

Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais
Faculdade de Odontologia

ESTUDO IN VITRO DA INFILTRAÇÃO BACTERIANA
EM CANAIS RADICULARES OBTURADOS POR
DUAS TÉCNICAS DA GUTA-PERCHA
TERMOPLASTIFICADA

LILIAN VIEIRA DE OLIVEIRA

Belo Horizonte

2008

LILIAN VIEIRA DE OLIVEIRA

ESTUDO IN VITRO DA INFILTRAÇÃO
BACTERIANA EM CANAIS RADICULARES OBTURADOS POR DUAS
TÉCNICAS DA GUTA-PERCHA TERMOPLASTIFICADA

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Odontologia, área de concentração em Clínicas Odontológicas- Ênfase em Endodontia

Orientadora: Prof. Dra. Maria Ilma Souza Gruppioni Côrtes

Co-orientadora: Prof. Dra. Maria Eugênia Alvarez Leite

Belo Horizonte

2008

FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pela Biblioteca da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais

048e	<p>Oliveira, Lilian Vieira Estudo <i>in vitro</i> da infiltração bacteriana em canais radiculares obturados por duas técnicas da guta-percha termoplastificada / Lilian Vieira de Oliveira. - Belo Horizonte, 2008. 54 f.</p> <p>Orientador: Maria Ilma de Souza Gruppioni Cortês Co-orientador: Maria Eugênia Alvarez Leite Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Bibliografia.</p> <p>1. Endodontia. 2. Canal radicular - Tratamento. 3. Infiltração dentária I. Cortês, Maria Ilma de Souza Gruppioni. II. Leite, Maria Eugênia Alvarez Leite. III. Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais. Programa de Pós- Graduação em Odontologia. IV. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU: 616.314.18</p>
------	--

FOLHA DE APROVAÇÃO

Aos meus pais, Selma e João, pelo incentivo, pelo apoio incondicional e dedicação infinita, e por me fazerem acreditar que tudo é possível.

Às minhas irmãs, Kelly e Milena, por me ensinarem o que “azuleja o dia”.

Ao Rodrigo por toda ajuda e compreensão, pela tranquilidade e apoio.

E finalmente dedico ao meu filho André, de quem roubei tanto tempo.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, que acima de tudo me permitiu estar aqui, me fortaleceu quando precisei e me amparou quando vacilei.

A minha orientadora, Professora Maria Ilma Souza Gruppioni Côrtes, pela sabedoria na direção e ensinamentos preciosos.

A minha co-orientadora, Professora Maria Eugênia Alvarez Leite, pela dedicação sem igual, pela disponibilidade, pelo amor a ciência, e pelo carinho com que conduziu toda a parte experimental.

Aos Professores Eduardo Nunes e Frank Ferreira Silveira, pelos ensinamentos no decorrer de todo o curso.

Ao Prof. Luiz de Macedo Farias, do laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios pela doação das amostras de *Enterococcus faecalis*, ATCC 4083, utilizado neste estudo.

A Maria Alice A. Valadares pelas importantes orientações.

Ao Adalberto Ramos Vieira pelo apoio técnico, disponibilidade e o desprendimento em ajudar.

Aos alunos de iniciação científica Maria Olívia, Daniel e Alessandra pela preciosa ajuda e convivência tão agradável.

A Zezé, do laboratório de microbiologia, pela paciência e ensinamentos.

Ao meu ex-professor Joel Diogo Leite a quem devo o gosto pela endodontia.

A Angélica e Silvânia pela orientação constante.

Ao Leonardo, Helenice e Regilena que tanto ajudaram como bibliotecários demonstrando dedicação e amor à profissão.

A todos os professores do Mestrado em Odontologia que acrescentaram conhecimento e pincelaram com suas próprias experiências minha jornada por esta instituição.

A minha tia Delma pela paciência e colaboração em me corrigir.

E a todos que tornaram possível concluir esta tarefa, direta e indiretamente, tornando mais suave o fardo e mais alegre o caminhar.

SUMÁRIO

RESUMO	8
INTRODUÇÃO.	9
OBJETIVOS	14
CONSIDERAÇÕES GERAIS.	16
ABSTRACT	22
REFERÊNCIAS.	23
ANEXOS.	29
ANEXO A- CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.	29
ANEXO B -ARTIGO :Estudo in vitro da infiltração bacteriana em canais radiculares obturados pela técnica da guta-percha termoplastificada	30

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar a eficácia da obturação do sistema de canais radiculares obtida por duas técnicas de guta-percha plastificada utilizando os aparelhos Easy Pack WL e os aparelhos Touch'n Heat e Obtura II, associadas ao cimento endodôntico Pulp Canal Sealer EWT (Extended Working Time) como barreira mecânica, para prevenir a infiltração de uma cultura de *Enterococcus faecalis* (ATCC 4083). Para isto foram utilizados 62 dentes unirradiculados extraídos de humanos, cujos canais foram instrumentados, irrigados e distribuídos aleatoriamente em dois grupos controle, com seis dentes cada e dois grupos experimentais de 25 dentes cada, segundo a técnica de obturação, sendo os do Grupo I obturados com a técnica da condensação vertical da guta-percha termoplastificada utilizando o aparelho Easy Pack WL e do Grupo II condensação vertical da guta-percha termoplastificada utilizando os aparelhos Touch'n Heat e Obtura II, ambas associadas ao cimento Pulp Canal Sealer EWT. Para testar a infiltração bacteriana foi utilizado um aparato de câmara dupla. Os dentes foram adaptados em tubos tipo Eppendorf e inseridos em frascos de vidro, vedados com tampa de borracha e esterilizados em óxido de etileno. Os procedimentos de montagem do modelo e inoculação do microrganismo foram realizados em câmara de fluxo laminar. Os frascos de vidro foram preenchidos com caldo Brain Heart Infusion (BHI), de forma que o ápice do dente permaneceu imerso no meio de cultura. Os espécimes foram inoculados com o *Enterococcus faecalis* a cada três dias durante os 60 dias de experimento, e a turvação do meio, que indicava a infiltração do espécime, observada diariamente e os dados registrados. Foram aplicados os testes estatísticos Kaplan Meier e Log Rank e qui-quadrado, com nível de significância de 5%. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Conclusão: nenhuma das técnicas apresentadas foi capaz de deter a infiltração bacteriana no total dos espécimes nos 60 dias do experimento.

Palavras chave: Infiltração dentária, Guta-Percha, *Enterococcus faecalis*, obturação do canal radicular.

A glass bottle containing a yellow liquid, with a pipette and a white cap. The background is a white surface with a grid pattern.

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

A principal causa de falhas em tratamentos endodônticos é a permanência de microrganismos na região apical, devido à limpeza insuficiente, canais e ramificações não identificadas, infiltração coronária, obturação inadequada dentre outros fatores. É necessário, portanto, que se atente para cada etapa do tratamento, buscando a correta limpeza, anti-sepsia e formatação do sistema de canais radiculares (SCR). O selamento adequado da porção interna da raiz e a vedação coronária do dente, isolando o canal radicular do meio oral, têm o objetivo de manter essa assepsia.

A anti-sepsia do SCR consiste na redução parcial ou total dos microrganismos através da limpeza químico-mecânica, sendo quimicamente pelo uso de substâncias irrigadoras com propriedades bactericidas e mecanicamente pela remoção da dentina contaminada, através da instrumentação. Além disso, a instrumentação promoverá a formatação adequada do canal radicular, preparando-o para uma obturação hermética e tridimensional na tentativa de eliminar a possibilidade de ser infectado novamente (PIZZO *et al.*, 2006).

Para se obter a obturação tridimensional não se pode esquecer a morfologia interna do SCR, rica e complexa, com todas as suas ramificações, deltas, canais laterais, recorrentes e acessórios (SCHILDER, 1967; DE DEUS, 1975). Embora essas ramificações, não recebam acesso direto dos instrumentos, deverão ser submetidas à limpeza química com substâncias adequadas, para que sejam posteriormente seladas pelos materiais obturadores sólidos e cimentos endodônticos.

Os materiais obturadores penetrarão de forma mais efetiva nos túbulos dentinários, canais acessórios e laterais, após a utilização de substâncias irrigadoras potentes, além de agentes quelantes, como o EDTA a 17%, capazes de remover a *smear layer* semi-aderida às paredes dos canais radiculares. A *smear layer* atua obstruindo a entrada desses túbulos, facilitando a permanência de microrganismos em seu interior, bem como diminuindo a adesão do cimento à dentina radicular, formando uma camada que facilita a penetração de bactérias para o canal radicular (GARBEROGLIO; BECCE, 1994; WHITE; GOLDMAN; LIN, 1984). Segundo Clark-Holke *et al.* (2003) a frequência de infiltração por bactéria é muito maior em canais obturados na presença de *smear layer* do que nos canais em que ela foi removida.

A afirmação que a escolha da técnica de obturação pode influenciar na infiltração de bactérias no interior dos canais radiculares levou à busca por uma técnica de obturação hermética e mais resistente à infiltração de microrganismos.

Vários métodos experimentais foram utilizados para avaliar a eficácia dos materiais obturadores e técnicas de obturação em atuarem como barreira a micro infiltração. Dentre eles podemos citar infiltração por corantes, tinta Nanquim (PALLARES; FAUS, 1995), tinta Nanquim seguida de reconstrução computadorizada 3D (LYROUDIA *et al.*, 2000), o modelo de transporte de fluido (POMMEL; CAMPS, 2001a; WU *et al.*, 2004; BIGGS *et al.*, 2006) inoculação de bactérias em dispositivo verticais, com penetração avaliada por turvação do meio (PADACHEY *et al.* 2000; CARRATÙ *et al.* 2002; DE-DEUS *et al.*, 2006; BROSCO *et al.* 2008).

O tamanho da molécula utilizada para testar a infiltração, período de exposição do dente ao agente infiltrante ou mesmo quebra da cadeia asséptica no caso de testes com bactérias, são variáveis importantes a se considerar (GILBERT *et al.*, 2001). Muitos estudos obtiveram resultados divergentes, justificados pela utilização de diferentes metodologias (PALARES e FAUS, 1995; GILBERT *et al.*, 2001; POMMEL; CAMPS, 2001a; POMMEL; CAMPS, 2001b; CARRATÙ *et al.*, 2002; JACOBSON *et al.*, 2002; LEA *et al.*, 2005; PAGAVINO *et al.*, 2006).

Diversos estudos compararam técnicas utilizando condensação lateral e condensação vertical quanto à resistência do material obturador à infiltração. Esses estudos comprovaram que dentes obturados pela técnica de condensação lateral apresentaram maior infiltração bacteriana do que aqueles obturados pela técnica de condensação vertical (GILBERT; WITHERSPOON; BERRY, 2001; POMMEL; CAMPS, 2001b). Muitas técnicas foram desenvolvidas, embasadas nesse conceito, usando a guta-percha termoplastificada e condensação vertical para obturação do sistema de canais radiculares. Porém, como a guta-percha não possui adesividade, faz-se necessário a utilização de um cimento obturador. A presença do cimento é fundamental para o sucesso da obturação do canal, pois o preenchimento do canal radicular com guta-percha aquecida sem cimento também é mais susceptível à infiltração que nos casos em que o cimento foi utilizado (KAYA; KECECI; BELLI, 2007; WU *et al.*, 2004; BARRIESHI *et al.*, 1997).

Os resultados são ainda melhores quando se associa propriedades antimicrobianas aos cimentos endodônticos, atuando na eliminação de bactérias do interior do canal, bem como dificultando a reinfecção. Em seus estudos Pizzo *et al.* (2006) concluíram que essa atividade

antimicrobiana pode ser vantajosa, para ajudar na eliminação de microrganismos residuais que tenham sobrevivido ao preparo químico-mecânico.

Entretanto, o conjunto guta-percha e cimento não é dimensionalmente estável. Uma maior espessura do cimento influencia negativamente as propriedades seladoras da obturação do canal. Merecem destaque as técnicas de compactação da guta-percha termoplastificada por proporcionarem menor quantidade de cimento quando comparadas àquelas que utilizam a condensação lateral (PAGAVINO *et al.*, 2006; DE-DEUS *et al.*, 2006).

Nas técnicas que utilizam a termoplastificação, a guta-percha aquecida é compactada dentro do canal. Durante sua compactação ela formará um êmbolo que deverá pressionar o cimento endodôntico para o interior dos canais laterais, acessórios e deltas apicais, obtendo-se então a desejada obturação tridimensional.

Destaca-se por fim, a importância de se manter a qualidade do selamento endodôntico, tanto através da restauração definitiva do dente no menor prazo possível, quanto na escolha de um cimento obturador com baixa solubilidade evitando que bactérias ou substratos cheguem até o ápice.

A condensação vertical da guta-percha termoplastificada se destaca entre as técnicas de obturação do SCR, por permitir uma camada mais fina de cimento na interface dentina - obturação, obtendo-se assim uma obturação mais homogênea e, portanto, mais resistente à infiltração (WU *et al.*, 2004).

Seguindo essas evidências, muitas técnicas usando a guta-percha termoplastificada têm sido propostas, com o objetivo de tornar o procedimento mais fácil, mais rápido e com maior índice de sucesso. Hoje os estudos aliados à tecnologia têm conseguido inúmeros avanços, criando novas técnicas e instrumentos favorecendo sobremaneira não só o paciente como também o cirurgião-dentista.

Diversos aparelhos são utilizados para a termoplastificação, destacando-se o Touch'n Heat[®] e Obtura II[®], que facilitam a introdução da guta-percha no interior do canal radicular. Recentemente foi lançado, com a mesma finalidade, o aparelho nacional Easy Pack WL[®] que agrega em si uma seringa para plastificação da guta-percha e uma caneta para acoplar a ponta condutora de calor. Entretanto, pouco se conhece sobre eficiência do novo aparelho. De modo semelhante, as propriedades seladoras da técnica preconizada (VINSEIRO, 2007) e sua competência em criar uma barreira mecânica que evite a infiltração bacteriana, ainda não foram suficientemente comprovadas em estudos experimentais.

No presente estudo foi utilizado o *Enterococcus faecalis* por ser um patógeno frequentemente associado às periodontites apicais persistentes em dentes endodonticamente

tratados, embora possa estar associado também a infecções primárias. Em estudos *in vitro*, o *E. faecalis* é adequado por ter pouca exigência nutricional, crescimento rápido e fácil cultura.

A proposta deste trabalho foi verificar a capacidade que as técnicas utilizando a gutapercha termoplastificada pelos aparelhos Touch'n Heat[®] associado ao Obtura II[®] e pelo Easy Pack WL[®] apresentam em oferecer uma barreira eficaz à contaminação pelo *Enterococcus faecalis* em um modelo experimental *in vitro*.



OBJETIVOS

OBJETIVOS

O objetivo do presente estudo foi avaliar em dentes unirradiculados extraídos de humanos, a eficácia da obturação do sistema de canais radiculares obtida por duas técnicas de guta-percha termoplastificada utilizando os aparelhos Easy Pack WL e os aparelhos Touch'n Heat[®] e Obtura II[®], associadas ao cimento endodôntico Pulp Canal Sealer[®] EWT (Extended Working Time) como barreira mecânica, para prevenir a infiltração de uma cultura de *Enterococcus faecalis* (ATCC 4083).

Objetivos Específicos

- 1) Avaliar o tempo de ocorrência da infiltração bacteriana em cada uma das técnicas de guta-percha termoplastificada citadas.
- 2) Identificar o tempo crítico para a exposição da obturação do canal radicular ao *E. faecalis*.
- 3) Comparar as duas técnicas quanto à resistência à infiltração bacteriana.

A laboratory flask containing a yellow liquid, with a pipette tip and a white cap visible above it. The background is a white surface with a grid pattern.

CONSIDERAÇÕES GERAIS

CONSIDERAÇÕES GERAIS

Desde que Schilder, em 1967, descreveu a obturação tridimensional do sistema de canais radiculares (SCR), como um novo caminho para o sucesso da terapia endodôntica, a técnica da condensação vertical da guta-percha plastificada tem ocupado um lugar de destaque na preferência dos endodontistas. No entanto, esta técnica exige tempo, habilidades específicas e um treinamento intenso para sua realização plena. Inúmeras variações da técnica foram propostas para se atingir os objetivos e um grande número de aparelhos têm sido idealizados com o objetivo de apresentar maior facilidade e rapidez na execução da técnica sem perder a qualidade.

Em 1984 foi lançado pela Unitek Corporation, o aparelho Obtura que consistia em uma seringa para plastificar a guta-percha e levá-la diretamente ao interior do canal, com a inserção da agulha até o contato com a guta percha anteriormente compactada no terço apical, bastando em seguida acomodar a massa plastificada utilizando os condensadores manuais. O aparelho Obtura está hoje em sua terceira versão, Obtura III Max (www.obtura.com) recentemente lançado pela Obtura Spartan (Figura 1). No presente trabalho, foi utilizado o aparelho Obtura II consolidado no mercado, e consagrado por inúmeros trabalhos científicos publicados (BROSCO *et al.*, 2008; KAYA *et al.*, 2007; DE DEUS *et al.* 2006; VENTURI, 2006; WHITWORTH; BACO, 2005; JACOBSON *et al.* 2002).

Vinte anos depois, a empresa Easy Equipamentos Odontológicos (www.easy.odo.br) apresentou a primeira versão de um aparelho nacional, com o objetivo de aquecer a guta percha de forma a plastificá-la, facilitando a execução da técnica da guta-percha termo-plastificada para a obturação tridimensional do canal. A proposta do fabricante era fornecer ao mercado nacional, um aparelho que pudesse fazer frente aos importados, por um custo mais acessível. Surgia então o Easy Pack 2010[®], seguida pela versão 2020, que era acoplado ao motor para instrumentação rotatória, pelo Pack Plus[®], similar a versão atual, porém ainda com cabos, até que se chegou ao aparelho Easy Pack WL[®] (Figura 2), utilizado nesta pesquisa. Até a presente data, não consta na literatura nenhum trabalho científico que avalie sua eficácia em produzir uma obturação, que ofereça uma barreira mecânica, para prevenir a infiltração de microrganismos para o interior do SCR.

O Easy Pack WL[®] apresenta um sistema 2 em 1, onde se tem uma seringa para aquecimento e injeção da guta-percha e uma caneta termo-compactadora, onde se insere a ponta condutora de calor. Esta caneta tem o mesmo objetivo do Touch'n Heat[®] (Figura 3),

que é o corte rápido da guta percha, através do aquecimento da ponta condutora de calor em até 200 graus Celsius.

Neste estudo foi utilizada a ponta condutora de calor da mesma marca (SybronEndo) tanto para o aparelho Easy Pack WL quanto para o Touch'n Heat. A caneta termo-compactadora (Figura 4) do aparelho Easy Pack apresentou excelente desempenho, quando considerado o tempo para aquecimento da ponta, rapidez e precisão no corte da guta percha.

A seringa para aquecimento da guta-percha, por sua vez, exigiu um maior tempo para o aquecimento até a plastificação da guta-percha. O Easy Pack WL oferece dois níveis de temperatura indicados por leds no display (Figuras 5 e 6). Embora o fabricante considere que o tempo necessário para a plastificação requerido seja de 3 minutos a 5 minutos, dependendo do nível de temperatura escolhido, observou-se que clinicamente o tempo requerido foi superior, aproximadamente 15 minutos após ser ligado. Transcorrido esse tempo, o aquecimento de outras porções da guta-percha ocorria quase instantaneamente, bastando que o aparelho fosse recolocado na base. Para levar a guta-percha plastificada ao interior do canal, a técnica proposta pelo fabricante utiliza também o condensador de McSpadden, o que a torna mais complexa considerando o lado operacional. A mudança do sentido de rotação do micro-motor onde está acoplado o condensador exige cuidado, pois caso seja inserido dentro do canal no sentido anti-horário poderá remover a guta-percha remanescente do terço apical. Tal manobra requer também agilidade, porque à temperatura ambiente a guta-percha sai da fase plástica rapidamente.

O aparelho Obtura II[®] fica pronto para o uso aproximadamente 3 minutos depois de ligado. Nele podem ser adaptados três calibres de agulha, que são selecionados conforme o diâmetro do canal. O Obtura Spartan, atual fabricante, disponibiliza também outros acessórios como, por exemplo, o protetor térmico autoclavável para a ponta da seringa, que evita queimaduras no paciente e uma chave para pré-curvar a agulha e facilitar sua inserção nos canais radiculares. Como desvantagens, podem ser citadas o alto custo do aparelho, atrelados à dificuldade de importação e assistência técnica, pois no Brasil existe apenas um revendedor autorizado.

Os aparelhos Easy Pack WL, Touch'n Heat e Obtura enriquecem o arsenal endodôntico como facilitadores da técnica da condensação vertical da guta percha termoplastificada e possibilitam a obturação tridimensional do SCR .



FIGURA 1- Obtura II. (Fonte: Arquivo Pessoal)



FIGURA 2-Easy Pack WL-(Fonte: http://www.easy.odo.br/prod.php?n_idprod=10)



FIGURA 3- Touch' n Heat. (Fonte: <http://www.sybronendo.com/pix/sybronendo/products/touchnheat/>)

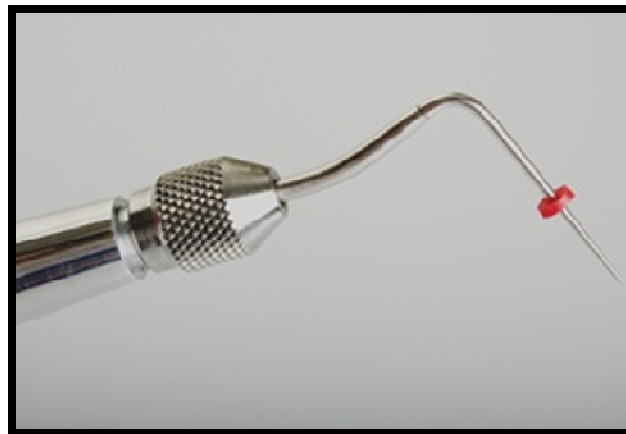


FIGURA 4-Termo Compactador (Fonte: Arquivo pessoal).



FIGURA 5-Display do Easy Pack WL: aquecendo a guta-percha (Fonte: Arquivo pessoal).

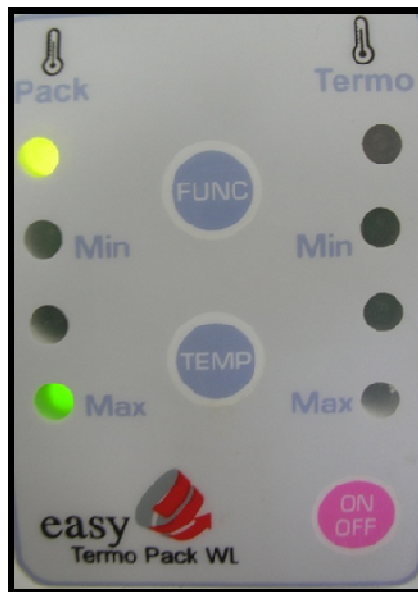


FIGURA 6-Display do Easy Pack WL: leds indicando guta-percha pronta para uso (Fonte: Arquivo pessoal).

ABSTRACT

The purpose of this study was to compare the effectiveness of two thermoplastic gutta-percha obturation techniques, to prevent the leakage of an *Enterococcus faecalis* culture, using a new device Easy Pack WL and the Touch'n Heat associated to Obtura II both with Pulp Canal Sealer EWT (Extended Working Time) cement. The sample consisted of sixty two human single rooted teeth, whose canals were instrumented, irrigated and distributed in two control groups, with six teeth each and two experimental groups of 25 teeth each. According to the obturation technique, the teeth were divided in Group I: vertical condensation of warm gutta-percha using the device Easy Pack WL and Group II: vertical condensation of warm gutta-percha using the devices Touch'n Heat and Obtura II, both groups associated with Pulp Canal Sealer EWT cement. To test bacterial leakage a dual chamber apparatus was used. The teeth were adapted in Eppendorf plastic tubes and placed into a bottle of penicillin, sealed with a rubber cover and sterilized in ethylene oxide gas. The procedures of assembly of the model and inoculation of the microorganism were performed in a laminar flow chamber to avoid contamination. The penicillin bottles were filled with broth of sterile Brain Heart Infusion (BHI), so that the apex of the tooth remained immersed in the culture medium. The specimens were inoculated with the *Enterococcus faecalis* every three days during the 60 days of trial. Turbidity of the medium, which indicated that infiltration of the specimen has occurred, was observed daily and the data recorded. Statistical tests Kaplan Meier, Log Rank and chi-square, with a significance level of 5% were applied. There was no statistically significant difference between groups. Conclusion: None of the techniques presented was able to stop bacterial infiltration of all specimens within the 60 days of the experiment.

Key-Words: Dental leakage, Gutta-Percha, *Enterococcus faecalis*, Root canal obturation



REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS¹

BARRIESHI, K.M. *et al.*. Coronal leakage of mixed anaerobic bacteria after obturation and post space preparation. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics**, St. Louis, v.84, n.3, p.310-314, Sept. 1997.

BIGGS, S.G. *et al.*. An in vitro assessment of the sealing ability of Resilon/ Epiphany using fluid filtration. **Journal of Endodontics**, Baltimore, v.32, n.8, p.759-761, Aug. 2006.

BOUSSETTA, F. *et al.*. In vitro evaluation of apical microleakage following canal filling with a coated carrier system compared with lateral and thermomechanical Gutta-Percha condensation techniques. **International Endodontic Journal**, Oxford, v.36, n.5, p.367-71, May 2003.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Normas técnicas para controle de AIDS e outras infecções virais na prática odontológica**. 2.ed. Brasília: Divisão Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis. Divisão Nacional de Saúde Bucal. Ago. 1989.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional da Vigilância Sanitária. **Serviços Odontológicos: Prevenção e controle de riscos**. Brasília: Anvisa, 2006. 156p.

BROSCO, V.H. *et al.*. Bacterial leakage in root canals obturated by different techniques. Part 1: microbiologic evaluation. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics**, St Louis, v.105, n.1, p. 8-53, Jan. 2008.

BUCHANAN, S. **Continuous Wave Of Condensation**. Disponível em: <http://www.obtura.com/obturationth.html>. Acesso em 03 jun 2007.

CARRATÙ, P. *et al.*. Evaluation of leakage of bacteria and endotoxins in teeth treated endodontically by two different techniques. **Journal of Endodontics**, Baltimore, v.28, n.4, p.272-275, Apr. 2002.

CLARK-HOLKE, D. *et al.*. Bacterial penetration through canals of endodontically treated teeth in the presence or absence of the smear layer. **Journal of Dentistry**, Bristol, v.31, n.4, p.275-281, May 2003.

ÇELIK, E.U. *et al.*. Bacterial microleakage of barrier materials in obturated root canals. **Journal of Endodontics**, Baltimore, v.32, n.11, p.1074-6. Nov. 2006.

DE DEUS, Q.D. Frequency, location, and direction of the lateral, secondary, and accessory canals. **Journal of Endodontics**, Baltimore, v.1, n.11, p.361-6. Nov. 1975.

DEUS, Q. Diniz. **Endodontia**. 5 ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 1992. 695p.

¹ Adaptado do Padrão de Normalização do Sistema de Bibliotecas PUC Minas

DE-DEUS, G. *et al.* Analysis of the sealing ability of different obturation techniques in oval-shaped canals: a study using a bacterial leakage model. **Brazilian Oral Research**, Ribeirão Preto, v.20, n.1, p.64-9. Jan. 2006 a.

DE-DEUS, G. *et al.* Polymicrobial leakage of four root canal sealers at two different thicknesses. **Journal of Endodontics**, Baltimore, v. 2, n.10, p.998-1001, Oct. 2006 b.

DE-DEUS G. *et al.* Sealing ability of oval-shaped canals filled using the System B heat source with either gutta-percha or Resilon: an ex vivo study using a polymicrobial leakage model. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, St Louis, v.104, n.4, p.114-119. Oct. 2007.

ESTRELA, C. **Metodologia Científica: Ciência, Ensino e Pesquisa**. São Paulo: Artes Médicas, 2005, 794p.

FIGDOR, D.; DAVIES, J.K.; SUNDQVIST, G. Starvation survival, growth and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum. **Oral Microbiology and Immunology**, Oxford, v.18, n.4, p.234-239, Aug. 2003.

FUSS, Z.; WEISS, E.I.; SHALAV, M. Antibacterial activity of calcium hydroxide – containing endodontic sealer on *Enterococcus faecalis* in Vitro. **International Journal Endodontic**, Oxford, n.30, v.6, p.397-402. Nov. 1997.

GARBEROGLIO, R.; BECCE, C. Smear layer removal by root canal irrigants. A comparative scanning electron microscopic study. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, St. Louis**, v.78, n.3, p.359-67, Sept.1994.

GEORGOPOULOU, M. K. *et al.* Effect of thickness on the sealing ability of some root canal sealer. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, St. Louis, v.80, n.3, p.338-44, Sept. 1995.

GILBERT, S.D.; WITHERSPOON, D.E.; BERRY, C.W. Coronal leakage following three obturation techniques. **International Endodontic Journal**, Oxford, v.34, n.4, p.293-299, June 2001.

HEREDIA, M.P. *et al.* Apical seal comparison of low-temperature thermoplasticized gutta-percha technique and lateral condensation with two different master cones. **Medicina oral, Patologia Oral y Cirurgia Bucal**, v.1, n.12, p.175-9, 2007.

JACOBSON, H.L. *et al.* Microbial leakage evaluation of the continuous wave of condensation. **Journal of Endodontics**, Baltimore, v.8, n.4, p.269-71, Apr. 2002.

KAYA, B.U.; KECECI, A.D.; BELLI, S. Evaluation of the sealing ability of gutta-percha and thermoplastic synthetic polymer-based systems along the root canals through the glucose penetration model. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, St Louis; v.104, n.6, p.66-73. Dec. 2007.

KUMAR M. *et al.* Sterilisation of extracted human teeth for educational use. **Indian Journal of Medical Microbiology**, Mumbai; v. 23, n. 4, p. 256-8. Oct. 2005.

LEA, C.S. *et al.* Comparison of the obturation density of cold lateral compaction versus warm vertical compaction using the continuous wave of condensation technique. **Journal of Endodontics**, Baltimore, v.31, n.1, p.37-9, Jan. 2005.

LEONARDO, M.R.; LEAL, J.M. Materiais obturadores de canais radiculares, In: LEONARDO, M.R. **Endodontia, tratamento dos canais radiculares: princípios técnicos e biológicos**. São Paulo: Artes Médicas, 2005. p.1064-1145.

LEONARDO, M.R. *et al.* Apical and periapical repair of dog's teeth with periapical lesions after endodontic treatment with different root canal sealers. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, v.7, n.1, p.69-74. Agosto 2003.

LYROUDIA, K *et al.* The use of 3D computerized reconstruction for the study of coronal microleakage. **International Endodontic Journal**, Oxford, v.33, n.3, p.243-247, May 2000.

MICKEL, A.K.; NGUYEN, T.H.; CHOLE, S. Antimicrobial activity of endodontic sealers on *Enterococcus faecalis*. **Journal of Endodontics**, Baltimore, v.29,n.4, p.257-8, Apr. 2003.

MILETIC, I. *et al.* Bacterial and fungal microleakage of AH 26 and AH Plus root canal sealers. **International Endodontic Journal**, Oxford, v.35, n.5, p.428-432, May 2002.

OLIVER, M.C.; ABBOTT, P.V. An in vitro study of apical microleakage of laterally condensed gutta-percha with Ketac-Endo and AH-26. **Australian Dental Journal**. Melborn, v.43, n.4, p.262-268, Aug. 1998.

PADACHEY N. *et al.* Resistance of a novel root canal sealer to bacterial ingress in vitro. **Journal of Endodontics**, Baltimore, v.26, n.11, p.656-659, Nov. 2000.

PAGAVINO, G. *et al.* The percentage of gutta-percha-filled area in simulated curved canals when filled using Endo Twinn, a new heat device source. **International Endodontic Journal**, Oxford. n. 9, p.610-615, Aug. 2006.

PALLARES, A; FAUS V. A comparative study of the sealing ability of two root canal obturation techniques. **Journal of Endodontics**, Baltimore, v.21, n.9, p.449-450, Sept. 1995.

PITOUT, E. *et al.* Coronal leakage of teeth root-filled with gutta-percha or resilon root canal filling material. **Journal of Endodontics**, Baltimore, v.32, n.9, p.879-881, Sept. 2006.

PIZZO, G. *et al.* In vitro antibacterial activity of endodontic sealers. **Journal of Dentistry**, Bristol, v.34, p.35-40, Jan. 2006.

POMMEL, L.; CAMPS, J. Effects of pressure and measurement time on the fluid filtration method in endodontics. **Journal of Endodontics**, Baltimore, v.27, n.4, p.256-258. Apr. 2001 a.

POMMEL, L.; CAMPS, J. In vitro apical leakage of system B compared with other filling techniques. **Journal of Endodontics**, Baltimore, v.27, n.7, p.449-451, July 2001 b.

SAGSEN, B. *et al.* Evaluation of microleakage of roots filled with different techniques with a computerized fluid filtration technique **Journal of Endodontics**, Baltimore, v.32, n.12, p.1168-1170, Dec. 2006.

SANTOS, André Ezídio. **Estudo in vitro da infiltração microbiana em canais medicados com hidróxido de cálcio e selados com cimento de Ionômero de vidro tipo II e cimento de óxido de zinco e eugenol reforçado.** 2006. 144 f. Dissertação (Mestrado). Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SCHILDER, H. Filling root canals in three dimensions. **Dental Clinics of North America**, Philadelphia, v.11, p.723-44, Apr. 1967.

SHIN, S.J. *et al.* Comparison of regrowth of *Enterococcus faecalis* in dentinal tubules after sealing with gutta-percha or resilon. **Journal of Endodontics**, Baltimore v.34, n.4, p.445-448, April 2008.

STUART, C.H. *et al.* *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. **Journal of Endodontics**, Baltimore, v.32, n.2, p.93- 98, Feb. 2006.

TORABINEJAD, M.; UNG, B.; KETTERING, J.D. In vitro bacterial penetration of coronally unsealed endodontically treated teeth. **Journal of Endodontics**, Baltimore, v.16, n.12, p.566-569, Dec.1990.

VALADARES, M.A.A. **Eficácia de uma barreira intracanal de Cavit em prevenir a infiltração microbiana em dentes tratados endodonticamente.** 2007. 84f. Dissertação (Mestrado). Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte.

VENTURI, M. Evaluation of canal filling after using two warm vertical gutta-percha compaction techniques in vivo: preliminary study. **International Endodontic Journal**, Oxford, v.39, p.538-546, July 2006.

VINSEIRO, S. **Seqüência da técnica da condensação vertical da guta-percha aquecida utilizando o Thermopack.** Agosto de 2006. Disponível em: <http://www.easy.odo.br/artigo.php?n_idArtigo=9> Acesso em 6 mar. 2007.

WHITE, R.R.; GOLDMAN, M.; LIN, P.S. The influence of the smeared layer upon dentinal tubule penetration by plastic filling materials. **Journal of Endodontics**, Baltimore, v.10, n.12, p. 558-62. Dec.1984.

WHITWORTH J.M.; BACO, L. Coronal leakage of sealer only backfill: an in vitro evaluation. **Journal of Endodontics**, Baltimore, v. 1, n.4, p.280-282, Apr. 2005.

WU, M.K.; VAN DER SLUIS, L.W.; WESSELINK P.R... Fluid transport along gutta-percha backfills with and without sealer. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontology**, St. Louis, v.97, n.2, p.257-262, Feb. 2004.

A glass bottle containing a yellow liquid. A pipette is inserted into the bottle, and a white cap is placed over the pipette tip. The background is a white surface with a grid pattern.

ANEXOS

ANEXO A- CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais
Pró-Reitoria de Pesquisa e de Pós-Graduação
Comitê de Ética em Pesquisa

Belo Horizonte, 09 de outubro de 2007.

De: Profa. Maria Beatriz Rios Ricci
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa

Para: Lílian Vieira de Oliveira
Mestrado em Odontologia – PUC Minas

Prezado(a) pesquisador(a),

O Projeto de Pesquisa CAAE - 0169.0.213.000-07 “*Estudo in vitro da infiltração bacteriana em canais obturados pela técnica da guta-percha termoplastificada*” foi **aprovado** no Comitê de Ética em Pesquisa da PUC Minas.

Atenciosamente,

Profa. Maria Beatriz Rios Ricci
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa – PUC Minas

ANEXO B- ARTIGO

O artigo apresentado a seguir segue a normatização proposta pelo periódico “*Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology And Endodontology*” ao qual será submetido em primeira instância.

**Estudo *in vitro* da infiltração bacteriana em canais radiculares obturados
por duas técnicas da guta-percha termoplastificada**

Lilian Vieira de Oliveira¹

Maria Ilma de Souza Gruppioni Côrtes,²

Maria Eugênia Alvarez Leite,³

Maria Olívia Rocha⁴

Correspondência: Maria Ilma de Souza Gruppioni Côrtes

Avenida Dom José Gaspar, 500

Prédio 46- Mestrado em Odontologia

Coração Eucarístico - Belo Horizonte - MG

CEP 30535-901

Fone/fax: (0xx31) 3319-4414

cortesmi@globo.com

¹ Pós- graduação, Mestranda em Clinicas Odontológica pela PUC-Minas

²Doutorado, Professora Adjunto III da Faculdade de Odontologia - PUC Minas

³Doutorado, Professora Adjunto III da Faculdade de Odontologia - PUC Minas

⁴ Aluna do Curso de Graduação em Odontologia da PUC Minas

RESUMO

Objetivo: Comparar a eficácia de duas técnicas de guta-percha termo-plastificada, em impedir a infiltração coronária do *Enterococcus faecalis*, utilizando o aparelho Easy Pack WL e o Touch'n Heat associado ao Obtura II.

Metodologia: 62 dentes unirradiculados extraídos de humanos, foram instrumentados, irrigados e divididos em 2 grupos controle (n= 6) e 2 grupos experimentais (n=25) de acordo com o aparelho utilizado para a termoplastificação da guta-percha. Grupo I- Easy Pack WL e Grupo II- Touch'n Heat e Obtura II. Os dentes foram impermeabilizados, esterilizados e montados em um aparato de duas câmaras para avaliar a infiltração do *E. faecalis*. O sistema foi observado diariamente durante 60 dias para avaliar a turvação do meio BHI (Brain Heart Infusion) e os dados analisados estatisticamente pelos testes de Kaplan Meier, Log Rank e qui-quadrado.

Resultados: Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p>0,05$) quando analisados em 60 dias.

Conclusões: Nenhuma das técnicas foi capaz de impedir completamente a infiltração do *E. faecalis* nos 60 dias do experimento. A qualidade do selamento apresentada pelas duas técnicas de obturação foi similar em relação à infiltração bacteriana.

INTRODUÇÃO

A principal causa de falhas em tratamentos endodônticos é a permanência de microrganismos na região apical. A anti-sepsia do Sistema de Canais Radiculares (SCR) se dá pela redução de microrganismos através da limpeza químico-mecânica, que deve simultaneamente formatar o canal para receber uma obturação que promova o selamento hermético e tridimensional do canal, considerando a complexa morfologia interna do SCR ^(1; 2; 3). Comparando as técnicas de obturação quanto à resistência à infiltração de microrganismos, muitos estudos demonstraram que dentes obturados pela técnica de condensação lateral, apresentaram maior infiltração bacteriana do que aqueles obturados pela técnica de condensação vertical ^(4; 5; 6; 7). Para uma maior redução da infiltração, devido à falta de adesividade da guta-percha às paredes radiculares, faz-se necessário a associação a um cimento obturador, preferencialmente que agregue propriedades antimicrobianas ^(8; 9; 10).

Visto que o conjunto guta-percha e cimento não é dimensionalmente estável e a espessura do cimento influencia negativamente as propriedades seladoras da obturação do canal, destacam-se as técnicas de obturação que possibilitem preencher o canal com a menor quantidade de cimento na interface dente-obturação, como as técnicas de compactação da guta-percha termoplastificada ^(11; 12). Seguindo essas evidências, muitas técnicas usando a guta-percha termoplastificada têm sido propostas, com o objetivo de tornar o procedimento mais fácil e mais rápido, levando a um maior índice de sucesso.

O objetivo deste estudo foi comparar duas técnicas de obturação do SCR utilizando a guta-percha termoplastificada, verificando sua eficiência em oferecer uma barreira física à infiltração do *E. faecalis*. Foram utilizados os aparelhos Easy Pack WL (Easy Equipamentos Odontológicos, Belo Horizonte, Brasil), e o Touch'n Heat (SybronEndo, Orange, Canadá) associado ao Obtura II (Obtura Spartan, Missouri, USA).

MATERIAL E MÉTODOS

Seleção e preparo da amostra

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUC Minas. Foram selecionados, através de inspeção clínica e radiográfica, 62 dentes humanos unirradiculados, com raízes retas, ápices completamente formados e comprimento mínimo de 13 mm, medidos da linha cervical até o ápice radicular, extraídos com indicação terapêutica, por motivos diversos. Os critérios de inclusão foram dentes livres de fraturas, reabsorções, calcificações e cáries radiculares, além de canais que não tivessem sido instrumentados e/ou obturados.

Após a permanência dos dentes em solução de formaldeído a 10% durante o período de coleta, realizou-se a desinfecção em hipoclorito de sódio 2,5% por 12 horas. Os dentes foram lavados em água corrente e os tecidos aderidos à superfície radicular removidos com ultra-som e curetas para raspagem periodontal. Durante esta etapa os dentes foram mantidos em água destilada e hipoclorito de sódio 2,5%, na proporção de 10:1 ⁽¹³⁾. O estudo piloto foi realizado com o objetivo de treinamento de um único operador para realização das técnicas propostas.

Em seguida, os espécimes foram inseridos em uma matriz, para que suas coroas fossem seccionadas com disco de diamante 7016 (KG Sorensen, Barueri, Brasil) sob irrigação, padronizando o comprimento da raiz em 13 mm. Uma lima tipo K # 10 (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Switzerland) foi introduzida no canal radicular para checar a patência através da visualização da mesma pelo forame apical, antes e após a instrumentação. O comprimento de trabalho (CT) estabelecido foi de 1 mm aquém do comprimento medido entre a ponta do instrumento e a referência cervical.

Os canais radiculares foram instrumentados pela técnica de Oregon adaptada ⁽¹⁴⁾, sendo que a lima K # 40 foi o último instrumento utilizado no comprimento de trabalho com a

finalidade de criar um batente apical, que fosse capaz de conter o material obturador. Após o emprego de cada instrumento procedeu-se a irrigação com 2 mL de hipoclorito de sódio a 5,2%. Ao final da instrumentação os canais radiculares foram inundados com EDTA a 17% (Odahecam Herpo Produtos Dentários LTDA, Rio de Janeiro, Brasil), por 3 minutos, sob constante agitação, com o objetivo de se remover a *smear layer*. Em seguida realizou-se nova irrigação com 2 mL de hipoclorito de sódio a 5,2% e 2 mL de soro fisiológico. Antes da obturação os dentes foram secos com cones de papel absorventes estéreis não estandardizados, calibre M (Endpoints, Paraíba do Sul, Brasil).

Os dentes foram distribuídos em dois grupos experimentais de acordo com a técnica de obturação, tendo 25 amostras cada, um grupo controle positivo e um grupo controle negativo, cada um com 6 dentes. Para todos os grupos foi utilizado o cimento endodôntico Pulp Canal Sealer EWT (SybronEndo Corporation, Orange, Canadá) manipulado de acordo com as orientações do fabricante. Após o preenchimento dos canais, os dentes foram radiografados com filmes periapicais (Kodak, Eastman Kodak Company, Rochester, USA) com tomadas orto e mesio-anguladas para verificar a correta obturação do canal radicular. Depois de obturados, os dentes foram mantidos em umidade por duas semanas, até o momento da montagem das plataformas.

Grupo 1: Easy Pack WL

A ponta condutora de calor (SybronEndo Corporation) foi selecionada para alcançar 5 mm do ápice, e adaptada na caneta termo-condutora do aparelho Easy Pack WL. Um cone de guta percha tamanho M (Obtura Spartan, Jalisco, México) foi ajustado, cimentado e cortado na entrada do canal utilizando-se a ponta condutora de calor, seguida de uma condensação inicial com um condensador manual 4 ou 5. Para a obturação do terço apical a ponta condutora de calor foi acionada com leve pressão apical até atingir 5 mm do ápice. Após o resfriamento da ponta, a pressão apical foi mantida por mais 10 segundos, antes de acioná-la

novamente para retirá-la de dentro do canal. Com um condensador manual número 2, foi realizada uma condensação vertical do terço apical para acomodação da guta-percha e simultaneamente a limpeza das paredes do canal. Um compactador mecânico de McSpadden # 35 adaptado ao contra-ângulo foi inserido no bico do injetor de guta-percha Easy Pack WL e removido girando no sentido anti-horário para que se formasse um bastão homogêneo de guta percha plastificada (Endpoints, Paraíba do Sul, Brasil). Imediatamente o compactador coberto por guta percha foi levado dentro do canal até atingir a guta percha remanescente e em seguida acionado no sentido horário por cinco segundos. O compactador foi retirado do canal ainda em rotação com leve pressão contra as paredes do canal, e realizada nova condensação manual, com os condensadores 4 ou 5.

Grupo 2: Touch'n Heat e Obtura

Para obturação do terço apical foi selecionada uma ponta condutora de calor para o Touch'n Heat compatível com o diâmetro do canal, sendo colocado um cursor de borracha, limitando a penetração a 5 mm do CT. Um cone de guta percha tamanho M (Obtura Spartan), foi ajustado ao canal e cimentado. O Touch'n Heat foi acionado e introduzido através da guta-percha até o limite imposto pelo cursor e desligado, mantendo-se uma pressão apical por 10 segundos. Ainda sob a pressão apical, o aparelho foi novamente acionado por 1,5 segundos antes de ser removido. Os terços médio e cervical foram obturados com a guta percha plastificada (Obtura Spartan) pelo Obtura II. O aparelho foi previamente ligado até atingir a temperatura de 200° C, e a agulha calibre 23 (Obtura Spartan) inserida dentro do canal até encontrar a guta-percha remanescente, o gatilho foi acionado para que uma porção de guta percha plastificada se depositasse dentro do canal, para em seguida ser condensada com um condensador manual número 3. A operação foi repetida para o completo preenchimento do canal, e realizada uma condensação final com um condensador manual número 4 ou 5.

Grupos Controle

O grupo controle negativo foi composto por seis dentes, instrumentados obturados e totalmente impermeabilizados. Após a presa dos agentes impermeabilizantes, os dentes foram inseridos em Eppendorfs para se dar continuidade à montagem do aparato.

O grupo controle positivo foi composto por seis dentes preparados, instrumentados e impermeabilizados na superfície externa, exceto o orifício da entrada do canal e os 3 mm apicais, porém preenchidos apenas com um cone único de guta-percha sem a presença de cimento.

Para testar a infiltração bacteriana foi utilizado o método de duas câmaras, consistindo em uma estrutura composta por um frasco de vidro de 10 mL (Wheaton do Brasil, São Bernardo do Campo, Brasil), com tampa de borracha de 20 mm de diâmetro (Adnaloy Artefatos de Borracha Ltda., São Paulo, Brasil) perfurada no centro, deixando um orifício de 11 mm de diâmetro e um tubo tipo Eppendorf de 1,5 mL (Cral Comércio e Artigos para Laboratório Ltda., São Paulo, Brasil) que tiveram 7 mm de sua extremidade cortados com um disco de carborundum.

A porção inferior do Eppendorf foi flambada, para conferir plasticidade ao tubo e melhorar a adaptação dente-tubo e o dente pressionado dentro do Eppendorf, até se adaptar de forma justa na região cervical da raiz. A pressão foi mantida até o resfriamento do tubo. Os conjuntos dente-Eppendorf foram numerados, e demarcados os 3 mm apicais do dente que não receberiam a impermeabilização. No restante da raiz e na junção tubo-dente foram aplicadas duas camadas de cianocrilato (Super Bonder, Henkel Loctite Adesivos Ltda., Itapevi, Brasil) com intervalo de 1 hora entre elas, mantendo os dentes à temperatura ambiente, até a secagem, quando foi aplicada uma camada de esmalte para unhas (Colorama Cremoso, Procosa Produtos de Beleza Ltda., São Paulo, Brasil), também aguardando uma hora para secagem. A junção tubo-dente foi vedada com fitas de resina Epóxi (Durepóxi,

Henkel Loctite), com objetivo de garantir um selamento adequado. Sobre a resina Epóxi e a superfície radicular impermeabilizada, foi pincelada uma camada de cianocrilato e outra camada de esmalte para unhas. Os espécimes foram mantidos à temperatura ambiente por um período de 24 horas para assegurar a completa presa dos agentes impermeabilizantes. Decorrido esse tempo, todos os elementos do aparato teste, foram identificados e embalados individualmente em papel grau cirúrgico (Baumer, Mogi - Mirim, Brasil) e encaminhados para esterilização em Óxido de Etileno (Central ETO, Belo Horizonte, Brasil).

Em câmara de fluxo laminar foi realizada a abertura das embalagens estéreis com os elementos do aparato teste, assim como o recipiente contendo o meio de cultura líquido Brain Heart Infusion (BHI; Difco Laboratories, Detroit, EUA) estéril, para a montagem da plataforma de fixação e a distribuição do meio de cultura nos frascos de vidro.

Os conjuntos dente-Eppendorf foram introduzidos dentro dos frascos de vidro com as tampas de borracha de forma que 3 mm de estrutura dentária ficassem imersos no meio de cultura. Durante a montagem do aparato foram respeitados os preceitos da técnica asséptica e de biossegurança, utilizando-se de campo estéril na superfície da capela de fluxo laminar e luvas estéreis para o manuseio dos artigos, durante todo o experimento.

Inoculação microbiana

Foi utilizado um microrganismo indicador proveniente de American Type Culture Collection (ATCC)- *Enterococcus faecalis* (ATCC 4083 TM). A cepa de *E. faecalis* foi descongelada, recuperada e mantida em caldo BHI e incubada a 37°C por 24 horas, quando foi semeada em ágar BHI. Suspensões bacterianas foram preparadas a partir deste crescimento em meio sólido, após 24 horas de incubação. As inoculações microbianas foram realizadas a cada 72 horas durante 60 dias. Para isso era preparada uma suspensão bacteriana com 5 mL de água destilada esterilizada até se obter turbidez correspondente a escala 1 de McFarland (3×10^8 células/ mL). De cada suspensão microbiana retirava-se 1 mL para o

preparo de nova suspensão em 5 mL de caldo BHI, sendo esta empregada para inoculação dos espécimes. A partir destas suspensões, alíquotas de 0,1mL eram inoculadas na parte superior de cada Eppendorf, a cada 72 horas e todo o conjunto, incubado em estufa bacteriológica a 37°C, em condições de aerobiose.

A viabilidade do microorganismo indicador foi testada no momento da inoculação e também após 72 horas de permanência no interior do Eppendorf. Assim, eram escolhidos aleatoriamente dois aparatos antes de cada inoculação, e deles retiradas alíquotas de 0,1 mL da suspensão presente na parte superior do Eppendorf, bem como da suspensão microbiana recém preparada. Essas alíquotas eram então semeadas em caldo BHI e incubadas a 37°C por 24 horas, em condições de aerobiose. A turbidez destes meios de cultura indicava a viabilidade do microorganismo presente dentro dos eppendorfs assim como daqueles que seriam inoculados. Para todos os tubos contaminados foram realizadas análises microscópicas, utilizando-se do método de coloração de Gram, para verificar as características morfo-tintoriais dos microrganismos contaminantes e a origem da contaminação das amostras. A presença de características semelhantes ao microorganismo indicador confirmava a infiltração bacteriana. O observador não teve acesso à identificação das amostras, desconhecendo assim, a que grupo pertenciam.

A leitura dos resultados foi feita a cada dia do período experimental pela observação da presença ou ausência de turvação do meio de cultura na parte inferior do frasco de vidro (Fig.1) e registrada em planilhas. Os grupos foram comparados e a análise estatística realizada pelos testes Kaplan Meier, Log Rank e Qui-quadrado.



FIG. 1 - Aparato sendo inoculado com a suspensão microbiana.

RESULTADOS

Todos os espécimes do grupo controle positivo apresentaram turvação do meio de cultura em até 24 horas após a primeira inoculação, enquanto nenhum espécime do grupo controle negativo apresentou-se turvo durante os 60 dias do experimento.

O Grupo 1 apresentou 13 amostras infiltradas, sendo a primeira no primeiro dia após a inoculação e a última no 50º dia, enquanto o Grupo 2 apresentou infiltração em 12 amostras (Tabela 1), sendo a primeira no 4º dia e a última também no 50º dia. O teste de Log Rank, que compara os dados de sobrevivência à infiltração da amostra, indica que a curva de sobrevivência do Grupo 1 ficou bastante próxima da curva de sobrevivência do Grupo 2 (Fig. 2). O teste de Kaplan Meier também acusa que não houve diferença significativa entre os tratamentos, uma vez que o valor de p é superior ao nível de significância ($p > 0,05$).

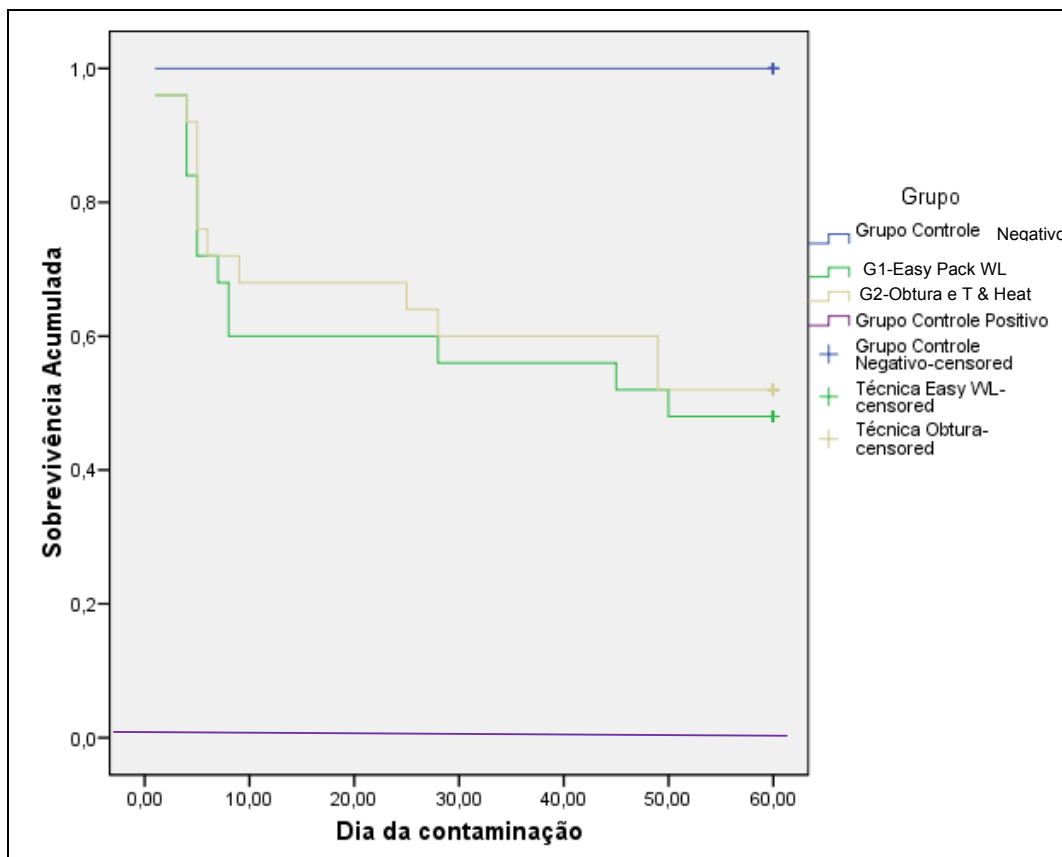


FIG. 2-Curva de sobrevivência dos grupos.

Os dois Grupos experimentais sofreram mais infiltração na primeira quinzena do experimento (Figura 3 e 4). No Grupo 1, em que foi utilizado o aparelho Easy Pack WL, 76,9% das amostras infiltradas foram contaminadas nos primeiros 10 dias, enquanto no mesmo período 58,3% do Grupo 2, no qual foram utilizados os aparelhos Obtura II e Touch'n Heat, apresentaram infiltração.

Durante o experimento 36 espécimes foram escolhidos aleatoriamente, para coleta de suspensão do Eppendorf e avaliação de viabilidade do microrganismo na câmara superior. Apenas 1 desses espécimes demonstrou não estar viável 72 horas após a inoculação.

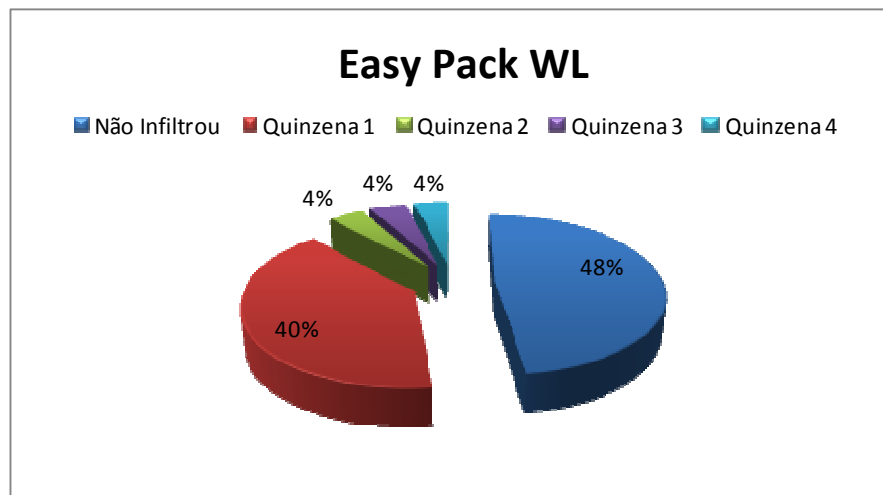


FIG. 3- Grupo 1- Comportamento em função do tempo

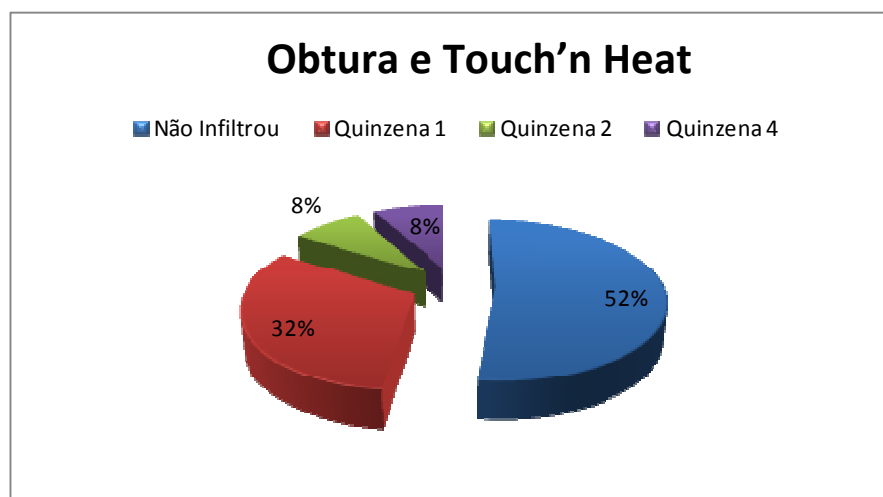


FIG. 4- Grupo 2- Comportamento em função do tempo

TABELA 1- AMOSTRAS INFILTRADAS EM CADA GRUPO

Grupos	Dia de Turvação	Nº de Amostras	%
1-Easy Pack WL	1º, 4º(3), 5º (3), 7º, 8º(2), 28º, 45º, 50º	13	52%
2- Obtura e Touch'n Heat	4º, 5º (3), 6º, 9º, 10º, 25º, 28º, 49º(2), 50º	12	48%
Controle Negativo	-	0	0
Controle Positivo	24 horas após a primeira inoculação	6	100%

DISCUSSÃO

Vários métodos experimentais foram utilizados para avaliar a eficácia dos materiais obturadores e técnicas de obturação em atuarem como barreira à micro infiltração. Dentre eles podemos citar infiltração por corantes, tinta Nanquim^(15; 16) modelo de transporte de fluido^(5; 9; 16; 17; 18), infiltração de nutrientes⁽¹⁹⁾, inoculação de bactérias ou nutrientes em dispositivo com duas câmaras, com penetração avaliada por turvação ou mudança de coloração do meio^(7; 19; 20; 21; 22; 23; 24).

Os trabalhos que usam bactérias como marcador foram introduzidos como uma alternativa às técnicas que usam corantes, e foram bem aceitos por terem maior relevância clínica. No entanto, metodologias diferentes geram resultados divergentes. O tamanho da molécula utilizada para testar a infiltração, período de exposição do dente ao agente infiltrante ou mesmo quebra da cadeia asséptica e mobilidade do microrganismo no caso de testes com bactérias são variáveis importantes a se considerar ao se analisar os resultados^(4; 25). Outros fatores como a técnica de instrumentação, técnica e material de obturação, quantidade de material obturador remanescente, modelo do aparato, seleção e concentração do microrganismo indicador, técnica de esterilização, anatomia do dente e tamanho da amostra também devem ser considerados para avaliação^(8; 26). Nos modelos *in vitro*, as variáveis são manipuladas como parte de um desenho experimental. Com isto consegue-se standardizar o método, o que não significa que ele seja clinicamente mais relevante que os outros⁽⁸⁾, pois os estudos *in vitro*, não são absolutos em reproduzir o que acontece *in vivo*. Carga microbiana, virulência do microrganismo indicador e defesa do hospedeiro explicam a diferença de resultados encontrados, *in vitro e in vivo*.

No presente estudo utilizou-se o *E. faecalis* por estar frequentemente associado a insucessos endodônticos. Embora possa estar associado também às infecções primárias, onde este microrganismo está presente em até 40% dos casos, nos retratamentos o *E. faecalis* pode

ser identificado em até 77% dos casos de insucesso ⁽²⁷⁾. Sendo assim, embora o *E. faecalis* seja apenas um dos microrganismos presente em infecções de canais radiculares, sua eliminação dos canais radiculares durante a formatação e limpeza dos canais, associada a uma obturação que permita a formação de uma barreira química e mecânica à invasão destes microrganismos nos aproxima do sucesso na terapia endodôntica. São vários os fatores de virulência e sobrevivência deste microrganismo como capacidade de sobreviver por longos períodos de privação nutricional e resistir às terapias que empregam agentes antimicrobianos como o hipoclorito de sódio e o hidróxido de cálcio. São capazes de suprimir a ação dos linfócitos, contribuindo, também desta forma, para a falha do tratamento endodôntico. O *E. faecalis* possui proteases, gelatinases e proteínas colágeno-vinculantes que o ajudam a se fixar à dentina, sendo pequeno o bastante para invadir e viver nos túbulos dentinários. A sua virulência também pode ser justificada pela propriedade em formar biofilmes e alterar as respostas do hospedeiro ⁽²⁸⁾. Em estudos *in vitro*, o *E. faecalis* é adequado por ser reconhecido como patógeno associado à periodontites apicais persistentes em dentes endodonticamente tratados, terem pouca exigência nutricional, crescimento rápido e fácil cultura. Tendo sido empregado com sucesso em vários estudos de infiltração bacteriana ^(7; 21). Acredita-se que a carga microbiana da suspensão inoculada e o período estabelecido para re-inoculação de uma suspensão microbiana fresca são fatores que influenciam diretamente nos resultados. Neste estudo foi realizada uma suspensão bacteriana acrescentando 1 mL de uma suspensão com água destilada com turbidez correspondente a escala 1 de McFarland (3×10^8 células/ mL), em 5 ml de caldo BHI, resultando em uma concentração aproximada de $1,6 \times 10^7$ unidades formadoras de colônia /mL (UFC/mL).

Brosco *et al.* ⁽⁷⁾ em seu trabalho sobre infiltração bacteriana testaram 4 técnicas de obturação, das quais três utilizaram guta-percha termoplastificada. Apesar de terem radiografado todos os dentes após a obturação, para checar a qualidade da condensação e

constatar ausência de espaços vazios, os autores perceberam que 56% das amostras que turvaram o caldo BHI, infiltraram nos três primeiros dias do experimento. A suspensão bacteriana utilizada por eles na primeira inoculação continha $6,3 \times 10^8$ CFU/mL, ou seja, a concentração foi muito maior do que a utilizada no presente estudo. No entanto, eles acompanharam o experimento durante 120 dias, e ainda assim tiveram apenas 32% da amostra infiltrada, enquanto neste experimento 50% dos espécimes infiltraram em 60 dias. É importante considerar, que os autores citados, fizeram a inoculação semanal apenas do caldo de BHI estéril, como nutriente das bactérias que foram inoculadas no eppendorf na primeira inoculação. Nos primeiros três dias, neste estudo apenas 1 espécime apresentou infiltração, porém o número de espécimes infiltrados aumentou rapidamente durante a primeira quinzena do experimento, chegando a representar 68% dos dentes contaminados. Resultados semelhantes foram encontrados por Jacobson *et al.* ⁽²⁹⁾ no grupo em que os canais foram obturados pela técnica da onda contínua de condensação, usando o Obtura em associação com o cimento Pulp Canal Sealer, 45% das amostras foram contaminadas. Embora os autores tenham usado a *Klebsiella pneumoniae* como microrganismo indicador, os resultados obtidos foram compatíveis com os resultados encontrados neste estudo. Pode-se observar que os dois microrganismos inoculados tiveram comportamentos semelhantes.

Shin *et al.* ⁽²⁾ observaram que técnicas utilizando guta-percha termoplastificada eram ineficazes em impedir a recolonização dos túbulos dentinários pelo *E. faecalis*, por permitir a infiltração de nutrientes para este microrganismo. No presente estudo, percebeu-se que mesmo o *E. faecalis*, que representa uma estrutura maior do que as moléculas de nutrientes foi capaz de permear a massa da guta-percha e cimento.

É importante ressaltar a curva de crescimento de cada microrganismo. A re-inoculação da suspensão microbiana com *E. faecalis*, neste trabalho, foi realizada a cada 3 dias, quando também eram escolhidos dois espécimes aleatoriamente para testar a sua viabilidade antes da

nova inoculação. Pôde-se constatar que, para esse teste de viabilidade, o conteúdo de um dos tubos averiguados, ao ser incubado a 37° C, demonstrou que a bactéria não estava mais viável. Pode-se especular que a ausência de viabilidade do microrganismo possa ser o motivo de um menor número de espécimes infiltrados em outros experimentos ^(7, 29).

Quanto às re-inoculações do microrganismo, as metodologias aplicadas em diversos trabalhos, constituem uma variável importante a se considerar. Shin *et al.* ⁽²⁾ substituíram o BHI com *E. faecalis* diariamente em suas amostras constituídas por blocos de dentina bovina preparados e inseridos em placas com ágar BHI, enquanto Brosco *et al.* ⁽⁷⁾ somente substituíram o caldo BHI estéril semanalmente. De Deus *et al.* ⁽²³⁾ utilizando um modelo de estudo semelhante ao utilizado neste trabalho, substituíram a saliva do mesmo doador a cada 3 dias, e em 100 dias de experimento observaram que no grupo de dentes obturados pela técnica da condensação vertical da guta-percha aquecida 84,21% das amostras não apresentaram infiltração.

Na amostra do grupo controle positivo, esperava-se que o microrganismo infiltrasse em todos os espécimes, para isto foi colocada a guta-percha sem cimento, simulando uma obturação deficiente. Este tipo de simulação também foi utilizado por outros autores ^(7; 8; 18; 29; 30). No presente estudo todos os espécimes do grupo controle positivo, mostraram infiltração em 24 horas após a primeira inoculação, resultados estes também encontrados nos grupos controle positivo de outros trabalhos que utilizaram inoculação bacteriana ^(7; 22; 29; 24). No grupo controle negativo, o objetivo foi testar a eficiência do aparato em impedir a infiltração bacteriana e por isso os dentes foram totalmente impermeabilizados. A contaminação de um espécime do grupo controle negativo poderia invalidar o experimento, demonstrando que teria ocorrido infiltração por outra região da câmara superior do aparato, que não o canal radicular ^(8; 21). Neste estudo não ocorreu contaminação em nenhum espécime do grupo controle negativo.

Além da espécie bacteriana usada, problemas com assepsia durante o experimento também poderiam interferir nos resultados ⁽⁴⁾. No presente estudo, para reduzir os riscos de contaminação bacteriana, os dentes foram esterilizados em óxido de etileno após a obturação, inserção no eppendorf e impermeabilização. A finalização da montagem do aparato e as re-inoculações a cada três dias foram feitas em câmara de fluxo laminar e os espécimes manuseados dentro de rígidos padrões de assepsia e biossegurança. Vários tipos de esterilização são utilizados em metodologias que pretendem avaliar a contaminação microbiana como forma de assegurar a descontaminação da amostra a ser investigada. Neste trabalho, durante a fase de coleta, que durou 60 dias, os dentes foram armazenados em formaldeído a 10%. A imersão em formaldeído a 10% por 7 dias seria o suficiente para promover a desinfecção dos dentes extraídos ⁽³¹⁾, mas conforme protocolo proposto pelo Ministério da Saúde ⁽¹³⁾, ainda passaram pela esterilização em hipoclorito de sódio a 2,5% por 12 horas. No entanto, após a instrumentação e obturação dos dentes, foi necessária nova esterilização da amostra antes de testar a infiltração pelo *E. faecalis*. Nesta fase os meios químicos foram contra-indicados, por alterarem as propriedades químico-mecânicas dos materiais utilizados na obturação do canal, como capacidade de adesão do cimento Pulp Canal Sealer às paredes do canal, porosidade da guta-percha e contração do cimento. O calor úmido foi contra-indicado por interferir na plasticidade da guta-percha e alterar a qualidade de obturação, além dos demais componentes do aparato, como a tampa de borracha e o tubo Eppendorf. A esterilização em raios gama foi utilizada em outros estudos que avaliaram a penetração bacteriana ^(8; 21). No entanto não ficou esclarecido se os raios- γ poderiam causar alteração nas propriedades do cimento ⁽²¹⁾. O sistema de esterilização Sterrad® foi utilizado por Jacobson *et al.* ⁽²⁹⁾ que sugeriram que o óxido de etileno (ETO) poderia deixar resíduos antimicrobianos no modelo e possuir efeitos citotóxicos residuais, interferindo na viabilidade do microrganismo indicador. Entretanto em vários estudos realizados avaliando a capacidade

de diferentes microrganismos em infiltrarem no canal de dentes previamente esterilizados em ETO, houve contaminação da amostra inoculada, em diferentes graus, em função das técnicas ou materiais utilizados e testados ^(4; 7; 11; 23). Quando adotada a esterilização em óxido de etileno neste estudo, conseguiu-se promover a assepsia dos espécimes, sem comprometimento físico-químico dos materiais obturadores, e de um modo mais prático, já que as fases de obturação do canal radicular não foram realizadas em câmara de fluxo laminar. Os espécimes que apresentaram turvação do meio foram examinados pelo método Gram que constatou apenas a presença de cocos Gram positivos. Como não houve distorção das tampas de borracha, sua adaptação ao frasco de vidro foi justa e sob ligeira pressão após a inserção do tubo Eppendorf. Isto permitiu que se evitasse maior manuseio do aparato, para impermeabilização da junção tubo-tampa, e/ou tampa-vidro.

O aparelho Easy Pack WL, exigiu um tempo maior para a termoplastificação da gutapercha, aproximadamente 15 minutos contra aproximadamente 3 minutos do Obtura II. O orifício de saída da gutapercha tem um diâmetro de 1,75 mm, o que proporcionou uma maior quantidade de gutapercha dispensada a cada acionamento do êmbolo, resultando às vezes em desperdício e um maior consumo do material. O sistema de acionamento do Easy Pack WL é através do pressionamento de um êmbolo que se encontra na parte posterior da seringa injetora de gutapercha, e que apresenta determinada resistência à pressão exigindo uma força moderada com uma das mãos enquanto a outra permanece segurando o contra-ângulo onde está encaixado o compactador de McSpadden. A ponta condutora de calor que se adapta na ponta da caneta termo-compactadora do Easy Pack foi da mesma marca que o utilizado para o Touch'n Heat, sendo que estava entre as marcas recomendadas pelo fabricante do Easy WL. Para acomodação da gutapercha e eliminação de espaços vazios no interior da obturação, os dentes obturados pelas duas técnicas foram submetidos a uma condensação final com os condensadores manuais.

CONCLUSÕES

A obturação do sistema de canais radiculares obtida pelas duas técnicas utilizando a guta-percha termoplastificada teve comportamento similar frente à infiltração bacteriana. Nenhuma das técnicas testadas neste estudo foi capaz de impedir completamente a infiltração do *Enterococcus faecalis* nos 60 dias do experimento.

Os primeiros dez dias do experimento demonstraram ser o período em que ocorreu a infiltração bacteriana em um maior número de espécimes.

REFERÊNCIAS

1. Schilder H. Filling root canals in three dimensions. *Dent Clin North Am* 1967;11:723-44.
2. Shin SJ, Jee SW, Song JS, Jung IY, Cha JH, Kim E. Comparison of regrowth of *Enterococcus faecalis* in dentinal tubules after sealing with gutta-percha or Resilon. *J Endod* 2008; 34 (4): 445-8.
3. De Deus QD. Frequency, location, and direction of the lateral, secondary, and accessory canals. *J Endod* 1975; 1(11):361-6.
4. Gilbert SD, Witherspoon DE, Berry CW. Coronal leakage following three obturation techniques. *Int Endod J* 2001; 34(4): 293-9.
5. Pommel L, Camps J. In vitro apical leakage of system B compared with other filling techniques. *J Endod* 2001; 27(7):449-51.
6. Venturi M. Evaluation of canal filling after using two warm vertical gutta-percha compaction techniques in vivo: a preliminary study. *Int Endod J* 2006; 39(7): 538-46.
7. Brosco VH, Bernardineli N, Torres SA, Consolaro A, Bramante CM, de Moraes IG *et al.* Bacterial leakage in root canals obturated by different techniques. Part 1: microbiologic evaluation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008; 105(1): e48-53.

8. Barrieshi KM, Walton RE, Johnson WT, Drake DR. Coronal leakage of mixed anaerobic bacteria after obturation and post space preparation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1997; 84(3):310-4.
9. Wu MK, Van Der Sluis LW, Wesselink PR. Fluid transport along gutta-percha backfills with and without sealer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004;97(2):257-62.
10. Pizzo G, Giammanco GM, Cumbo E, Nicolosi G, Gallina G. In vitro antibacterial activity of endodontic sealers. *J Dent* 2006; 34(1):35-40.
11. De-Deus G, Coutinho-Filho T, Reis C, Murad C, Paciornik S. Polymicrobial leakage of four root canal sealers at two different thicknesses. *J Endod* 2006; 32(10):998-1001.
12. Pagavino G, Giachetti L, Nieri M, Giuliani V, Scaminaci Russo D. The percentage of gutta-percha-filled area in simulated curved canals when filled using Endo Twinn, a new heat device source. *Int Endod J* 2006; 39(8):610-5.
13. Ministério da Saúde (Brasil). Normas técnicas para controle de AIDS e outras infecções virais na prática odontológica. 2 ed. Brasília: Ago. 1989.
14. Deus QD, Endodontia, 5 ed, Rio de Janeiro, MEDSI,1992, p.342-3.

15. Lyroudia K, Pantelidou O, Mikrogeorgis G, Chatzikallinikidis C, Nikopoulos N, Pitas I. The use of 3D computerized reconstruction for the study of coronal microleakage. *Int Endod J* 2000; 33(3): 243-7.
16. Pallarés A, Faus V. A comparative study of the sealing ability of two root canal obturation techniques. *J Endod* 1995; 21(9):449-50.
17. Pommel L, Camps J. Effects of pressure and measurement time on the fluid filtration method in endodontics. *J Endod* 2001; 27(4):256-8.
18. Biggs SG, Knowles KI, Ibarrola JL, Pashley DH. An in vitro assessment of the sealing ability of resilon/epiphany using fluid filtration. *J Endod* 2006; 32(8):759-61.
19. Kaya BU, Kececi AD, Belli S. Evaluation of the sealing ability of gutta-percha and thermoplastic synthetic polymer-based systems along the root canals through the glucose penetration model. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007; 104(6):e66-73.
20. Torabinejad M, Ung B, Kettering JD. In vitro bacterial penetration of coronally unsealed endodontically treated teeth. *J Endod* 1990; 16(12):566-9.
21. Padachey N, Patel V, Santerre P, Cvitkovitch D, Lawrence HP, Friedman S. Resistance of a novel root canal sealer to bacterial ingress in vitro. *J Endod* 2000; 26(11):656-9.

22. Carratù P, Amato M, Riccitiello F, Rengo S. Evaluation of leakage of bacteria and endotoxins in teeth treated endodontically by two different techniques. *J Endod* 2002; 28(4):272-5.
23. De Deus G, Murad CF, Reis CM, Gurgel-Filho E, Coutinho Filho T. Analysis of the sealing ability of different obturation techniques in oval shaped canals: a study using a bacterial leakage model. *Braz Oral Res* 2006; 20(1):64-9.
24. Pitout E, Oberholzer TG, Blignaut E, Molepo J. Coronal leakage of teeth root-filled with gutta-percha or Resilon root canal filling material. *J Endod* 2006; 32(9):879-81.
25. Veríssimo DM, Vale MS. Methodologies for assessment of apical and coronal leakage of endodontic filling materials: a critical review. *Journal of Oral Sci* 2006; 48(3): 93-98.
26. Miletić I, Prpić-Mehićić G, Marsan T, et al. Bacterial and fungal microleakage of AH26 and AH Plus root canal sealers. *Int Endod J* 2002; 35(5):428-32.
27. Rôças IN, Siqueira JF Jr, Santos KR. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod* 2004; 30(5):315-20.
28. Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J Endod* 2006;32(2):93-8. Review.
29. Jacobson HL, Xia T, Baumgartner JC, Marshall JG, Beeler WJ. Microbial leakage evaluation of the continuous wave of condensation. *J Endod* 2002;28(4):269-71.

30. Celik EU, Yapar AG, Ateş M, Sen BH. Bacterial microleakage of barrier materials in obturated root canals. *J Endod* 2006; 32(11):1074-6.

31. Kumar M, Sequeira PS, Peter S, Bhat GK. Sterilisation of extracted human teeth for educational use. *Indian J Med Microbiol* 2005; 23(4):256-8.