivo-irradiated dentine of head and neck cancer patients by ATR-FTIR and Raman spectroscopy. **Clinical Oral Investigation**. 2018.
11. Elliot JC. Structure and chemistry of the Apatites and other Calcium Orthophosphates. **Studies in inorganic chemistry**. 1994; v. 18, Elsevier Science B.V.
12. Endo, Marcos Sergio et al. A importância do banco de dentes humanos: relato de experiência. **Archives Of Health Investigation**, 2017;[s.l.], v. 6, n. 10, p.486-490, 31 out. Archives of Health Investigation. <http://dx.doi.org/10.21270/archi.v6i10.2234>.
13. Fang YZ, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants and nutrition. **Nutrition**, 2002; 18(10):872–879
14. Gao Yu, Zhao Sanjun, Wang Peihuan. Efeitos dos glicanos endógenos da dentina no armazenamento resistente à água e na capacidade de envelhecimento da interface de união resina-dentina [J]. **Chinese Journal of Stomatology**, 2017, 52 (08): 486-491. DOI: 10.3760 / cma.j.issn.1002-0098.2017.08.008
15. Goldberg M, Kulkarni AB, Young M, Boskey A. Dentina: estrutura, composição e mineralização. **Biosci dianteiro (Elite Ed)**. 2011; 3: 711–735. Publicado em 1 de janeiro de 2011.
16. Gonçalves LM, Palma-Dibb RG, Paula-Silva FW, Oliveira HF, Nelson-Filho P, Silva LA, Queiroz AM. Radiation therapy alters microhardness and microstructure of enamel and dentin of permanent human teeth. **J Dent**. 2014;42(8):986-92.

17. Goodis H, Marshall JR G, White J, Gee L, Hornberger B & Marshall S. Storage effects on dentin permeability and shear bond strengths. **Dental Materials Journal**, 1993; 9(2), 79-84.
18. Goodis HE, Marshall Jr GW, White JM. The effects of storage after extraction of the teeth on human dentine permeability in vitro. **Archives of Oral Biology**, 1991; 36 (8):561-6
19. Griffiths PR, de Haseth JA. **Fourier Transform Infrared Spectrometry**. 2007; 2nd ed. New York, NY, USA: John Wiley & Sons.
20. Habelitz, Stefan et al. Nanoindentation and storage of teeth. **Journal Of Biomechanics**, 2002; [s.l.], v. 35, n. 7, p.995-998, jul. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0021-9290\(02\)00039-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0021-9290(02)00039-8).
21. Honório HM, Wang L. Radiotherapy alters the composition, structural and mechanical properties of root dentin in vitro. **Clinical Oral Investigation**, 2018; 22(8):2871-2878.
22. Humel MM, Oliveira MT, Cavalli V, & Gianni M. Effect of storage and disinfection methods of extracted bovine teeth on bond strength to dentin. **Brazilian Journal of Oral Sciences**, 2007; 6(22), 1402-1406.
23. Jiang T, Ma X, Wang Y, Zhu Z, Tong H, Hu J. Effects of hydrogen peroxide on human dentin structure. **J Dent Res**. 2007;86(12):1040-5.
24. Kang D, Amarasiriwardena D, Goodman AH. Application of laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry (LA-ICP-MS) to investigate trace metal spatial distributions in human tooth enamel and dentine growth layers and pulp. **Anal Bioanal Chem**. 2004 Mar;378(6):1608-15.
25. KANTOOR, Pallavi et al. Alterations in the mechanical properties of the extracted human teeth to be used as biological restorations on storing them in different storage media: an in vitro study. **Dental Traumatology**, 2015; [s.l.], v. 31, n. 4, p.308-313, 21 jan. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/edt.12158>.
26. Kazarian SG, Chan KL. ATR-FTIR spectroscopic imaging: recent advances and applications to biological systems. **Analyst**, 2013; 138(7):1940-51.
27. Kay MI, Young RA, Posner AS. Crystal structure of hydroxyapatite. **Nature**. 1964 Dec 12;204:1050-2.

- 28.Kielbassa AM, Schendera A, Schulte-Monting J. Microradiographic and microscopic studies on in situ induced initial caries in irradiated and non-irradiated dental enamel. **Caries Res.** 2000;34(1):41-7.
- 29.Kirchner MT. Ancient and modern specimens of human teeth: a Fourier transform Raman spectroscopic study. **Journal of Raman Spectroscopy**, 1997; 28:171-8.
- 30.Lee SY, Lin CT. Storage effect on dentine structure and on resultant composite bond strengths. **Journal Oral Rehabilitation**, 1997; 24(11):823-34.
- 31.Liu Y, Yao X, Liu YW, Wang Y. A Fourier transform infrared spectroscopy analysis of carious dentin from transparent zone to normal zone. **Caries Res.** 2014;48(4):320-9.
- 32.Lopes CCA, Soares CJ, Lara VC, Arana-Chavez VE, Soares PB, Novais VR. Effect of fluoride application during radiotherapy on enamel demineralization. **Journal Application Oral Science**, 2018; 27: e20180044.
- 33.Moazami, Fariborz et al. Comparison of soymilk, powdered milk, Hank's balanced salt solution and tap water on periodontal ligament cell survival. **Dental Traumatology**, 2011. [s.l.], v. 28, n. 2, p.132-135, 5 set. 2011. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-9657.2011.01054.x>.
- 34.Montagner, Anelise Fernandes et al. Effect of 180-Day Water Storage on Bonding Effectiveness of Self-Adhesive Systems to Occlusal and Proximal Dentin. **Journal Of Prosthodontics**, 2015; [s.l.], v. 26, n. 1, p.64-69, 22 set. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/jopr.12365>.
- 35.Nanci A. (2003). Ten Cate's oral histology: development, structure, and function, chapter 8 dentin–pulp complex. 6th ed. **St. Louis: Mosby**.
- 36.NIK, Iman Ramezani et al. Effect of Chlorhexidine and Ethanol on Microleakage of Composite Resin Restoration to Dentine. **Chinese Journal Of Dental Research**, 2017; [s.l.], v. 20, n. 3, p.161-168, 20 set. Quintessence Publishing Co. Ltd.. <http://dx.doi.org/10.3290/j.cjdr.a38771>.
- 37.Reyes-Gasga J, Martínez-Piñeiro EL, Rodríguez-Álvarez G, Tiznado-Orozco GE, García-García R, Brès EF. XRD and FTIR crystallinity indices in sound

- human tooth enamel and synthetic hydroxyapatite. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**. 2013;33(8):4568-74.
- 38.Rodrigues RB, Soares CJ, Junior PCS, Lara VC, Arana-Chavez VE, Novais VR. Influence of radiotherapy on the dentin properties and bond strength. **Clinical Oral Investigation**, 2018; 22(2):875-883.
- 39.Rohanizadeh R, LeGeros RZ, Fan D, Jean A, Daculsi G. Ultrastructural properties of laser-irradiated and heat-treated dentin. **Journal of Dental Research**, 1999; 78(12):1829-35.
- 40.Santana FR, Pereira JC, Pereira CA, Neto AJ, Soares CJ. Influence of method and period of storage on the microtensile bond strength of indirect composite resin restorations to dentine. **Brazilian Oral Research**, 2008; 22(4), 352-357
- 41.Secilmis A, Dilber E, Ozturk N, Yilmaz FG. (2013).The effects of storage solutions on mineral content of enamel. **Materials Sciences and Applications**, 2013; 4(7), 439-445.
- 42.Silva MF, Mandarino F, Sassi JF, Menezes M, Centola AL, Nonaka T. The influence of storage and sterilization methods more used in tests of adhesive resistance with extracted teeth. **Revista de Odontologia da Universidade de São Paulo**, 2006; 18(2), 175-180.
- 43.Sonju Clasen AB, Ruyter IE. Quantitative determination of type A and type B carbonate in human deciduous and permanent enamel by means of Fourier transform infrared spectrometry. **Advances in Dental Research**,1997; 11(4):523-7
- 44.Strawn SE, White JM, Marshall GW, Gee L, Goodis HE, Marshall SJ. Spectroscopic changes in human dentine exposed to various storage solutions--short term. **Journal of Dentistry**, 1996; 24(6):417-23.
- 45.Sultana S, Nikaido T, Asafujjoha M, Tagami J, Matin K. Storage media to preserve dentin and their effects on surface properties. **Chinese Journal of Dental Research**, 2006; 6, 123-129.
- 46.TAKAMIZAWA, Toshiki et al. Influence of water storage on fatigue strength of self-etch adhesives. **Journal Of Dentistry**,2015; [s.l.], v. 43, n. 12, p.1416-1427, dez. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jdent.2015.10.018>.

47. Taschieri, S., Del Fabbro, M., Samaranayake, L., Chang, J. W., & Corbella, S. Microbial invasion of dentinal tubules: A literature review and a new perspective. **Journal of Investigative and Clinical Dentistry**, 2014 5, 163–170.
48. Teruel J de D, Alcolea A, Hernández A, Ruiz AJ. Comparison of chemical composition of enamel and dentine in human, bovine, porcine and ovine teeth. **Arch Oral Biol**. 2015; May;60(5):768-75.
49. 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. **Archives of Oral Biology**, 1998; 43:305e11.
50. Toledano M, Aguilera FS, Osorio E, Cabello I, Toledano-Osorio M, Osorio R. Functional and molecular structural analysis of dentine interfaces promoted by a Zn-doped self-etching adhesive and an in vitro load cycling model. **J Mech Behav Biomed Mater**, 2015; 50:131–149
51. Tosun G, Sener Y, Sengun A. Effect of storage duration/solution on microshear bond strength of composite to enamel. **Dental Materials Journal**, 2007; 26(1):116-21.
52. Xu C, Wang Y. Chemical composition and structure of peritubular and intertubular human dentine revisited. **Archives of Oral Biology**, 2012; 57(4):383-91.
53. Zieba-Palus J, Kunicki M. Application of the micro-FTIR spectroscopy, Raman spectroscopy and XRF method examination of inks. **Forensic Science International**, 2006; 158(2–3):164–172