UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

Murilo Priori Alcalde

**Influência da agitação ultrassônica do cimento obturador
na ação antimicrobiana intra-dentinária e no
preenchimento de istmos em canais mesiais de molares
inferiores**

**BAURU
2015**

Murilo Priori Alcalde

**Influência da agitação ultrassônica do cimento obturador
na ação antimicrobiana intra-dentinária e no
preenchimento de istmos em canais mesiais de molares
inferiores.**

Dissertação apresentada a Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Endodontia.

Orientador: Prof. Dr. Clovis Monteiro Bramante

Versão Corrigida

**BAURU
2015**

AI16i

Murilo Priori Alcalde

Influência da agitação ultrassônica do cimento obturador na ação antimicrobiana intra-dentinária e no preenchimento de istmos em canais mesiais de molares inferiores / Murilo Priori Alcalde. – Bauru, 2015.

125 p. : il. ; 30cm.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo

Orientador: Prof. Dr. Clovis Monteiro Bramante

Nota: A versão original desta dissertação encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP.

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação/tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP
CAAE nº: 34804514.8.0000.5417
Data: 10/09/2014

Murilo Priori Alcalde

DADOS CURRICULARES

14 de janeiro de 1988

Nascimento

Jaú-São Paulo

Filiação

Jorge Luiz Alcalde

Eliana Alves Priori Alcalde

2008 - 2011

Graduação em Odontologia Universidade
de São Paulo- FOB/USP

2012 - 2013

Especialização em Endodontia
Universidade de São Paulo- FOB/USP-
Bauru

2013 - 2015

Pós-graduação, mestrado, área
Endodontia Faculdade de Odontologia de
Bauru Universidade de São Paulo

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha família. A base fundamental, para que minha vida tenha sentido.

Dedico este trabalho a Deus pois graças a ele tenho uma família e amigos maravilhosos, os quais sempre me apoiaram nesta jornada. Além disso, ele sempre me deu força e esperança para continuar em pé nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais, Jorge Alcalde e Eliana Alcalde, por todo apoio, dedicação e confiança depositados em mim durante todo este período. Obrigado pelo apoio e amor incondicional! Vocês são e sempre serão exemplos para mim, AMO vocês mais que tudo nessa vida.

Aos meus irmãos Rafael, Otávio, Flávia e Marina vocês sem dúvida são o maior legado e o maior presente que nossos pais poderiam ter me dado! Obrigado por fazerem parte da minha e sempre estar ao meu lado!

As minhas cunhadas Fernanda e Thatiana que além de serem pessoas maravilhosas me proporcionaram a alegria de ser tio! Fato este impossível de mensurar o amor que tenho pelo Daniel e pelo Vinícius.

Aos meus sobrinhos Daniel e Vinícius fontes de amor e alegria. Amo muito vocês!

Aos meus avós (in memoriam), Décio e Dalva que estão vivos em minha memória e em meu coração. É muito difícil não poder ver vocês. A saudade é imensa. Sei que vocês sempre estão olhando por nós. Obrigado por tudo. Amo vocês.

Aos meus avós José Alcalde e Odila que sempre nos deram carinho, amor . Vocês são exemplos de honestidade e conduta. Obrigado pela dedicação e preocupação, vocês são essenciais na nossas vidas!

Aos meus Tios Maurício e Gladis que sempre estiveram à disposição dos seus sobrinhos! Obrigado pelo amor e toda ajuda principalmente nos momentos mais difíceis! O apoio seus foi fundamental para minha formação e meu amadurecimento!

A minha madrinha, conhecida como Tia Bete, por sempre demonstrar amor e preocupação comigo! Obrigado por fazer parte da minha vida! Você é uma pessoa incrível!

Aos meus tios Carlos e Lúcia por todo carinho, amor e preocupação!

Aos meus primos Olavo, Gustavo e Guilherme pela infância feliz que tivemos juntos e por todo carinho !

A minha namorada Natalia Favoretto que soube ter paciência e compreender minha ausência em alguns momentos. No entanto, nunca me deixou faltar carinho, amor e apoio! Você é muito importante na minha vida, eu te amo!

A minha Tia Elaine Priori que sempre nos deu amor e dedicou o máximo do seu tempo aos seus sobrinhos. Além disso, nos apresentou com uma jóia (Marina) após sua partida para os braços dos seus pais. Obrigado tia! (In memoriam).

Todos os esforços, sacrifícios, e sobre tudo esta imensa alegria de mais uma meta atingida, finalmente cumprida graças ao apoio de todos vocês! Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Clovis Monteiro Bramante, agradeço ao senhor pela sua disponibilidade, paciência, conselhos e humildade compartilhada durante estes anos! Aprendi muito com o senhor. Obrigado pela sua amizade e por todos ensinamentos clínicos e científicos! Tenho uma grande admiração e respeito pela sua pessoa, foi uma honra tê-lo como orientador.

Ao Prof. Dr. Marco Antonio Hungaro Duarte, por toda paciência, ajuda e conselhos desde a época da graduação e especialização. Durante o mestrado não poderia esperar uma outra atitude do senhor! Tenho uma eterna gratidão por tudo que me ensinou e me ajudou, senhor é um exemplo de pessoa e profissional.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Ricci Vivan, agradeço pela amizade, pelos ensinamentos e profissionalismo. Senhor é o exemplo de que dedicação e esforço são essenciais para o sucesso! Sua amizade foi uma grande e grata surpresa, obrigado meu amigo!

Aos Professores do departamento de endodontia FOB-USP, Prof. Dr. Clovis Monteiro Bramante, Prof. Dra. Flaviana Bombarda Andrade, Prof. Dr. Ivaldo Gomes de Moraes, Prof. Dr. Marco Antonio Hungaro Duarte, Prof. Dr. Norberti Bernardineli, Prof. Dr. Roberto Brandão Garcia e Prof. Dr. Rodrigo Ricci Vivan. Obrigado por terem me ajudado na minha formação. Admiro muito vocês pela vontade de ensinar, compartilhar os conhecimentos sem receios e sobretudo, pela qualidade humana que há em todos vocês. Ernest Hemingway dizia que "O segredo da sabedoria, do poder e do conhecimento é a humildade.", característica marcante em todos vocês.

A Marcia Graeff, pela sua ajuda com o uso do Microscópio Confocal. Obrigado por sua amizade, por me receber sempre com um sorriso e ter a disposição em me ajudar.

As funcionárias do departamento de endodontia FOB-USP, Andressa Barraviera e Suely Regina Bettio. Obrigado pelaocarinho, ajuda e amizade durante estes dois anos de convivência.

Ao funcionário do departamento de endodontia FOB-USP, Edimauro de Andrade pela amizade, conselhos, broncas e ajuda. Obrigado por sempre me ajudar meu amigo!

Ao Prof. Dr. Ricardo Affonso Bernardes pelos conselhos, conversas e toda ajuda mesmo estando distante de Bauru. Saiba que o considero como um grande amigo e tenho muito respeito alta capacidade profissional que o senhor possui. Muito obrigado!

Aos meus amigos de turma do mestrado, Samuel Lucas Fernandes, Layla Vasconelos, Thaís Cristina Pereira e Savio Brandeleiro, pela amizade , convivência e ajuda! Sempre estiveram dispostos de coração a ajudar, trabalhar juntos e compartilhar conhecimentos. Obrigado pela parte mais importante, a amizade.

Aaos meus amigos Bruno Píazza, Jussaro e Samuel pela convivência, amizade e risadas! Contem sempre com a minha ajuda pois sei que posso contar com vocês!

Aos meus amigos Bruno Cavenago e Pablo pela amizade e toda ajuda durante a realização deste e de outros trabalhos. A amizade e conhecimento de vocês foram essenciais neste período!

Aos meus amigos de pós-graduação Raquel, Marina, Rafaela, Clarissa, Aldo, Ronald, Denise, Francine, Talita, Lincoln, Paloma, Amanda, Marcela e Marcelo pela convivência com vocês, obrigado pela amizade !

Ao casal de amigos Bruno Guimarães e Natalia pela convivência , amizade e respeito. Obrigado por sempre estarem disponíveis e me ajudarem. Levo a amizade de vocês sempre comigo!

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, na pessoa do diretor, Profa. Dra. Maria Aparecida Moreira Machado.

À Comissão de Pós-graduação na pessoa do Prof. Dr. Guilherme dos Reis Pereira Janson

Ao Coordenador do programa da Pós-graduação em Endodontia Prof. Dr. Marco Antonio Hungaro Duarte.

Aos funcionários da pós-graduação Maria Margareth Pereira Morzaket, Ana Leticia Palombo Momesso, Fatima Cassador Carvalho, Elaine Falcão Tuler Xavier e Leila Regina da Silva Yerga Xavier por sempre estarem à disposição de ajudar e serem atenciosas, muito Obrigado!

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq pelo financiamento parcial deste projeto.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo- FAPESP, pela concessão de bolsa de estudo para a realização deste trabalho.

Ao Centro Integrado de Pesquisas da Faculdade de Odontologia de Bauru-USP, na pessoa do Professor Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira.

"No que diz respeito ao desempenho, ao compromisso, ao esforço,
à dedicação, não existe meio termo. Ou você faz uma coisa bem
feita ou não faz".

Ayrton Senna

RESUMO

Avaliou-se presença de espaços vazios, presença de fendas na interface cimento/dentina, o perímetro de penetração do cimento obturador nos canais e nos istmos e a ação antimicrobiana intra-dentinária do cimento endodôntico (AH Plus) quando submetido ou não a agitação ultrassônica no momento da obturação. Para a avaliação do preenchimento de istmos foram utilizadas 30 raízes mesiais de primeiros molares inferiores, as quais foram divididas em 2 grupos (n=15). A instrumentação foi realizada com o sistema recíprocante Reciproc (R25) e finalizado com instrumento rotatório Mtwo (35.04). Em seguida, o cimento AH Plus foi espatulado com Rodamina B e foi inserido nos canais com espiral de Lentulo nº 35; o cimento do grupo 1 foi submetido a agitação ultrassônica enquanto o do grupo 2 não foi agitado, sendo que todos os canais foram obturados por meio da técnica do cone único e armazenados em estufa a 37^o C durante 7 dias. As raízes foram seccionadas transversalmente a 2, 4 e 6 mm do ápice radicular para análise em esteromicroscópio e microscopia confocal a laser. Para a avaliação da ação antimicrobiana foram utilizados 30 incisivos de bovinos, os quais foram seccionados em cilindros de 6 mm de espessura. Os canais tiveram seu diâmetro padronizado com uma lima tipo K nº 80 e então contaminados com *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) por 4 dias. Após esse período os espécimes foram divididas em 3 grupos (n=30). No grupo 1 o cimento foi agitado com o ultrassom e obturados com a técnica de cone único; no grupo 2 o cimento não foi agitado e o grupo 3 foi o grupo controle. As raízes foram seccionadas longitudinalmente no sentido vestibulo-palatino e coradas com corante LIVE/DEAD para avaliar a viabilidade bacteriana em microscopia confocal a laser. Para análise da agitação ultrassônica do cimento obturador no preenchimento de canais e istmos, foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney ($p < 0.05$) e para a análise da ação antimicrobiana intradentinária, foi utilizado o teste não paramétrico Kruskal-Wallis e o Teste Dunn ($p < 0.05$). Os resultados indicaram que a agitação ultrassônica do cimento AH Plus favoreceu o preenchimento de istmos e a penetração intratubular. A agitação ultrassônica do cimento AH Plus reduziu significativamente a viabilidade bacteriana. Conclui-se que a agitação ultrassônica do cimento AH Plus favoreceu maior penetração intratubular, menor presença de fendas, menos espaços vazios e maior ação antimicrobiana.

Palavras-chave: Obturação do canal radicular. Microscopia confocal. Ultrassom,

ABSTRACT

Influence of ultrasonic agitation of the sealer on the intratubular antimicrobial activity and on the filling quality of isthmuses in mesial roots of mandibular molars.

In this study it was assessed the presence voids, gaps in the sealer/dentin interface, the intratubular sealer penetration in canals and isthmuses and intratubular antimicrobial effect of the AH Plus sealer when ultrasonic activation was performed during obturation. 30 mesial roots of mandibular first molars were selected and divided into 2 groups (n=15). Root canal instrumentation was performed with the reciprocating system Reciproc (R25) and finished with the Mtwo (35.04) rotary instrument. Then the AH Plus sealer was mixed with Rhodamine B and was inserted into the root canals with a Lentulo spiral #35. In group 1 the ultrasonic activation of the sealer was performed while in group 2 was not activated. Then, the root canal filling was performed using the single cone technique. After 7 days of storage the roots were sectioned at 2, 4 and 6 mm from the apex and analyzed in the stereomicroscope and by confocal laser scanner microscopy. To the antimicrobial test 30 bovine incisors cut into cylinders with 6 mm in thickness were used. The root canals diameter was standardized with a K file # 80 and then contaminated with *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) for 4 days. After this period the samples were divided into 3 groups (n = 30). In group 1 the ultrasonic activation of the sealer was performed and filled with single cone technique; in group 2 the sealer was not ultrasonic activated and in group 3 the canals were not obturated (control group). The roots were sectioned in the buccal-palatal direction and stained with LIVE / DEAD stain to assess the bacterial viability by confocal laser microscopy. For analysis of ultrasonic activation of the sealer on the filling quality of the canals and isthmuses, a non-parametric Mann-Whitney test ($p < 0.05$) was used. For the analysis of the intra-dentin antimicrobial action, a Kruskal-Wallis nonparametric and Dunn's test was used ($p < 0.05$). The results showed that the ultrasonic agitation of the AH Plus sealer favored the isthmus filling and the intratubular penetration. Also, the ultrasonic activation of AH Plus sealer reduced bacterial viability. It was concluded that the ultrasonic agitation of the sealer favored higher intratubular penetration, lower presence of gaps and voids and higher antimicrobial activity.

Keywords: Root canal obturation. Confocal microscopy. Ultrasonics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Microtomógrafo SkyScan modelo 1174 (SkyScan, Kontich, Bélgica).	53
Figura 2	- (A) Análise da morfologia interna (em vermelho) evidenciando a presença de istmos nas raízes mesiais. (B) Modelo tridimensional da anatomia interna dos 6mm apicais (em vermelho os canais radiculares, em cinza a região de istmos).	53
Figura 3	- (A) Canais tipo I e IV da classificação de Vertucci (1984). (B) Istmo do Tipo V da classificação de Hsu & Kim (2010).	54
Figura 4	- Ponta de ultrassom Irrisonic direcionada para o istmo para agitação do cimento obturador.	55
Figura 5	- Representação da obtenção das 3 secções e o modo que foram fixadas nas lâmina de vidro para análise em estereomicroscopia e microscopia confocal a laser	56
Figura 6	- (A) Imagem representativa de uma secção vista no estereomicroscópio. (B) Linha amarela representando a delimitação da área do canal. (C) Linha amarela representando a delimitação da área do istmo.	57
Figura 7	- Mensuração do perímetro total das paredes dentinárias do canal (mm)	58
Figura 8	- Mensuração do perímetro de penetração do cimento obturador no interior dos túbulos dentinários	59
Figura 9	- (A) Análise da interface cimento/dentina (fenda). (B) Setas em azul indicando a região de fenda	59
Figura 10	- Mensuração do perímetro de paredes dentinárias mesial e distal dos istmos.	60
Figura 11	- Mensuração do perímetro de penetração do cimento obturador no interior dos túbulos dentinários	60
Figura 12	- (A) mensuração do perímetro de fendas na área de istmo. (B) Setas azuis indicando a presença de fendas.	61

Figura 13 - (A) Cilindros de dentina radicular bovina e seu armazenamento em Eppendorf com BHI (B)	65
Figura 14 - Representação do protocolo de contaminação, troca do inóculo e centrifugação.	66
Figura 15 - Representação das áreas analisadas em microscopia confocal a laser. Os quadrados vermelhos representam a área mais superficial e os azuis a mais profunda da dentina.	66
Figura 16 - Imagens representativas A, B, C. das secções apical (2 mm), média (4 mm) e cervical (6 mm) em estereomicroscópio e D, E e F em microscopia confocal a laser do grupo em que o cimento foi agitado com ultrassom.....	77
Figura 17 - Imagens representativas A, B e C das secções apical (2 mm), média (4 mm) e cervical (6 mm) em estereomicroscópio e D, E e F em microscopia confocal a laser do grupo sem agitação com ultrassom.....	77
Figura 18 - As Imagens representativas A, B e C das secções apical (2 mm), média (4 mm) e cervical (6 mm) em estereomicroscópio e D, E e F em microscopia confocal a laser do grupo em que o cimento foi agitado com ultrassom.....	79
Figura 19 - As Imagens representativas A, B e C das secções apical (2 mm), média (4 mm) e cervical (6 mm) em estereomicroscópio e D, E e F em microscopia confocal a laser do grupo sem agitação com ultrassom.....	79
Figura 20 - Imagens representativas da viabilidade bacteriana na dentina superficial em microscopia confocal a laser: A (grupo controle), B (sem agitação ultrassônica do cimento obturador) e C (com agitação do cimento obturador). Pode se observar as bactérias vivas (verde) e mortas (vermelho).	85
Figura 21 - Imagens representativas da viabilidade bacteriana na dentina profunda em microscopia confocal a laser: A (grupo controle), B (sem agitação ultrassônica do cimento obturador) e C (com agitação do cimento obturador). Pode se observar as bactérias vivas (verde) e mortas (vermelho).	85

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 - Gráfico 1 - Gráfico apresentando a mediana, intervalo mínimo e máximo da porcentagem de bactérias viáveis na dentina superficial dos grupos: Controle superficial (CS), Sem ultrassom superficial (SUSS) e Com Ultrassom superficial (CUSS). Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0.05$).....81
- Gráfico 2 - Gráfico apresentando a mediana, intervalo mínimo e máximo da porcentagem de bactérias viáveis na dentina profunda dos grupos: Controle profundo (CP), Sem ultrassom Profundo (SUSP) e Com Ultrassom profundo (CUSP). Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0.05$).....82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Mediana e intervalo Mínimo e Máximo das quantidades, em porcentagem, de guta-percha, cimento e vazios na secção apical (2 mm) dos canais. A sigla CUS e SUS correspondem aos cimentos ativados ou não pelo ultrassom respectivamente.	71
Tabela 2	- Mediana e intervalo Mínimo e Máximo das quantidades, em porcentagem, de guta-percha, cimento e vazios na secção média dos canais (4 mm). A sigla CUS e SUS correspondem aos cimentos ativados ou não pelo ultrassom respectivamente.	71
Tabela 3	- Mediana e intervalo Mínimo e Máximo das quantidades, em porcentagem, de guta-percha, cimento e vazios na secção cervical (6 mm) dos canais. A sigla CUS e SUS correspondem aos cimentos ativados ou não pelo ultrassom respectivamente.	72
Tabela 4	- Mediana e intervalo Mínimo e Máximo das quantidades, em porcentagem, de cimento e vazios na secção apical (2 mm) dos istmos. A sigla CUS e SUS correspondem aos cimentos ativados ou não pelo ultrassom respectivamente.	72
Tabela 5	- Mediana e intervalo Mínimo e Máximo das quantidades, em porcentagem, de cimento e vazios na secção média (4 mm) dos istmos. A sigla CUS e SUS correspondem aos cimentos ativados ou não pelo ultrassom respectivamente.	72
Tabela 6	- Mediana e intervalo Mínimo e Máximo das quantidades, em porcentagem, de cimento e vazios na secção cervical (6 mm) dos istmos. A sigla CUS e SUS correspondem aos cimentos ativados ou não pelo ultrassom respectivamente.	73
Tabela 7	- Mediana e intervalo Mínimo e Máximo das quantidades, em porcentagem, de Fendas e Perímetro de penetração no terço apical (2 mm) dos canais. A sigla CUS e SUS correspondem aos cimentos ativados ou não pelo ultrassom respectivamente.	73

Tabela 8 - Mediana e intervalo Mínimo e Máximo das quantidades, em porcentagem, de Fendas e Perímetro de penetração na secção média (4 mm) dos canais. A sigla CUS e SUS correspondem aos cimentos ativados ou não pelo ultrassom respectivamente.....	74
Tabela 9 - Mediana e intervalo Mínimo e Máximo das quantidades, em porcentagem, de Fendas e Perímetro de penetração na secção cervical (6 mm) dos canais. A sigla CUS e SUS correspondem aos cimentos ativados ou não pelo ultrassom respectivamente.....	74
Tabela 10 - Mediana e intervalo Mínimo e Máximo das quantidades, em porcentagem, de Fendas e Perímetro de penetração na secção apical (2 mm) dos istmos. A sigla CUS e SUS correspondem aos cimentos ativados ou não pelo ultrassom respectivamente.....	75
Tabela 11 - Mediana e intervalo Mínimo e Máximo das quantidades, em porcentagem, de Fendas e Perímetro de penetração na secção média (4 mm) dos istmos. A sigla CUS e SUS correspondem aos cimentos ativados ou não pelo ultrassom respectivamente.....	75
Tabela 12 - Mediana e intervalo Mínimo e Máximo das quantidades, em porcentagem, de Fendas e Perímetro de penetração na secção cervical (6 mm) dos istmos. A sigla CUS e SUS correspondem aos cimentos ativados ou não pelo ultrassom respectivamente.....	75
Tabela 13 - Mediana e intervalo Mínimo e Máximo de Biovolume, em μm^3 , dos grupos avaliados no teste antimicrobiano na dentina superficial. As siglas CUSS, SUSS e CS correspondem ao grupo em que o cimento obturador foi agitado com o ultrassom, sem agitação ultrassônica e grupo controle, da dentina superficial respectivamente	83
Tabela 14 - Mediana e intervalo Mínimo e Máximo de Biovolume, em μm^3 , dos grupos avaliados no teste antimicrobiano na dentina superficial. As siglas CUSS, SUSS e CS correspondem ao grupo em que o cimento obturador foi agitado com o ultrassom, sem agitação ultrassônica e grupo controle, da dentina profunda respectivamente	83

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

%	percentagem
+	mais
x	vezes
<	menor
>	maior
°C	grau Celsius
EDTA	ácido etileno diaminotetracético
g	grama
mm	milímetro
mL	mililitro
uL	microlitro
NaOCL	hipoclorito de sódio
P	significância estatística
um	micrometro
UFC	Unidade Formadora de Colônia
CRCS	Calciobiotic Root Canal Sealer
CUS	com ultrassom
SUS	sem ultrassom
BHI	Brain Heart Infusion
n	número
o	grau
TIFF	Tagged Image File Format
Pixel	picture element
CUSS	com ultrassom superficial
SUSS	sem ultrassom superficial
CUSP	com ultrassom profundo
SUSP	sem ultrassom profundo
CP	controle profundo
CS	controle superficial

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	25
2.1	ATIVAÇÃO ULTRASSÔNICA.....	27
2.2	MICROSCOPIA CONFOCAL A LASER	34
2.3	PROPRIEDADE ANTIMICROBIANA DO CIMENTO AH PLUS.....	40
3	PROPOSIÇÃO	45
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	49
4.1	SELEÇÃO E PREPARO DOS ESPÉCIMES	51
4.2	OBTURAÇÃO DOS CANAIS	54
4.3	SECCIONAMENTO DOS ESPÉCIMES PARA ANÁLISE EM MICROSCOPIA	55
4.4	AVALIAÇÃO EM ESTEREOMICROSCOPIA.....	56
4.5	AVALIAÇÃO EM MICROSCOPIA CONFOCAL A LASER.....	57
4.6	AÇÃO ANTIMICROBIANA INTRA-DENTINÁRIA	61
4.6.1	PREPARO DOS CANAIS DE DENTES DE BOVINOS.....	61
4.6.2	CONTAMINAÇÃO DOS CILINDROS DE DENTINA.....	62
4.6.3	OBTURAÇÃO DOS CILINDROS DE DENTINA	63
4.6.4	ANÁLISE EM MICROSCOPIA CONFOCAL A LASER.....	64
4.7	ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	67
5	RESULTADOS	69
5.1	DA OBTURAÇÃO DOS CANAIS	71
5.1.1	ANÁLISE EM ESTEREOMICROSCOPIA.....	71
5.1.2	ANÁLISE EM MICROSCOPIA CONFOCAL A LASER.....	73
5.2	ANÁLISE DA AÇÃO ANTIMICROBIANA INTRA-DENTINÁRIA EM MICROSCOPIA CONFOCAL A LASER	81

6	DISCUSSÃO	87
6.1	DISCUSSÃO DAS METODOLOGIAS	89
6.1.1	DISCUSSÃO DA METODOLOGIA DE OBTURAÇÃO	89
6.1.2	DISCUSSÃO DA AÇÃO ANTIMICROBIANA INTRA-DENTINÁRIA	93
6.2	DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	95
6.2.1	DISCUSSÃO DOS RESULTADOS DA OBTURAÇÃO	95
6.2.2	DISCUSSÃO DOS RESULTADOS DA AÇÃO ANTIMICROBIANA INTRA-DENTINÁRIA	99
7	CONCLUSÕES	103
	REFERÊNCIAS	107
	ANEXOS.....	121

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

O principal objetivo da terapia endodôntica é remover restos pulpares e micro-organismos do sistema de canais radiculares. Todavia, devido à complexa anatomia do canal radicular mais de 50% de suas paredes permanecem sem ser tocadas (PETERS et al., 2001), o que pode interferir no sucesso do tratamento endodôntico devido a persistência de tecidos pulpares, dentina infectada e biofilmes bacterianos (SJOGREN et al., 1997; SIQUEIRA et al., 2005). O micro-organismo mais comum nos casos de retratamento é o *Enterococcus faecalis* o qual tem grande capacidade de invasão dos túbulos dentinários e apresenta grande resistência aos agentes antimicrobianos utilizados na endodontia (MAHAMMADI et al., 2011).

Schilder, em 1967, considerou que a obturação é responsável por cessar a migração de produtos de degradação bacteriana, bactérias e suas toxinas do interior do dente para os tecidos periapicais. Dentes portadores de tratamentos endodônticos insatisfatórios tendem a apresentar maior chance de fracasso (BOUCHER et al., 2002; SEGURA-EGEA et al., 2004). Portanto, a qualidade da obturação é um dos fatores que corroboram para o sucesso do tratamento endodôntico (SIQUEIRA et al., 2005; HORSTED-BINDSLEV, 2007).

Os estudos da anatomia interna dos dentes humanos em microtomografia computadorizada têm mostrado a alta complexidade do sistema de canais radiculares, sendo possível detectar presença de istmos, canais laterais, deltas apicais e outras complexidades (PLOTINO, 2006). Os primeiros molares inferiores apresentam uma incidência de istmos em 86% nas raízes mesiais (FAN et al., 2010), fator esse que deve ser considerado durante o preparo biomecânico dos mesmos, por serem áreas onde o instrumentos endodôntico não alcançam (ARCHER et al., 1992), permanecendo restos de tecido pulpar e biofilme microbiano (Burleson et al. 2007; VERA et al., 2012). A deficiência de limpeza dessas áreas está intimamente relacionada com a maior chance do fracasso do tratamento endodôntico (VON ARX, 2005; CARR et al., 2009).

A limpeza das áreas inacessíveis aos instrumentos endodônticos devem ser feitas por meio das soluções irrigadoras que tenham efeito bactericida e de dissolução de tecido orgânico e biofilme (HAAPASALO et al., 2014; DEL CARPIO-

PEROCHENA et al., 2015). No entanto, a irrigação convencional tem sua ação limitada, não conseguindo a limpeza eficiente dessas áreas (GUTARTS et al. 2005; BURLESON et al., 2007; VERSIANI et al., 2015). Diversos estudos mostraram que o ultrassom promove uma intensa agitação na solução irrigadora, promovendo um efeito mecânico que auxilia na remoção de debris e micro-organismos dos canais radiculares (GUTARTS et al. 2005; HARRISON et al., 2010; van der SLUIS et al., 2007). O ultrassom tem sido muito utilizado na irrigação e em outras etapas do tratamento endodôntico, porém pouco se tem explorado com relação ao seu emprego na obturação.

Os materiais obturadores são divididos em sólidos e plásticos. Os em estado sólidos são representados pelos cones de guta-percha, sendo caracterizados pela insolubilidade, estabilidade dimensional, e falha na adaptação às paredes do canal radicular. Já os plásticos são representados pelos cimentos e pastas obturadoras, e são os responsáveis pelo preenchimento dos espaços não passíveis de serem preenchidos pelos materiais sólidos. As características ideais dos materiais obturadores são: biocompatibilidade, estabilidade dimensional, radiopacidade, facilidade de manipulação, insolubilidade aos fluidos bucais, poder bacteriostático e adaptabilidade às paredes do canal radicular (SCHILDER, 1967). Para De Deus et al. (2003) nenhum dos cimentos obturadores apresenta todas as propriedades ideais.

O cimento obturador tem a função de preencher os espaços onde a guta-percha não pode penetrar como por exemplo, os túbulos dentinários, e unir a mesma às paredes dentinárias (RAHIMI et al., 2009; BRANSTETTER & FRAUFOFER, 1982). A capacidade de penetração do cimento obturador nos túbulos dentinários pode ser considerada benéfica, podendo favorecer a ação antimicrobiana do mesmo (PRESTEGAARD et al., 2014), maior retenção mecânica da massa obturadora (HARAGUSHIKU et al., 2010) e confinamento bacteriano (SJOGREN et al., 1997). Atualmente o cimento obturador considerado ideal é o cimento à base de resina epóxica AH Plus, o qual apresenta excelentes propriedades físico-químicas (VERSIANI et al., 2006), biológicas (LEONARDO et al., 1999; MUTOH et al., 2013) e antimicrobiana (HEYDER et al. 2013; WANG; SHEN; HAAPASALO, 2013).

Os ensaios atuais que avaliam a qualidade da obturação são feitos por meio de cortes transversais dos dentes (ARDILA; WU; WESSELINK, 2003; MARCIANO et al., 2011) e a análise pode ser em estereomicroscopia e microscopia confocal de

varredura a laser, dependendo do objetivo do estudo. A estereomicroscopia visa verificar, entre as técnicas de obturação do sistema de canais radiculares, qual ou quais apresentam menor ocorrência de espaços vazios e a quantidade de cimento obturador por área de massa obturadora, que é a porção solúvel e contrátil da obturação (JERRET et al., 2004; ELAYOUTI et al., 2005). A microscopia confocal a laser vem sendo utilizada para avaliação de testes antimicrobianos (MA et al., 2011) e também para avaliação da interface de adaptação cimento/dentina e a capacidade de penetração do cimento obturador nos túbulos dentinários com diferentes técnicas e cimento (BITTER et al., 2004; GHARIB et al., 2007), sendo possível determinar a qualidade do selamento da obturação.

Estudos prévios propuseram o uso do ultrassom para inserção do cimento obturador (HOEN; LABOUNTY; KELLER, 1988; WEST; LABOUNTY; KELLER, 1989; AGUIRRE, EI-DEEB; AGUIRRE, 1997; NIKHIL & SINGH, 2013), no entanto, seu uso para a agitação do cimento obturador, inserido previamente pela técnica clássica, foi pouco explorado. Guimarães et al (2014) demonstraram, em dentes com canal único, que a agitação do cimento obturador proporciona maior penetração do mesmo nos túbulos dentinários e melhor adaptação na interface cimento-dentina.

Consultando a literatura não encontramos, até o presente momento, estudos avaliando a influência da agitação ultrassônica do cimento obturador na qualidade da obturação em canais com complexidades anatômicas bem como, na ação antimicrobiana intradentinária do cimento AH Plus, o que torna interessante essas avaliações.

2 Revisão de Literatura

2 REVISÃO DA LITERATURA

A revisão da literatura será apresentada de forma cronológica, envolvendo estudos sobre a ativação ultrassônica e análise em Microscopia confocal a laser sobre as propriedades antimicrobianas do cimento AH Plus relevantes para o desenvolvimento deste trabalho.

2.1 Ativação Ultrassônica

Embora não haja uma vasta literatura científica abordando a agitação ultrassônica de cimentos obturadores de canais, percebe-se que há artigos relacionados ao uso do mesmo para outros procedimentos endodônticos de suma importância.

O ultrassom foi introduzido na endodontia no ano 1957 por Richman. No entanto, seu uso foi popularizado após a publicação do estudo de Martin & Cunningham no ano 1976, propondo ativar a lima tipo K manual para o preparo dos canais radiculares (PLOTINO et al., 2007). Embora tenha causado uma grande revolução na época, o ultrassom entrou em um período de desuso, pois alguns trabalhos mostraram que, embora tivesse ótima capacidade na remoção de debris (ESBERARD et al., 1987) e diminuição de micro-organismo (CHAN & CHAO, 1990), seu uso em canais curvos provocava desvios nos mesmos (AHMAD & FORD, 1989; TANG & STOCK, 1989; AHMAD, 1991). Desde então diversos trabalhos foram realizados e hoje é um dos equipamentos mais utilizado na endodontia, desde a abertura coronária até a cirurgia parendodôntica.

Cameron (1987) avaliou em microscopia eletrônica de varredura o sinergismo entre a irrigação final com solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) e o emprego do ultrassom. Dentes humanos extraídos tiveram seus canais radiculares preparados de forma padronizada, com o objetivo de se conseguir uma camada de smear layer uniforme para todos os grupos experimentais. Estes receberam a irrigação final com solução de NaOCl em diferentes concentrações ou água destilada, ativados ou não pelo ultrassom. Os resultados mostraram que houve efetiva relação sinérgica da solução de NaOCl com o ultrassom na limpeza dos canais radiculares, mostrando

que o ultrassom associado ao NaOCl potencializou a capacidade de limpeza dos canais radiculares.

Hoën, Labounty e Keller (1988) avaliaram o uso da energização ultrassônica na inserção do cimento obturador no sistema de canais radiculares. Foram utilizadas 50 raízes mesiais de molares inferiores de humanos extraídos as quais tiveram seus canais preenchidos com cimento obturador AH26 (DeTrey/Dentsply, Zurich, Switzerland) pela técnica de inserção manual e com o ultrassom. Todos os dentes foram radiografados após obturação e posteriormente seccionados em diferentes níveis para a análise em estereomicroscopia. Os resultados mostraram que o uso do ultrassom proporcionou melhor preenchimento de áreas de istmos, canais laterais e ramificações quando comparado com a inserção manual. Os autores concluíram que o ultrassom foi efetivo na inserção do cimento obturador proporcionando melhor preenchimento em áreas de complexidades anatômicas.

West, LaBounty e Keller (1989) avaliaram a influência do ultrassom para instrumentação e inserção de cimento obturador em canais de raízes mesiais de molares inferiores. Foram utilizados 48 molares inferiores cujos canais foram instrumentados de forma padronizada e obturados com a técnica de condensação lateral, variando apenas a técnica final de inserção do cimento obturador. Em um grupo o cimento foi inserido com a lima manual tipo #20 K e no outro o cimento foi inserido com a lima acoplada a um ultrassom. Os dentes foram cortados em 7 secções de 1 mm de espessura cada uma e analisados em estereomicroscópio. Os resultados mostraram que o uso do ultrassom para inserção do cimento obturador favoreceu a homogeneidade do cimento obturador nas complexidades do canal quando comparado com a inserção manual.

Wiemann, Lisa e Wilcox (1991) avaliaram, *in vitro*, diferentes formas de inserção do cimento obturador no canal radicular. Foram utilizados 40 incisivos inferiores humanos extraídos comparando a inserção do cimento AH26 com a lima manual, espiral de Lentulo, cone de guta-percha e lima ultrassônica. Os autores avaliaram a presença de cimento obturador seccionando os dentes e analisando em estereomicroscopia os terços apical, médio e cervical. Os autores não encontraram diferença estatística significativa entre os grupos. No entanto, a maior variabilidade na quantidade de cimento foi encontrada no terço apical nos grupos que utilizaram a guta-percha e a espiral Lentulo.

Braitt (1992) citou uma variedade de aplicações para o uso do ultrassom na odontologia e relatou os efeitos produzidos pela onda ultrassônica no interior do sistema de canais radiculares, destacando o fenômeno da cavitação. Este ocorre, quando a pressão osmótica exercida sobre um líquido é maior que a pressão hidráulica que este líquido exerce sobre a parede do recipiente que o contém, com a formação de bolhas no seu interior e posterior implosão, formando cavidades transitórias que, ao se romperem, produzem ondas de impacto na superfície do recipiente em que o líquido está contido. Na ativação ultrassônica do canal radicular, o fenômeno da cavitação produz o deslocamento do líquido irrigante com alto impacto na parede, promovendo a remoção da smear layer e atingindo áreas, onde os instrumentos manuais não alcançam.

Cheung e Stock (1993) avaliaram a limpeza das superfícies de canais radiculares, em microscopia eletrônica de varredura, preparados manualmente e pelo método ultrassônico. Cinquenta e seis dentes recém-extraídos de humanos foram divididos em oito grupos e preparados endodonticamente pela técnica manual de recuo progressivo. Os dentes dos grupos A e B foram irrigados com água destilada (Grupo A: instrumentação manual e Grupo B: instrumentação ultrassônica), os grupos C e D foram irrigados com hipoclorito de sódio a 1% (Grupo C: instrumentação manual e Grupo D: instrumentação ultrassônica). Os Grupos E e F foram irrigados com digluconato de clorexidina a 0,5% (Grupo E: instrumentação manual e Grupo F: instrumentação ultrassônica). Os grupos G e H foram irrigados com uma solução biológica - Solução de Persil (Grupo G instrumentação manual e Grupo H instrumentação ultrassônica). Os canais do grupo controle (2 espécimes) não foram irrigados, nem instrumentados. Os autores concluíram que em nenhum dos grupos experimentais houve remoção total da smear layer da região apical. Quando o ultrassom foi utilizado, houve aumento da capacidade de limpeza, independente da solução utilizada. Não houve diferenças significantes entre as substâncias testadas.

Aguirre, El-Deeb e Aguirre (1997) compararam o método ultrassônico com o manual na inserção de três diferentes tipos de cimento: Sultan®, Grossman, AH-26® e CRCS®. Foram analisados os efeitos na densidade radiográfica, distribuição do cimento, e o selamento apical. Para este estudo foram utilizados 120 incisivos inferiores distribuídos em 6 grupos, dependendo do tipo do cimento e do método de inserção. Os resultados mostraram que inserção ultrassônica foi superior a manual

apenas para o CRCS®. Os autores concluíram que a agitação ultrassônica melhorou a inserção apenas em alguns cimentos (CRCS®) mas não em outros (Sultan® ou AH-26®). O método de inserção dos cimentos não apresentou efeitos na filtração apical e aparentemente no selamento apical.

Gutarts et al. (2005) avaliaram, in vivo, a influência da agitação ultrassônica na limpeza de istmos e dos canais em raízes mesiais de molares inferiores preparados com técnica manual e rotatória. Foram utilizados 36 molares inferiores de pacientes com indicação de extração por motivos periodontais e então, foram divididos em 2 grupos; no grupo 1 os canais foram preparados com instrumentos manuais e rotatórios sendo que a irrigação convencional foi utilizada durante esta etapa, no grupo 2 os canais foram preparados seguindo o mesmo protocolo porém, ao final o irrigante foi agitado com o ultrassom. Os dentes então foram seccionados a 1 e 3 mm do ápice radicular e foram analisados histologicamente. Os resultados mostraram que o uso do ultrassom para a agitação da solução irrigadora proporcionou maior limpeza das áreas de istmos e dos canais quando comparados com o grupo que foi realizada a irrigação convencional.

Van der Sluis, Shemesh, Wesselink (2007) avaliaram a influência da agitação ultrassônica da solução irrigadora na qualidade do selamento da obturação dos canais radiculares. Foram utilizados 40 pré-molares inferiores os quais foram divididos em 2 grupos. Os canais foram preparados com sistema rotatório GT até o instrumento 30.10, sendo que a irrigação convencional foi realizada durante esse processo. Ao final da instrumentação todos os dentes do grupo 1 tiveram o hipoclorito de sódio 2% ativado ultrassonicamente por 1 minuto, enquanto os do grupo 2 não tiveram a ativação da solução irrigadora. Após a instrumentação, todos os canais foram obturados utilizando o cimento AH-26 associado à técnica de obturação de compactação vertical utilizando o system B. Depois disso, todos os dentes foram submetidos a teste de infiltração de glicose onde sua concentração foi avaliada num período de 7 até 56 dias. Os resultados mostraram que o grupo em que foi realizada a irrigação ultrassônica obtiveram menores concentrações de glicose. Os autores concluíram que a ativação ultrassônica da solução irrigadora promoveu uma melhora significativa na qualidade da obturação.

Burleson et al. (2007) avaliaram o emprego da instrumentação manual e rotatória associadas ou não a ativação da solução irrigadora com o ultrassom. Vinte raízes mesiais de molares inferiores humanos foram divididas em 2 grupos, cujos

canais foram instrumentados com instrumentos manuais e rotatórios, sendo que em um grupo foi realizada a irrigação ultrassônica do hipoclorito e no outro não. Todos os dentes foram preparados para cortes histológicos a 1, 2 e 3 mm do ápice, para verificar a limpeza dos canais e do istmo. Os resultados mostraram que houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos em todos os níveis avaliados nos canais e nos istmos. A maior diferença ocorreu nas áreas de istmos, sendo que o ultrassom foi 45% mais eficiente na limpeza destas áreas do que a irrigação convencional.

Carver et al. (2007) compararam, in vivo, o potencial antimicrobiano de preparos manuais/rotatórios associado ou não a agitação ultrassônica da solução irrigadora em molares inferiores com necrose pulpar. Previamente ao preparo biomecânico foi realizada a coleta bacteriológica para identificar o tipo de micro-organismos presente e possibilitar a mensuração da unidade formadora de colônia (UFC) dos canais pré e pós tratamento. Todos os canais foram instrumentados seguindo a mesma técnica de instrumentação, no entanto em um grupo o hipoclorito de sódio foi agitado ao final na instrumentação e no outro não. Os resultados mostraram que a agitação final do hipoclorito de sódio resultou em uma significativa redução no número de UFC e de culturas positivas. Os autores concluíram que o ultrassom é uma importante ferramenta na desinfecção dos canais radiculares.

De Gregorio et al. (2009) avaliaram a penetração de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 5,25% sozinho ou combinado com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) a 17% em canais simulados, usando ativação sônica e ultrassônica. Quatrocentos e oitenta canais laterais simulados foram criados em oitenta raízes dentárias diafanizadas e as amostras foram revestidas com silicone transparente para simular o tecido periodontal e distribuídas em quatro grupos. No Grupo 1, foi utilizada irrigação com NaOCl a 5,25% + ativação sônica; no Grupo 2, foi utilizada irrigação com NaOCl a 5,25% + ativação ultrassônica; no Grupo 3, foi utilizada irrigação com NaOCl a 5,25% e EDTA + ativação sônica; no Grupo 4, foi utilizada irrigação com NaOCl a 5,25% e EDTA + ativação ultrassônica. A ativação sônica foi realizada, utilizando-se o Endoactivator® inserido a 2 mm do comprimento de trabalho e ativado por 1 minuto. A ativação ultrassônica foi realizada, utilizando-se uma lima ultrassônica de aço inoxidável inserida a 2 mm do comprimento de trabalho e ativada por 3 ciclos de 20 segundos cada. As amostras foram analisadas, observando-se as imagens geradas por uma câmara adaptada a um microscópio

operatório e por imagens radiográficas após a inserção de um líquido radiopaco. As ativações sônicas e ultrassônicas mostraram-se eficazes, demonstrando significativa penetração nos canais laterais. A adição de EDTA não influenciou na penetração da substância irrigadora, nos canais laterais.

Harrison et al. (2010) investigaram a capacidade de um sistema de irrigação ultrassônica para eliminar bactérias, em dentes humanos extraídos. Cento e trinta canais foram contaminados com *Enterococcus faecalis* e instrumentados manualmente, sendo divididos, aleatoriamente, em dois grupos. Um grupo foi submetido à irrigação passiva ultrassônica, com hipoclorito de sódio a 1%, durante 1 minuto e no outro grupo foi colocado hidróxido de cálcio, por uma semana. As raízes foram seccionadas, sendo uma hemiseção processada para microscopia ótica e coradas pelo método de Brown e Brenn e a outra processada para microscopia eletrônica de varredura. Foram examinados os terços cervical, médio e apical de cada hemiseção radicular e marcada a presença de bactérias, por um critério pré-definido. Os autores concluíram que a ativação passiva ultrassônica, após a limpeza e modelagem dos canais radiculares, é tão eficiente na eliminação bacteriana quanto na colocação de hidróxido de cálcio, porém em nenhum dos dois grupos, houve eliminação total de bactérias.

Duarte et al. (2012) analisaram a influência da ativação ultrassônica das pastas de Hidróxido de cálcio no pH e na liberação de cálcio em reabsorções radiculares externas simuladas. Foram utilizados 46 incisivos de bovinos nos quais cavidades foram preparadas externamente e divididos em 4 grupos contendo 10 amostras de acordo com a pasta de Hidróxido de cálcio e o uso ou não da ativação ultrassônica sendo esses grupos: grupo 1: propilenoglicol sem ativação ultrassônica, grupo 2: água destilada sem ativação ultrassônica, grupo 3: propilenoglicol com ativação ultrassônica, e grupo 4: água destilada com ativação ultrassônica. Após permanecerem em diferentes períodos em frascos com solução de água miliqueri para a análise do pH, a liberação de cálcio foi mensurada por meio de espectrofotômetro de absorção atômica. Como conclusão foi observado que a ativação ultrassônica favoreceu o aumento dos níveis de pH e da liberação de cálcio nas raízes com reabsorções externas simuladas.

Nikhil e Singh. (2013) avaliaram a influência da penetração intratubular do cimento obturador utilizando os métodos ultrassônico, sônico e rotatório. Foram utilizados 30 dente superiores com canal único divididos em 3 grupos conforme o

método de inserção utilizado: grupo 1: inserção com lima ultrassônica, grupo 2: espiral de Lentulo e grupo 3: Endo activator. Todos os canais foram obturados e analisados a 3 e 6 mm do ápice radicular em microscopia confocal a laser. Os autores concluíram que o método ultrassônico proporcionou maior penetração do cimento obturador e menor presença de fendas em todos os níveis analisados, sendo que o método sônico foi o que obteve o pior resultado.

Guimarães et al. (2014) avaliaram a influência da agitação ultrassônica do cimento obturador, utilizando 4 diferentes cimentos à base de resina epóxica (AH Plus, Acroseal, Sealer 26 e Adseal), na penetração intratubular, na adaptação e na presença de espaços vazios. Foram utilizados 80 caninos superiores que foram divididos em 4 grupos de acordo com o tipo de cimento utilizado e a agitação ou não do cimento obturador. Todos os canais foram obturados pela técnica de condensação lateral sendo posteriormente seccionados a 2, 4 e 6 mm do ápice radicular e analisados em microscopia confocal a laser e estereomicroscópio. Os autores concluíram que o uso do ultrassom proporcionou menor presença de fendas e maior perímetro de penetração intratubular em todos os cimentos analisados, porém o melhor desempenho foi do cimento AH Plus.

Nikhil, Bansal, Sawani (2015) avaliaram o perímetro e a profundidade de penetração, nos túbulos dentinários, dos cimentos MTA Fillapex e AH Plus agitados com ultrassom, espiral de Lentulo e com o Protaper F1 em rotação anti-horária. Foram utilizados 60 incisivos centrais superiores os quais foram instrumentados com sistema ProTaper até o instrumento F5. Todos os canais foram irrigados com hipoclorito de sódio durante o preparo e ao final foi feita a aplicação do EDTA 17% por 3 minutos para remoção da smear layer. Os dentes foram randomicamente divididos em 3 grupos (n=20) conforme o tipo de agitação empregada para cada um deles e os mesmos foram divididos em mais 3 subgrupos (n=10), totalizando 6 grupos. Todos os canais foram obturados pela técnica de cone único e seccionados após a presa dos cimentos obturadores, a 3 e 6 mm do ápice radicular para análise em microscopia confocal a laser. Os resultados encontrados mostraram que o grupo em que o cimento obturador foi agitado apresentou maior perímetro de penetração e profundidade nos túbulos dentinários seguido pela espiral de Lentulo e pelo instrumento ProTaper F1 para os dois cimentos avaliados. Os autores concluíram que o MTA Fillapex apresentou maior perímetro e profundidade de penetração nos túbulos dentinários do que o AH Plus. A agitação ultrassônica do cimento obturador

proporcionou um aumento significativo no perímetro de penetração e na profundidade dos cimentos obturadores em níveis avaliados quando comparados com outros métodos.

2.2 Microscopia Confocal

A microscopia confocal a laser tem sido amplamente utilizada em estudos de obturação de canais para visualização da interface cimento/canal e penetração do cimento nos túbulos dentinários (GHARIB, S. et al., 2007; ZAPATA et al., 2009). Para isso, foi adicionada a Rodamina B a 1% no cimento obturador, a qual é um fluoróforo marcador que permite a visualização do cimento na microscopia confocal de varredura a laser (PIOCH et al., 1996; GHARIB et al., 2007). Assim, é possível avaliar a qualidade da obturação, a presença de fendas e a penetrabilidade do cimento no interior dos túbulos dentinários (GHARIB et al., 2007; ORDINOLA-ZAPATA et al., 2009a; MARCIANO et al., 2011). Outra aplicação dessa metodologia é a visualização da viabilidade de micro-organismo em biofilmes ou em dentina por meio do corante LIVE/DEAD, sendo possível avaliar o efeito antimicrobiano de diferentes substâncias empregadas no tratamento endodôntico (ZAPATA et al., 2008; CHAVEZ DE PAZ; BERGENHOLTZ; SVENSATER, 2010; MA et al., 2011)

Gharib et al. (2007) analisaram, mediante microscopia confocal a laser, a interface entre o cimento obturador e a dentina, no nível cervical e compararam a porcentagem de penetração e profundidade do cimento nos túbulos dentinários, nos terços cervical, médio e apical. Dez dentes unirradiculados foram utilizados no estudo. Foi realizada a instrumentação mecânica dos canais em sentido coroa-ápice com instrumentos ProFile 40/0.04 e obturação com o sistema Epiphany/Resilon. A obturação foi realizada pela técnica da compactação vertical com system B. Uma vez que o cone de Resilon era condensado na sua região apical, o resto do canal, foi preenchido com guta-percha plastificada por meio do sistema Obtura. Os dentes foram cortados utilizando a máquina de corte Isomet para depois serem analisados no microscópio confocal a laser a 40x de aumento. Os resultados mostraram que houve menor penetração do cimento na região apical comparada com as regiões média e cervical. Além disso, não encontraram espaços vazios na interface cimento-dentina, nos cortes da porção coronária.

Ordinola-Zapata et al. (2009b) compararam a porcentagem e profundidade de penetração de cimento no interior dos túbulos dentinários, utilizando diferentes cimentos, após a obturação com a técnica da condensação lateral. A amostra consistiu de 30 dentes unirradiculados. As coroas foram removidas com disco de corte para Isomet deixando raízes standardizadas em 14mm de comprimento. Os canais foram instrumentados com o sistema rotatório Protaper até a lima F3 30/09, com irrigação manual de NaOCl, a 1%. As raízes foram divididas em 3 grupos de 10 dentes. Os cimentos Sealer 26, GuttaFlow e Sealapex foram corados com Rodamina B e os canais obturados com os cimentos e cones de guta-percha 30/02 e condensação lateral. Os dentes foram cortados a 3 e 5mm do ápice. Mediante o software LAS-AF Leica, a penetração dos cimentos foi mensurada. A porcentagem de penetração dos cimentos ao redor do canal radicular foi calculada utilizando-se o software Image Tool. Os resultados não mostraram diferenças significativas na profundidade e na porcentagem de penetração dos cimentos, no interior dos túbulos dentinários.

Zapata et al. (2008) avaliaram a efetividade na detecção da viabilidade microbiana do *Enterococcus faecalis* em biofilme induzido *in situ* utilizando o corante LIVE/DEAD e laranja de acridina. Foram confeccionados 8 cilindros de dentina de dentes de bovinos, os quais foram esterilizados e fixados em placas de aparelhos ortodônticos removíveis para indução do biofilme por um período de 21 dias. Após esse período as amostras receberam o corante LIVE/DEAD e analisadas na microscopia confocal a laser. Os autores concluíram que o uso da microscopia confocal a laser é capaz de identificar a viabilidade bacteriana em biofilme formados *in situ* pelo corante LIVE/DEAD e o corante laranja de acridina foi capaz de mostrar a atividade metabólica do *Enterococcus faecalis* utilizando a fluorescência vermelha.

Marciano et al. (2011) compararam por meio da estereomicroscopia e microscopia confocal a laser a porcentagem de guta-percha, cimento, espaços vazios e a influência de istmos em obturações de canais de 60 raízes mesiais de molares inferiores, obturados por meio da técnica de cone único ProTaper F2, condensação lateral, System B e Thermafill. Após a instrumentação dos canais com o sistema rotatório Protaper até lima F2 e irrigação com NaOCl a 2,5%, os mesmos foram secos para proceder a obturação final. A seguir, os 60 dentes foram divididos em quatro grupos de 15 de acordo com as técnicas obturadoras. O cimento utilizado foi o Thermaseal Plus ao qual foi misturado o corante Rodamina B, para sua

posterior análise no microscópio confocal a laser. Após uma semana, os dentes foram cortados nos níveis de 2, 4 e 6mm do ápice. Os espécimes foram analisados em estereomicroscopia para a identificação e cálculo de espaços vazios ao longo da obturação. Os resultados mostraram que a 2mm, a porcentagem de guta-percha, cimento e espaços vazios foram similares entre os grupos do System B, condensação lateral e a técnica de cone único. Já este último, apresentou significativamente menor quantidade de guta-percha, maior quantidade de cimento e espaços vazios em comparação ao Thermafill a 2 e 4mm do ápice. Os autores concluíram que a presença de istmos pode influenciar na qualidade da obturação do canal radicular.

Cavenago et al. (2012) compararam a interface existente entre ThermaSeal Plus e Real Seal SE. Sessenta raízes mesiais de molares inferiores tiveram seus canais instrumentados com o sistema rotatório K3 35/04 e irrigados com NaOCl a 2,5%. Os cimentos foram corados com Rodamina B, em concentração de 0,1% para a visualização no microscópio confocal. No primeiro grupo os canais foram obturados utilizando a compactação vertical, com cone de Resilon e cimento RealSeal SE. Uma vez realizada a compactação vertical, o restante do canal foi preenchido com guta-percha utilizando o Elements Obturation Unit. No grupo 2 foi utilizada a mesma técnica descrita anteriormente mas utilizando-se cone único de guta-percha e cimento ThermaSeal Plus. O grupo 3 a obturação foi feita com cone único de Resilon de diâmetro e conicidade 35/04 e cimento RealSeal SE, e por último, o grupo 4 foi obturado com cone único de guta-percha 35/04 e cimento ThermaSeal Plus. Após a presa dos cimentos, os dentes foram seccionados a 2, 4 e 6mm do ápice e analisados no estereomicroscopio para visualizar a presença de istmos. A análise mostrou um padrão regular na distribuição de fendas na interface cimento-dentina, principalmente para os dois grupos com cimento Real Seal SE. Os outros dois grupos (ThermaSeal Plus) apresentaram uma quantidade significativamente menor de áreas com fendas, independentemente da técnica de obturação. A melhor adaptação marginal foi observada quando se utilizou a guta-percha e o cimento à base de resina epóxica (ThermaSeal Plus), tanto com o System B como com cone único.

Nikhil e Singh (2013) avaliaram por meio de microscopia confocal a laser a profundidade de penetração, nos túbulos dentinários, e a interface de adaptação entre o material obturador e a dentina quando inseridos no canal radicular por

diferentes métodos. Foram utilizados 30 dentes superiores com canal único, os quais foram divididos em 3 grupos conforme o método de inserção utilizado: grupo 1: inserção com lima ultrassônica, grupo 2: espiral de Lentulo e grupo 3: Endo activator. Todos os canais foram instrumentados com sistema Protaper até o instrumento F3 e obturados pela técnica de condensação lateral. Para a análise em microscopia confocal os dentes foram seccionados a 3 e 6 mm do ápice radicular e analisados em um aumento de 10x. Os resultados mostraram que o método ultrassônico proporcionou maior penetração do cimento obturador e menor presença de fendas em todos os níveis analisados, sendo que o método sônico foi o que mostrou o pior resultado.

Guimarães et al. (2014) examinaram por meio da microscopia confocal a laser e estereomicroscopia a influência da agitação ultrassônica do cimento obturador utilizando 4 diferentes cimentos à base de resina epóxica (AH Plus, Acroseal, Sealer 26 e Adseal), na penetração intratubular, na adaptação e na presença de espaços vazios. Foram utilizados 80 caninos superiores que foram divididos em 4 grupos de acordo com o tipo de cimento utilizado e a agitação ou não do cimento obturador. Todos os canais foram instrumentados com o sistema Protaper até o instrumento F5 e obturados pela técnica da condensação lateral. Todos os dentes foram seccionados a 2, 4 e 6 mm do ápice radicular para análise em microscopia confocal a laser e estereomicroscopia. Os autores concluíram que o ultrassom proporcionou menor presença de fendas e maior perímetro de penetração intratubular em todos os cimentos analisados, porém o melhor desempenho foi do cimento AH Plus.

Além do uso para avaliação de materiais obturadores a microscopia confocal a laser vem sendo largamente utilizada para a análise da viabilidade microbiana utilizando o corante LIVE/DEAD® BacLight Bacterial Viability Kit (Invitrogen Molecular Probes, Eugene, OR, EUA). Este corante é composto de dois fluorocromos de afinidade pelos ácidos nucleicos, o SYTO-9 e o Iodeto de propídeo. Por meio da coloração atribuída por esses fluorocromos, é possível determinar a viabilidade microbiana, tendo como parâmetro a integridade da membrana citoplasmática que é imprescindível para a manutenção da viabilidade celular. Desse modo, micro-organismos vivos, com membrana citoplasmática intacta, mostraram fluorescência verde, enquanto que, micro-organismos mortos, com membrana citoplasmática comprometida, apresentam fluorescência vermelha (JIN et al., 2005).

Shen et al (2009) descreveram o efeito de duas concentrações de clorexidina sobre biofilme multiespécies formado in vitro. Discos de colágeno recobertos com hidroxiapatita (C-HA) e sem recobrimento de hidroxiapatita (HA), foram inoculados com micro-organismos obtidos de placa bacteriana subgingival durante 3 semanas. Em ambos (C-HA e HA) formaram-se biofilmes densos ricos em espiroquetas, os quais foram irrigados com clorexidina Plus e Clorexidina 2% durante 1,3 e 10 minutos. Após a irrigação, as amostras foram coradas com corante LIVE/DEAD para determinar a viabilidade celular do biofilme. A proporção das bactérias não viáveis dependeu do tipo de irrigante e o tempo de exposição em ambos modelos de biofilme. A Clorexidina Plus mostrou altos níveis de atividade bactericida em todos os tempos de exposição, em comparação com a Clorexidina a 2%.

Chavez de Paz, Bergenholtz e Svensater (2010) avaliaram o efeito de diferentes soluções antimicrobianas (EDTA 17%, Digluconato de Clorexidina a 2.5% e hipoclorito de sódio a 1%) sobre biofilmes bacterianos (*Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus paracasei*, *Streptococcus anginosus* e *Streptococcus gordini*). Após 5 minutos de contato da solução irrigadora com o biofilme, as amostras foram coradas com corante LIVE/DEAD para determinar a integridade da parede celular. Os resultados mostraram que o hipoclorito de sódio a 1% foi o mais efetivo na redução da viabilidade bacteriana e na remoção do biofilme de todos os micro-organismos, seguido pela Clorexidina e EDTA. Os autores concluíram que todas as soluções irrigadoras avaliadas apresentaram efeito antimicrobiano, porém o hipoclorito de sódio foi a única solução com efeito antimicrobiano e de dissolução de biofilme,

Wang, Shen e Haapsalo (2012) compararam a influência do tempo de maturação do biofilme intratubular de *Enterococcus faecalis* na efetividade de diferentes soluções irrigantes (Hipoclorito de sódio a 2% e 6%, Clorexidina a 2% e Qmix). Foram utilizadas amostras de dentina humana, obtidas de incisivos inferiores, com formato semicilíndrico com as dimensões de 4 x 4 x 2 mm, obtendo um total de 40 blocos. Para a contaminação dentinária foram isolados *Enterococcus faecalis* de canais com lesões periapicais persistentes e então foi padronizada sua concentração de 3×10^6 UFC/mL. Os blocos de dentina foram incubados por 1 e 3 semanas, sendo que metade das amostras foram escolhida aleatoriamente para os testes nos dois períodos citados. Após essa etapa, os blocos de dentina foram submetidos ao tratamento com as soluções testadas por um período 1 e 3 minutos. Estes procedimentos foram realizados para os 2 tipos de biofilmes avaliados. Para a

aquisição das imagens em microscopia confocal a laser todas as amostras foram lavadas com solução fisiológica e foram coradas com corante LIVE/DEAD. Os resultados mostraram que todas as soluções tiveram seu efeito antimicrobiano diminuído frente ao biofilme formado por 3 semanas do que o de 1 semana, sendo que o hipoclorito de sódio a 6% e Qmix foram os mais efetivos nos períodos de 1 e 3 minutos. O hipoclorito de sódio 6% foi mais efetivo do que o Qmix sobre biofilme de 3 semanas. A Clorexidina e Hipoclorito de sódio 2% tiveram um potencial antimicrobiano menor em todos os testes. Os autores concluíram que o tempo de maturação do biofilme influencia na resistência aos agentes antimicrobianos e que o Hipoclorito de sódio foi a solução que apresentou melhor efeito antimicrobiano.

Del-Carpio Perochena et al (2015) avaliaram as propriedades antimicrobianas e a dissolução de biofilme multiespécies formados *in situ* utilizando o hipoclorito de sódio nas concentrações de 1 e 2,5% e com pH de 5,7 e 12. Foram utilizados 56 blocos de dentina bovina com dimensões 5 x 5 x 3 mm os quais foram fixados em uma dispositivo ortodôntico móvel para contaminação intraoral por 48 horas. Após esse período os blocos de dentina foram incubados em BHI por 48 horas para o crescimento homogêneo do biofilme e foram divididos em 6 grupos. Posterior ao tempo de incubação os blocos de dentina foram irrigados com solução salina para remoção do meio de cultura e de células não aderentes e foram coradas com corante o LIVE/DEAD para captura das imagens pré-tratamento. Em seguida, os blocos de dentina foram lavados com solução salina e então colocados em uma placa de cultura de células de 24 poços, contendo água destilada, para o grupo controle, e hipoclorito de sódio em diferentes concentrações e pH para os demais grupos. O hipoclorito de sódio foi renovado por 4 vezes a cada 5 minutos, totalizando 20 minutos de tratamento. Durante todo esse período o pH e temperatura do hipoclorito foi monitorada. Após o tratamento todas as amostras foram lavadas com água destilada e coradas novamente com o corante LIVE/DEAD e levadas ao microscópio confocal a laser para a captura das imagens. Os resultados mostraram que o Hipoclorito de sódio a 1% com pH 5 não apresentou capacidade de dissolução, no entanto, apresentou um alto poder bactericida. Já o Hipoclorito de sódio a 1% com pH 12 apresentou uma alta capacidade de dissolução porém, baixo poder bactericida. Os grupos de Hipoclorito com pH 5 e 7 e o Hipoclorito 2,5% com pH 12 apresentaram alto poder bactericida. Os autores concluíram que a

acidificação do Hipoclorito aumenta o potencial antimicrobiano, entretanto, é necessário um pH alcalino para a dissolução do biofilme.

2.3 Propriedade antimicrobiana do cimento AH Plus

Miyakag et al. (2006) avaliaram as propriedades antimicrobianas de 5 diferentes cimentos endodônticos (N-Rickert, Sealapex, AH Plus, Agregado Trióxido Mineral e cimento Portland) frente a *Cândida albicans* (*C. albicans*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Enterococcus faecalis* (*E.faecalis*) e *Escherichia coli* (*E.coli*). O método de avaliação utilizado foi o de difusão em ágar e o período de análise do halo de inibição foi de 24 horas. Os autores concluíram que apenas os cimentos AH Plus e N-Rickert apresentaram propriedade antimicrobiana frente a *C. albicans*, *S. aureus* e *E. coli*. Os cimentos Portland e Agregado Trióxido Mineral não apresentaram efeito antimicrobiano. Nenhum dos cimentos testados apresentou efeito antimicrobiano contra *E.faecalis*. Os autores concluíram que o cimento AH Plus e N-Rickert apresentam um bom potencial antimicrobiano frente aos demais micro-organismos, porém este último apresentou maiores halos de inibição.

Slutzky-Goldberg et al. (2008) avaliaram, por meio de contato direto, as propriedades antimicrobianas dos cimentos AH Plus, Apexit Plus, Epiphany SE e Roekoseal frente ao *Enterococcus faecalis*. Foi avaliado o efeito antimicrobiano imediato após o preparo, 24, 48, 168 e 336 horas. Os resultados mostraram que o cimento Apexit Plus foi o único a apresentar efeito antimicrobiano imediatamente após o seu preparo. Após 48 horas os cimentos Apexit, AH Plus e Roekoseal não apresentaram diferença estatística ($p>0.05$) do grupo controle, enquanto o cimento Epiphany SE apresentou um aumento no crescimento bacteriano. No período de 336 horas nenhum dos cimentos apresentaram efeito antimicrobiano significativo. Os autores concluíram que nenhum dos cimentos apresentou efeito antimicrobiano de longa duração; o cimento Epiphany SE apresentou o pior resultado e o cimento AH plus e RoekoSeal foram inefetivos.

Zhang et al. (2009) avaliaram a propriedade antimicrobiana frente ao *Enterococcus faecalis* de 7 cimentos endodônticos (AH Plus, Apexit Plus, iRoot SP, Tubli Seal, Sealapex, Epiphany SE e EndoRez) por meio de contato direto modificado. Bactérias em suspensão foram expostas aos diferentes materiais de 2 a

60 minutos imediatamente após o preparo dos cimentos, 24, 72 e 168 horas. Foram mensurados os valores de pH e o halo de inibição. Os resultados mostraram que o iRoot SP apresentou o melhor potencial antimicrobiano ao tempo de 2 minutos. O cimento AH plus apresentou o mesmo efeito em 5 minutos, enquanto Apexit Plus, Sealapex, Tubli Seal, Epiphany SE e EndoRez demandaram 60 minutos. Nos períodos de 1 e 3 dias os cimentos EndoRez e iRoot SP apresentaram maior potencial antimicrobiano, seguido por Sealapex e Epiphany SE; Tubli Seal e AH plus não apresentaram atividade antimicrobiana significativa. De todas essas amostras o Apexit Plus apresentou a menor capacidade antimicrobiana. Além disso, os resultados não encontraram correlação entre pH e a ação antimicrobiana dos cimentos avaliados. Os autores concluíram que o cimento AH Plus, iRoot SP e EndoRez apresentaram excelente potencial antimicrobiano frente ao *Enterococcus faecalis* imediatamente após seu preparo. O iRoot e EndoRez mantiveram seu efeito nos períodos de 72 e 168 horas. Os cimentos Sealapex e EndoRez foram os únicos cimentos que apresentaram efeito antimicrobiano no períodos de 7 dias.

Ozcan; Eldeniz e Ari (2010) avaliaram a propriedade antimicrobiana dentinária dos cimentos AH plus e Guta Flow utilizando 5 diferentes técnicas de obturação (condensação vertical contínua, Thermafil, condensação lateral, cone único, condensação lateral). Foram utilizados 120 dentes de humanos extraídos com, canal único, os quais foram divididos em 12 grupos conforme a técnica obturadora utilizada. Todos os canais foram instrumentados com sistema rotatório ProTaper até um instrumento F5 e irrigados com Hipoclorito de sódio 5.25% e ao final aplicado EDTA por 3 minutos. Todos os dentes tiveram seus canais contaminados com *Enterococcus faecalis* por um período de 21 dias; a cada 2 dias o meio de cultura era trocado e ao fim a pureza das culturas foram confirmadas com coloração de Gram. Após a contaminação os canais foram secos com cones de papeis e obturados com os respectivos cimentos e técnicas testadas. Após uma semana os canais foram desobturados e raspas de dentina foram coletadas e inseridas em PBS. Foram realizadas algumas diluições e 25 µl dessa suspensão foram inseridas em placas contendo TSA (*trypticase soy agar*) e incubados por 48 horas para posterior contagem das unidades formadoras de colônias (UFC). Os resultados encontrados mostraram que o cimento AH Plus apresentou menor quantidade de UFC do que os grupos obturados com cimento Guta Flow, exceto no grupo obturado com Thermafil. Os autores concluíram que o cimento AH Plus foi mais efetivo no

efeito antimicrobiano contra o *Enterococcus faecalis* do que o cimento GuttaFlow e que aparentemente a técnica obturadora influencia na eliminação de micro-organismos.

Nawal et al. (2011) compararam o efeito antimicrobiano e o escoamento dos cimentos Guttaflow, Epiphany e AH plus. Os métodos de avaliação da ação antimicrobiana foram os métodos de contato direto (TCD) e da difusão em ágar (TDA) utilizando o micro-organismo *Enterococcus faecalis*. Todas as amostras receberam 50 ul de suspensão bacteriana e foram avaliadas nos tempos de 1 e 24 horas. Após esse período a suspensão bacteriana foi diluída e inoculada em ágar sangue e contado o número de colônias por meio digital. Para avaliação do escoamento, os cimentos foram inseridos em anéis sobre placas de vidro e um peso de 500 g foi colocado sobre os cimentos. Foi avaliado o diâmetro após a incidência do peso. Os resultados mostraram que o cimento AH Plus e Epiphany possuem um bom efeito antimicrobiano no teste TCD e TDA, porém o cimento Epiphany foi superior ao AH Plus. O Guttaflow não apresentou atividade microbiana em nenhum dos testes utilizados. Com relação ao escoamento, o cimento Epiphany apresentou o maior escoamento seguido por AH Plus e Guttaflow. Os autores concluíram que o cimento Epiphany apresentou o melhor resultado antimicrobiano e de escoamento, seguido pelo AH Plus e Guttaflow.

Farmakis et al. (2012) avaliaram a propriedade antimicrobiana de seis cimentos endodônticos (AH Plus, AH 26, TopSeal, GuttaFlow, EndoREZ e Roth 601) pré e pós o tempo de presa frente ao *Enterococcus faecalis* e *Proteus vulgaris*. O método de avaliação utilizado foi o teste de contato direto e de difusão em ágar. Para o teste de difusão em ágar foi mensurado o halo de inibição e o teste de contato direto foi mensurado por análise de espectrofotometria. Os resultados mostraram haver diferença estatística significativa entre os diferentes cimentos testados. Os cimentos TopSeal e AH Plus apresentaram maior potencial antimicrobiano frente ao *Enterococcus faecalis* e *Proteus vulgaris*, sendo que o cimento TopSeal apresentou melhor efeito antimicrobiano do que o cimento AH Plus. Os cimentos Guttaflow e EndoREZ não apresentaram halo de inibição. No teste de contato direto os cimentos AH Plus, TopSeal, Roth 601 e AH 26 apresentaram efeito antimicrobiano para ambos micro-organismos previamente a presa. Após o tempo de presa apenas o cimento Roth 601 apresentou efeito antimicrobiano frente ao *Proteus vulgaris*, sendo que nenhum deles apresentou efeito frente ao *Enterococcus*

faecalis após a presa. Os autores concluíram que os cimentos Roth 601, AH Plus, TopSeal e AH 26 apresentaram efeito antimicrobiano frente aos micro-organismos testados. O cimento TopSeal apresentou maior efeito antimicrobiano frente ao *Enterococcus faecalis* e o cimento Roth 601 foi o único cimento com efeito antimicrobiano frente ao *Proteus vulgaris* após a presa final e apresentou os menores valores de solubilidade em todos os períodos analisados.

Heyder et al. (2013) avaliaram in vitro o efeito antimicrobiano de 8 cimentos endodônticos (AH Plus, Hermetic, RoekoSeal, Sealapex, Apexit Plus, 2Seal, EndoRez e ProRoot MTA) frente ao *Enterococcus faecalis*, *Fusobacterium nucleatum* e *Porphyromonas gingivalis*. Os métodos utilizados para este estudo foram os de difusão em ágar (TDA) e de contato direto (TCD). Para o método de ADT 100 ul de bactérias em suspensão foram adicionados à placas de ágar. Então, os cimentos foram preparados e adicionados às placas. Após um período de 48 horas foi mensurado o alo de inibição. Para o teste de contato direto foram adicionados 18 mg de cimento endodôntico nas placas de cultura celulares e foi adicionado 400 ul de liquido de Schaedler e 100 ul de bactérias em suspensão. Foi mensurado o crescimento bacteriano por meio de um espectrofotômetro nos períodos de 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 24 horas. Os resultados mostraram que o cimento Hermetic apresentou substancial efeito antimicrobiano frente a todos os micro-organismos nos métodos TDA e TCD. O cimento AH Plus demonstrou efetivo potencial antimicrobiano pelo método TCD frente *Enterococcus faecalis* e *Fusobacterium nucleatum*. Todos os outros cimentos testados não apresentaram efeito inibitório frente ao *Enterococcus Faecalis*. Os autores concluíram que todos os cimentos testados apresentaram propriedades antimicrobianas o que poderia contribuir com o aumento da taxa de sucesso do tratamento endodôntico. Porém, o cimento Hermetic apresentou os melhores resultados.

Faria-Junior et al. (2013) avaliaram a propriedade antimicrobiana frente ao *Enterococcus faecalis*, a solubilidade e o pH dos cimentos AH Plus, Sealer 26, Epiphany SE, Sealapex Activ GP, MTA Fillapex e um cimento experimental à base de MTA. Todos os cimentos foram manipulados e armazenados por 2 ou 7 dias. Para avaliação antimicrobiana foi realizado o teste de contato direto (DTC) nos períodos de 5, 10 e 15 horas sobre biofilme induzido em dentina bovina. O Grupo controle não foi exposto ao cimento obturador. O número de unidade formadora de colônias remanescente foi determinado. A solubilidade foi avaliada por meio da

pesagem das amostras pré e pós imersão em água destilada por 15 horas. O pH foi mensurado nos períodos de 5, 10 e 15 horas. Os resultados mostraram que no período de 2 dias após a manipulação os cimentos Sealapex e MTA Fillapex apresentaram redução significativa nas bactérias nos 3 períodos avaliados no teste de contato direto. O Sealapex apresentou a melhor ação antibiofilme nos períodos de 10 e 15 horas. Além disso, no período de 2 e 7 dias o Sealapex apresentou o maior pH. Com relação a solubilidade, no período de 2 dias os maiores valores foram encontrados no MTA Fillapex, o cimento experimental à base de MTA, Sealpex e Activ GP. No período de 7 dias o cimento experimental e MTA Fillapex apresentaram melhor solubilidade do que os outros materiais. O cimento AH plus apresentou os menores valores de solubilidade em todos os períodos analisados.

Wang; Shen e Haapasalo (2014) avaliaram o efeito antimicrobiano dos cimentos endodônticos AH plus, BC Sealer e Pulp canal sealer EWT frente a biofilme de *Enterococcus faecalis* nos interior dos túbulos dentinários utilizando um método novo de contaminação. Foram utilizadas amostras de dentina humana, obtidas de incisivos inferiores, com formato cilíndrico com as dimensões de 4 x 4 x 2 mm. Os blocos de foram contaminados com uma concentração de 3×10^6 UFC/mL de *Enterococcus faecalis* por um período de 21 dias. Após esse período, os blocos foram divididos em 5 grupos, sendo 3 correspondentes a cada tipo de cimento obturador e 2 como controle. Os cimentos endodônticos foram preparados e colocados sobre a superfície dentinária até uma altura aproximada de 0.5 mm de altura e foram armazenados em estufa a 37°C em 100% de umidade relativa. A viabilidade bacteriana foi avaliada por meio do microscópio confocal a laser com corante LIVE/DEAD nos períodos de 1, 7 e 30 dias, sendo analisadas 2 amostras por grupos em cada período. Os autores concluíram que os grupos do BC Sealer e do AH Plus apresentaram maior porcentagem de células mortas nos três períodos avaliados do que o pulp canal sealer EWT. Além disso, os três cimentos endodônticos avaliados apresentaram efeito antimicrobiano frente ao biofilme de *Enterococcus faecalis*.

3 Proposição

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência da agitação ultrassônica do cimento endodôntico AH Plus em raízes mesiais de molares inferiores no que se refere:

3.1– A presença de espaços vazios, presença de fendas na interface cimento/dentina e o perímetro de penetração do cimento obturador nos canais e nos istmos.

3.2 - Ação antimicrobiana intra-dentinária frente ao *Enterococcus faecalis*.

4 Materiais e Métodos

4 MATERIAIS E METODOS

Previamente à sua realização, este estudo foi analisado e aprovado pelo comitê de Ética em Pesquisa em Humanos da Faculdade de Odontologia de Bauru CAAE nº:34804514.8.0000.5417 (anexo).

Todos os procedimentos laboratoriais descritos abaixo foram realizados pelo mesmo operador, o qual foi previamente treinado.

4.1 Seleção e preparo dos espécimes

Para este estudo foram utilizados 30 primeiros molares inferiores de humanos extraídos por indicação terapêutica, com ápices completamente formados, com curvaturas radiculares entre 10 a 25⁰ (Schneider, 1971) e que não tinham sido tratados endodonticamente. Os dentes foram conservados em formalina (solução de formol a 10%). Dentes com raízes supranumerárias, rizogênese incompleta, tratamento endodôntico anterior, reabsorções e fraturas radiculares foram excluídos. Todos eles foram limpos utilizando-se curetas periodontais e ultrassom Jetsonic Quatro (Gnatus, Ribeirão Preto, SP, Brasil) para a remoção de restos de tecidos e cálculos dentais.

Inicialmente os dentes foram numerados para identificação e escaneados em microtomógrafo SkyScan modelo 1174 (SkyScan, Kontich, Bélgica) (figura 1), localizado no Departamento de Dentística, Endodontia e Materiais Odontológicos, FOB/USP. Foram utilizados os seguintes parâmetros: 50kV, 800 mA, 360, zoom de 16.82 µm e resolução de 1304 x 2014. Os escaneamentos tiveram a finalidade de verificar a característica dos canais e a presença de istmos nos 6 mm apicais nas raízes mesiais dos primeiros molares inferiores, e posterior pareamento anatômico. Para este estudo optou-se por raízes que possuísem canais do tipo II e IV de Vertucci (VERTUCCI, 1984) e istmo do tipo V seguindo a classificação de Hsu & Klm (HSU & KIM, 1997) (fig 2).

Após o escaneamento dos dentes foram realizadas as reconstruções tridimensionais utilizando o programa NRecon (SkyScan, Kontich, Bélgica) e a

análise da anatomia interna nos 6 mm apicais por meio do software CTAn (SkyScan, Kontich, Bélgica) (fig 3) e selecionados os dentes para o presente estudo. Os 30 primeiros molares inferiores foram randomicamente divididos em 2 grupos (n=15) por meio do software on line (<http://www.openepi.com/Menu/OpenEpiMenu.htm>). Após a divisão dos grupos foi calculado o volume do canal e do istmo de todos os dentes de cada grupo utilizando o software CTAn (SkyScan, Kontich, Bélgica) e foi realizado o teste estatístico de Mann-Whitney ($p < 0.05$) para verificar se havia diferença significativa entre os volumes dos mesmos entre os grupos. Desta forma, a influência da anatomia nos resultados foi diminuída.

Todos os dentes tiveram suas coroas removidas ao nível da junção cimento-esmalte por meio de disco diamantado de 0,3 mm de espessura em máquina de corte Isomet (Isomet, Buehler, Lake Bluff, Illinois, EUA) a 200rpm com objetivo de facilitar o preparo dos canais radiculares. Para instrumentação dos canais foi utilizado o motor VDW Silver Reciproc (VDW GmbH, Munique, Alemanha) e a técnica de preparo utilizada foi a coroa-ápice hibridizando o sistema recíprocante Reciproc com o sistema rotatório Mtwo. Primeiramente o comprimento de trabalho foi estabelecido pela visualização da lima tipo K nº 10 (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça) no forame apical e subtraindo-se 1 mm. O preparo dos canais foi dividido em 3 terços: cervical, médio e apical sendo que o preparo inicial foi realizado com instrumento R25 do sistema Reciproc. O canal foi inundado com Hipoclorito de sódio a 1% e foi realizada a exploração inicial de 2/3 do comprimento de trabalho com a lima manual tipo K nº15 (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça) e o preparo cervical com a broca CP Drill (Helse, São Paulo, SP, Brasil). Na sequência foi utilizado o instrumento R25 com suaves movimentos de introdução e remoção de pequenas amplitudes até que se atingisse os 2/3 do comprimento de trabalho. Em seguida os canais foram irrigados com 2 ml de NaOCl a 1% com auxílio de uma seringa e agulha de calibre 30 (Navitip, Ultradent Products Inc. South Jordan, UT) e foi realizada a irrigação passiva ultrassônica por 20 segundos utilizando o ultrassom Jet-Sonic Four Plus (Gnatus, Ribeirão Preto, SP, Brasil) operando no modo Endo e potência 2, munido da ponta Irrisonic (Helse, São Paulo, SP, Brasil) direcionada para as áreas de istmos. Seguiu-se o preparo primeiramente à 3 mm do comprimento de trabalho e posteriormente até atingir a extensão do mesmo, sendo que a agitação ultrassônica foi realizada em cada uma das etapas. Para finalização do preparo do terço apical foi utilizado o instrumento 35.04 do sistema rotatório Mtwo (VDW,

Munique, Alemanha) a 250 rpm e 1.2 N de torque. Após o término do preparo foi realizada a irrigação passiva ultrassônica do EDTA a 17% (Biodinâmica Química e Farmacêutica Ltda., Ibiporã, PR, Brasil) a 2 mm aquém do comprimento de trabalho por 20s, a qual foi repetida por 3 vezes. Ao final cada canal foi irrigado com 5 mL de solução fisiológica e secos com pontas de papel absorvente 35.02 (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça) e armazenados em estufa úmida a 37 °C por 48 horas.

Figura 1: Microtomógrafo SkyScan modelo 1174 (SkyScan, Kontich, Bélgica).

Figura 2: (A) Análise da morfologia interna. Em vermelho, evidenciando a presença de istmos nas raízes mesiais. (B) Modelo tridimensional da anatomia interna dos 6mm apicais (em vermelho os canais radiculares, em cinza a região de istmos).

Figura 3: (A) Canais tipo II e IV da classificação de Vertucci (1984). (B) Istmo do Tipo V da classificação de Hsu & Kim(2010).

4.2 Obturação dos canais

Para a obturação dos canais a quantidade de cimento obturador foi determinada por um estudo piloto realizado previamente. Além disso, a porção das bisnagas do cimento obturador AH Plus a ser utilizada foi padronizada para ambos os grupos seguindo a metodologia de Baldi et al.,(2012), sendo a porção média selecionada utilizando-se uma caixa de cimento obturador para cada grupo.

Para a obturação, porções iguais da pasta A e pasta B foram colocadas sobre uma placas de vidro e pesadas em uma balança de precisão AR 2140 (Ohaus Corporation, Shangai, China) sendo que a quantidade de cimento para cada dente foi de aproximadamente 0,1012 gramas. Após a pesagem foi adicionado ao cimento o corante Rodamina B em uma concentração aproximada de 0,1%, para obtenção da fluorescência na microscopia confocal à laser (D'ALPINO et al., 2006) e misturados em uma placa de vidro, usando uma espátula de metal nº 24 até se obter uma consistência homogênea

Para os dois grupos o cimento obturador foi inserido a 2 mm aquém do comprimento de trabalho com auxilio de espiral de Lentulo nº 35 acionada em motor elétrico VDW Silver Reciproc (VDW GmbH, Munique, Alemanha) utilizando rotação horária contínua de 250 rpm. Após sua inserção, os dentes do grupo 1 tiveram o cimento obturador agitado com ultrassom por 20 segundos utilizando o aparelho Jet-Sonic Four Plus (Gnatus, Ribeirão Preto, SP, Brasil) operando no modo Endo e potência 2, munido do inserto Irrisonic (Helse, São Paulo, SP, Brazil) a 2 mm do comprimento de trabalho e direcionado para as áreas de istmos (JIANG et al., 2010) (fig4). Para a obturação foram utilizados cones de guta-percha 35.04 do sistema Mtwo (VDW GmbH, Munique, Alemanha), os quais foram inseridos envoltos em

cimento e em movimento único. Os dentes do grupo 2 foram obturados seguindo os mesmos critérios, porém o cimento obturador não foi agitado com ultrassom. Após a obturação o excesso de cones foi cortado e uma leve compactação vertical foi realizada com condensadores de Paiva nº 3 (Golgran, São Paulo, Brasil) e os dentes foram mantidos em umidade de 95% a 37°C durante 7 dias, para a presa do cimento.

Figura 4: Ponta de ultrassom Irrisonic direcionada para o istmo para agitação do cimento obturador.

4.3 Seccionamento dos espécimes para análise em microscopia

Após o período de armazenamento os dentes tiveram suas raízes seccionadas transversalmente a 2,4 e 6 mm do ápice com espessura de 2 mm na máquina de corte Isomet (Isomet, Buehler, Lake Bluff, Illinois, EUA) com disco diamantado de 0,3 mm de espessura a 200 rpm e irrigação contínua com água. O primeiro ponto estabelecido para o corte da raiz foi 2mm aquém do ápice radicular, descartando o primeiro corte. Os 3 cortes seguintes foram realizados a cada 2 mm até a obtenção das 3 secções desejadas (fig5). Foram obtidas 45 secções por grupo, totalizando 90 secções para a análise, as quais foram fixadas em uma lâmina de vidro e fixadas com cola instantânea e posteriormente polidas em Politriz (Arotec, Cotia, SP, Brasil) utilizando lixas d'água de granulometria 600, 900 e 1200.

Figura 5: Obtenção das 3 secções e as mesmas fixadas nas lâmina de vidro para análise em microscopia

4.4 Avaliação em Estereomicroscopia

Todas as secções foram fotografadas utilizando o estereomicroscópio modelo ZEIS Estereo 2000C com câmera Axio Cam (Carl Zeiss MicroImaging, LLC, EUA) a 8x de aumento com a finalidade de quantificar a área de cimento e de vazios na obturação. Para isso foi utilizado o software Axiovision (Carls Zeis). Para a análise das imagens, canais e istmos foram separadamente analisados realizando uma divisão entre eles (fig 6). Foram medidas em todas as secções (2,4 e 6 mm), a área total do canal, a área total de guta-percha e a área total de vazios em micrometros quadrados (μm^2). Para calcular os dados referentes aos canais foi calculada a área total do canal, os valores de área de guta-percha e de espaços vazios. Assim, a área total de cimento foi obtida por meio da seguinte fórmula: Área total do canal – (Área total de guta-percha + área de espaços vazios) = Área total de cimento. Para as áreas de istmos, foi calculada a área total dos istmos e de espaços vazios e a diferença entre esses valores corresponde a área total de cimento. Todas as medidas obtidas foram posteriormente transformadas em porcentagem para o cálculo e análise estatística.

Figura 6: (A) Imagem representativa de uma secção vista no estereomicroscópio. (B) Linha amarela representando a delimitação da área do canal. (C) Linha amarela representando a delimitação da área do istmo.

4.5 Avaliação em Microscopia confocal de varredura a laser

A interface cimento/dentina foi analisada em microscópio confocal à laser modelo Laica TCS-SPE (Leica Microsystems GmbH, Mannheim, Alemanha) em modo de fluorescência. Os comprimentos de ondas de absorção e emissão para fluorescência da Rodamina B 0,1% foram de 540 e 590 nm, respectivamente. As diferentes secções foram visualizadas em 10 μm em profundidade nos espécimes com 100X de zoom. Estas imagens foram gravadas em uma resolução de 1024 x 1024 pixels e salvas em formato TIFF.

Para mensurar as falhas de adaptação na interface cimento/dentina (fendas), do cimento às paredes dentinárias dos canais e dos istmos e o segmento onde houve penetração do cimento obturador nos túbulos dentinários, os canais e os istmos foram separados da mesma forma para a análise das imagens do estereomicroscópio. Para isso, foi calculado o perímetro da parede dentinária do canal (fig. 7), o perímetro de penetração do cimento obturador nas mesmas (fig. 8) e o perímetro das fendas (fig. 9). Nas áreas de istmos foi mensurado o perímetro das

paredes dentinárias mesial e distal (fig. 10), o perímetro do cimento obturador nos túbulos dentinários das mesmas (fig.11) e o perímetro de falhas na interface cimento/dentina (fendas) (fig.12). Todas as imagens foram avaliadas no programa Image J V1.46r (National Institute of health, USA). A escala dada pelas imagens de microscopia confocal (100 μ m) foi regulada no programa Image J e as medidas foram obtidas em milímetros. Uma vez obtida essas medidas todas elas foram transformadas em porcentagens.

Figura 7: Mensuração do perímetro total das paredes dentinárias do canal (mm).

Figura 8: Mensuração do perímetro de penetração do cimento obturador no interior dos túbulos dentinários

Figura 9: (A) Análise da interface cimento/dentina (fenda). (B) Seta em azuis indicando a região de fenda.

Figura 10: Mensuração do perímetro de paredes dentinárias mesial e distal dos istmos.

Figura 11: Mensuração do perímetro de penetração do cimento obturador no interior dos túbulos dentinários.

Figura 12: (A) mensuração do perímetro de fendas na área de istmo. (B) Setas azuis indicando a presença de fendas.

4.6 Ação antimicrobiana intra-dentinária

4.6.1 Preparo dos canais de dentes de bovinos

Para realização deste teste foram utilizados 30 dentes incisivos de bovinos, os quais foram devidamente limpos, fixados em placas acrílicas e levados à máquina de corte (Isomet, Buehler, Lake Bluff, Illinois, EUA) com refrigeração constante para remoção dos 2mm apicais e a partir daí foi seccionada uma porção radicular com 6 mm de espessura, obtendo espécimes semelhantes à cilindros de dentina, sendo que a parede vestibular foi identificada. Todos os cilindros de dentina tiveram seus diâmetros padronizados até a lima tipo K número 80 (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça) e após esse procedimento as secções foram imersas em Hipoclorito de sódio a 1% por 5 minutos e neutralizados com solução fisiológica. Por fim, as secções

foram imersas em solução de EDTA (Biodinâmica Química e Farmacêutica Ltda., Ibiporã, Pr, Brasil) por 3 minutos, neutralizadas com solução fisiológica e secas com pontas de papel absorvente correspondente ao diâmetro 80 (Dentsply Maillefer, Tulsa, EUA). A superfície externa dos cilindros de dentina foi impermeabilizada por uma dupla camada de esmalte de unha vermelho (Colorama, São Paulo, Brasil), com o objetivo de promover a contaminação dos túbulos dentinários somente via canal (fig. 13). Após um período de 24 horas para secagem todas as secções foram incluídas em microtubos tipo Eppendorf de 1.5 mL e esterilizadas em autoclave a 121 °C.

4.6.2 Contaminação dos cilindros de dentina

Para a contaminação dos cilindros de dentina foram utilizadas as cepas bacterianas de *Enterococcus faecalis* catalogadas com número de registro da American Type Culture Collection (ATCC 29212). Todos os procedimentos de contaminação foram realizados dentro de uma câmara de fluxo laminar seguindo os protocolos de biossegurança.

As cepas de *Enterococcus faecalis* foram cultivadas em 5 mL de caldo BHI esterilizado e mantidas em estufa de cultura a 37°C durante 24 horas. Para realizar o processo de contaminação foi seguido o protocolo proposto por Andrade et al. (2015).

No primeiro dia do protocolo de contaminação foi realizado o preparo do inóculo. Para isso, a absorbância dos tubos com cultura em crescimento foram medidas, utilizando um espectrofotômetro (1105 BEL Photonics do Brasil, Osasco, SP, Brasil) ajustado com comprimento de onda de 540nm. Os resultados obtidos foram comparados à escala de MacFarland para verificar sua concentração. Em um frasco contendo BHI esterilizado foi adicionado um volume calculado do caldo com *Enterococcus faecalis* para ajustar o inóculo a uma concentração de 3×10^8 UFC/mL. Este inóculo foi armazenado em estufa de cultura a 37°C durante 7 horas, para que ocorresse o crescimento exponencial dos micro-organismos. Após o referido período, utilizando uma câmara de fluxo laminar, 1000µL de BHI esterilizado foram adicionados em cada microtubo contendo um espécime, e, em seguida, estes foram levados a uma cuba ultrassônica (Odontobras, Ribeirão Preto, SP, Brasil) durante 15 minutos com o intuito de promover uma reidratação dos espécimes, bem como

possibilitar uma adequada penetração do meio de cultura nos túbulos dentinários. Em seguida, o BHI utilizado em cada microtubo foi removido e 1000 µL do inóculo foi adicionado. Os microtubos foram levados a uma centrífuga (Eppendorf 5417R, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) para a realização de uma sequência de centrifugações, em duplicata, nas velocidades 1400, 2000, 3600 e 5600 rotações por minuto (rpm), durante 5 minutos a 25°C. O inóculo foi renovado após cada centrifugação. Ao final das 8 centrifugações, o inóculo foi removido e 1000µL de BHI esterilizado foi adicionado. Em seguida, uma única centrifugação a 3600 rpm foi realizada durante 5 minutos a temperatura de 25°C. Os microtubos foram armazenados em estufa a 37°C durante 24 horas.

No segundo dia, o meio de cultura foi removido dos microtubos e 1000µL de BHI esterilizado foram adicionados, sendo em seguida realizada uma centrifugação a 3600g durante 5 minutos a 25°C. Os microtubos foram novamente armazenados em estufa a 37°C durante 24 horas.

No terceiro dia, o inóculo e todos os ciclos de centrifugações foram realizados da mesma forma como no primeiro dia. No quarto dia o procedimento foi o mesmo que o realizado no segundo dia. No quinto dia, os cilindros de dentina encontravam-se aptos para a obturação. A figura 14 mostra o protocolo de contaminação e os tubos colocados na centrífuga.

4.6.3 Obturação dos cilindros de dentina

Após o período de contaminação, em uma câmara de fluxo laminar, os cilindros de dentina contaminados foram removidos do meio de cultura e colocados sobre um papel de filtro esterilizado. Então os 30 cilindros de dentina foram divididos em 3 grupos (n=10). Sobre uma placa de vidro esterilizada, o AH Plus foi proporcionado com a mesma quantidade para todos os cilindros e manipulados conforme orientações do fabricante. Os espécimes do grupo 1 tiveram seus canais preenchidos previamente com cimento obturador com a lima tipo K 70 (Dentsply Maillefer, Tulsa, EUA) e foi realizada sua agitação com ultrassom Jet Sonic four plus (Gnatus, Riberão Preto, São Paulo) com a ponta Irrisonic (Helse, São Paulo, SP, Brasil), por 20 segundos no sentido vestibulo-palatino e posteriormente foi inserido um cone de guta-percha calibre 80 (Dentsply/Maillefer), o qual teve seu excesso removido por meio de uma lâmina de bisturi nº15. No grupo 2 o cimento obturador

foi inserido nos cilindros da mesma forma e foi realizado o assentamento do cone, sem agitação. O grupo 3 não recebeu nenhum tratamento e serviu como grupo controle. Em seguida os espécimes foram colocados em microtubos de 1,5 mL esterilizados e devidamente identificados, sendo armazenados em estufa de cultura a 37°C por uma semana para posterior análise em microscopia confocal a laser.

4.6.4 Análise em microscopia confocal a laser

Após o período de armazenamento os cilindros de dentina foram seccionados longitudinalmente no sentido vestibulo/palatino utilizando uma máquina de corte Isomet (Isomet, Buehler, Lake Bluff, Illinois, EUA) com disco diamantado de 0,3 mm de espessura a 200 rpm e com solução fisiológica esterilizada. Após o seccionamento, as secções foram imersas em EDTA a 17% (Biodinâmica Química e Farmacêutica Ltda., Ibiporã, PR, Brasil) durante 5 minutos e logo após foram imersos em solução fisiológica. Foi selecionada uma hemi-parte de cada espécime e corada com 30µL LIVE/DEAD® BacLight Bacterial Viability Kit (Invitrogen Molecular Probes, Eugene, OR, EUA) durante 10 minutos. Este corante é composto de dois fluorocromos de afinidade pelos ácidos nucleicos, o SYTO-9 e o Iodeto de propídeo. Por meio da coloração atribuída por esses fluorocromos, é possível determinar a viabilidade microbiana, tendo como parâmetro a integridade da membrana citoplasmática que é imprescindível para a manutenção da viabilidade celular. Desse modo, micro-organismos vivos, com membrana citoplasmática intacta, mostram fluorescência verde, enquanto que, micro-organismos mortos, com membrana citoplasmática comprometida, apresentam fluorescência vermelha (Jin et al., 2005). Dessa forma, é possível não só visualizar como também quantificar a viabilidade bacteriana. Todos os procedimentos de cultura microbiológica foram realizados dentro da câmara de fluxo laminar, evitando a contaminação das culturas e do ambiente.

Após o referido período, os espécimes foram imersas em solução fisiológica para remoção do excesso do corante e em seguida foram fixadas em uma lâmina de vidro com óleo de imersão e levadas ao microscópio confocal de varredura à laser (Leica TCS-SPE, Leica Microsystems GmbH, Mannheim, Alemanha). A obtenção das imagens de cada espécime foi realizada com a objetiva de 40x, com intervalo de 1µm de profundidade e resolução de imagem de 1024 x 1024 pixels. Foram obtidas

imagens de seis campos, sendo 3 superficiais (próximo a luz do canal) e 3 profundos (em direção a porção externa da raiz) (fig. 15), utilizando o programa Leica Application Suite-Advanced Fluorescence (LAS AF, Leica Mannheim, Alemanha). As imagens foram analisadas com o programa bioImageL v2-1 (CHÁVEZ DE PAZ, 2009) que gerou como resultados as porcentagens e o biovolume de bactérias vivas e mortas, baseado na fluorescência verde e vermelha respectivamente. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente.

Figura 13: (A) Cilindros de dentina radicular bovina. (B) Cilindros de dentina armazenados em Eppendorf com BHI.

Figura 14: Representação do protocolo de contaminação, troca do inóculo e centrifugação.

Figura 15: Representação das áreas analisadas em microscopia confocal de varredura a laser. Os quadrados vermelhos representam a área superficial e os azuis a profunda da dentina.

4.7 Análise dos resultados

As médias dos valores obtidos na análise dos canais e istmos em estereomicroscopia, e microscopia confocal de varredura à laser, dos dois grupos, foram submetidas ao teste de normalidade de *Shapiro-Wilk*. Como resultado da ausência de normalidade, foi utilizado o teste não-paramétrico de Mann-Whitney, para comparação entre os grupos.

Os dados obtidos na avaliação em microscopia confocal de varredura à laser da análise antimicrobiana foram submetidos ao teste de normalidade de *Shapiro-Wilk*. Como resultado da ausência de normalidade, foram utilizados os testes não-paramétricos de Kruska-Wallis e de Dunn.

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software GraphPad Prism 5 (Graphpad, La Jolla, CA, EUA). Para todos os testes foi adotado o nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

5 Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Da obturação dos canais

5.1.1 Análise em estereomicroscopia

As tabelas 1,2 e 3 mostram a Mediana e intervalo Mínimo e Máximo das quantidades, em porcentagem, de guta-percha, área de cimento e espaços vazios nas secções Apical (2mm), Média (4mm) e Cervical (6mm) dos canais. Entre os grupos analisados não houve diferença estatística ($p>0.05$) com relação à área de guta-percha e cimento em todas as secções analisadas, porém houve diferença estatística significativa ($p<0,05$) com relação aos espaços vazios quando o cimento obturador foi agitado com ultrassom em todas as secções avaliadas. O teste não-paramétrico de Mann-Whitney foi realizado para a comparação entre os grupos.

Tabela 1. Mediana e intervalo Mínimo e Máximo das quantidades, em porcentagem, de guta-percha, cimento e vazios na secção apical (2 mm) dos canais. A sigla CUS e SUS correspondem aos cimentos ativados ou não pelo ultrassom respectivamente.

Secção Apical (2 mm)			
	%GP	%C	%V
CUS	68,99 (51,71 – 83,72) ^a	31,01(16,28 - 48,29) ^a	0,00 (0,00 - 4,89) ^a
SUS	68,41 (42,26 – 86,26) ^a	29,61(13,74 - 57,74) ^a	0,11 (0,00 -13,15) ^b

As siglas %GP, %C e %V correspondem a área de guta-percha, de cimento e de vazio em porcentagem respectivamente. As letras a, b diferentes correspondem às diferenças estatísticas significantes entre os grupos ($p<0.05$).

Tabela 2. Mediana e intervalo Mínimo e Máximo das quantidades, em porcentagem, de guta-percha, cimento e vazios na secção média dos canais (4 mm). A sigla CUS e SUS correspondem aos cimentos ativados ou não pelo ultrassom respectivamente.

Secção Média (4 mm)			
	%GP	%C	%V
CUS	61,18 (34,24 - 90,06) ^a	38,40 (9,94 - 65,61) ^a	0,00 (0,00 - 3,28) ^a
SUS	66,16 (46,63 - 80,69) ^a	32,48 (12,35 - 51,41) ^a	1,57 (0,00 - 13,65) ^b

As siglas %GP, %C e %V correspondem a área de guta-percha, de cimento e de vazio em porcentagem respectivamente. As letras a, b diferentes correspondem às diferenças estatísticas significantes entre os grupos ($p<0.05$).

Tabela 3. Mediana e intervalo Mínimo e Máximo das quantidades, em porcentagem, de guta-percha, cimento e vazios na secção cervical (6 mm) dos canais. A sigla CUS e SUS correspondem aos cimentos ativados ou não pelo ultrassom respectivamente.

Secção Cervical (6 mm)			
	%GP	%C	%V
CUS	67,17 (46,91 - 86,76) ^a	30,14 (11,26 - 53,09) ^a	0,00 (0,00 - 4,49) ^a
SUS	64,54 (48,34 - 91,63) ^a	34,14 (8,37 - 50,41) ^a	2,33 (0,00 - 5,58) ^b

As siglas %GP, %C e %V correspondem a área de guta-percha, de cimento e de vazio em porcentagem respectivamente. As letras a, b diferentes correspondem às diferenças estatísticas significantes entre os grupos ($p < 0.05$)

As tabelas 4,5 e 6 mostram a Mediana e intervalo Mínimo e Máximo das quantidades, em porcentagem, de cimento e de espaços vazios nas secções Apical (2mm), Média (4mm) e Cervical (6mm) das áreas de istmos. Entre os grupos analisados houve diferença significativa ($p < 0,05$) com relação à área de cimento obturador e área de espaços vazios em todas as secções avaliadas.

Tabela 4. Mediana e intervalo Mínimo e Máximo das quantidades, em porcentagem, de cimento e vazios na secção apical (2 mm) dos istmos. A sigla CUS e SUS correspondem aos cimentos ativados ou não pelo ultrassom respectivamente.

Secção Apical (2 mm)		
	%C	%V
CUS	100,0 (88,02 - 100,0) ^a	0,00 (0,00 - 11,98) ^a
SUS	94,54 (46,73 - 100,0) ^b	5,46 (0,00 - 53,27) ^b

As siglas %C e %V correspondem a área de cimento obturador e de vazio em porcentagem respectivamente. As letras a, b diferentes correspondem às diferenças estatísticas significantes entre os grupos ($p < 0.05$).

Tabela 5. Mediana e intervalo Mínimo e Máximo das quantidades, em porcentagem, de cimento e vazios na secção média (4 mm) dos istmos. A sigla CUS e SUS correspondem aos cimentos ativados ou não pelo ultrassom respectivamente.

Secção Média (4 mm)		
	%C	%V
CUS	100 (84,34 - 100,0) ^a	0,00 (0,00 - 15,66) ^a
SUS	85,62 (54,65 - 100,0) ^b	14,38 (0,00 - 45,35) ^b

As siglas %C e %V correspondem a área de cimento obturador e de vazio em porcentagem respectivamente. As letras a, b diferentes correspondem às diferenças estatísticas significantes entre os grupos ($p < 0.05$).

Tabela 6. Mediana e intervalo Mínimo e Máximo das quantidades, em porcentagem, de cimento e vazios na secção cervical (6 mm) dos istmos. A sigla CUS e SUS correspondem aos cimentos ativados ou não pelo ultrassom respectivamente.

Secção Cervical (6 mm)		
	%C	%V
CUS	100 (88,12 - 100,0) ^a	0,00 (0,00 - 11,88) ^a
SUS	87,97 (33,98 - 100,0) ^b	12,03 (0,00 - 66,02) ^b

As siglas %C e %V correspondem a área de cimento obturador e de vazio em porcentagem respectivamente. As letras a, b diferentes correspondem às diferenças estatísticas significantes entre os grupos ($p < 0.05$).

5.1.2 Análise em Microscopia Confocal de Varredura à laser

As tabelas 7, 8 e 9 mostram a Mediana e Intervalo Mínimo e Máximo das quantidades, em porcentagem, de Fenda e Perímetro de Penetração do cimento obturador nos túbulos dentinários nas secções Apical (2mm), Média (4mm) e Cervical (6mm) dos canais. Com relação ao perímetro de penetração nos túbulos dentinários houve diferença estatística significativa ($P < 0.05$) nos canais em todas as secções avaliadas. A agitação ultrassônica do cimento obturador promoveu menor presença de fendas ($p < 0.05$) na secção cervical (6mm) nos canais. O teste não-paramétrico de Mann-Whitney foi realizado para a comparação entre os grupos.

Tabela 7. Mediana e intervalo Mínimo e Máximo das quantidades, em porcentagem, de Fendas e Perímetro de penetração na secção Apical (2 mm) dos canais. A sigla CUS e SUS correspondem aos cimentos ativados ou não pelo ultrassom respectivamente.

Secção Apical (2 mm)		
	% Fenda	% Penetração
CUS	0,00 (0,00 - 9,49) ^a	93,16 (76,91 - 100,0) ^a
SUS	4,40 (0,00 - 20,46) ^a	62,73 (35,14 - 100,0) ^b

As siglas %Fenda e % Penetração correspondem ao perímetro das fendas e de penetração do cimento obturador nos túbulos dentinários em porcentagem respectivamente. As letras a, b diferentes correspondem às diferenças estatísticas significantes entre os grupos ($p < 0.05$).

Tabela 8. Mediana e intervalo Mínimo e Máximo das quantidades, em porcentagem, de Fendas e Perímetro de penetração na secção Média (4 mm) dos canais. A sigla CUS e SUS correspondem aos cimentos ativados ou não pelo ultrassom respectivamente.

Secção Média (4 mm)		
	% Fenda	% Penetração
CUS	0,00 (0,00 - 9,60) ^a	89,03 (67,23 - 100,0) ^a
SUS	6,44 (0,00 - 23,03) ^a	74,77 (38,80 - 100,0) ^b

As siglas %Fenda e % Penetração correspondem ao perímetro das fendas e de penetração do cimento obturador nos túbulos dentinários em porcentagem respectivamente. As letras a, b diferentes correspondem às diferenças estatísticas significantes entre os grupos ($p < 0.05$).

Tabela 9. Mediana e intervalo Mínimo e Máximo das quantidades, em porcentagem, de Fendas e do Perímetro de penetração na secção Cervical (6 mm) dos canais. A sigla CUS e SUS correspondem aos cimentos ativados ou não pelo ultrassom respectivamente.

Secção Cervical (6 mm)		
	% Fenda	% Penetração
CUS	4,18 (0,00 - 16,68) ^a	90,88 (58,58 - 100,0) ^a
SUS	10,74 (0,00 - 28,07) ^b	71,47 (19,12 - 100,0) ^b

As siglas %Fenda e % Penetração correspondem ao perímetro das fendas e de penetração do cimento obturador nos túbulos dentinários em porcentagem respectivamente. As letras a, b diferentes correspondem às diferenças estatísticas significantes entre os grupos ($p < 0.05$).

Os dados obtidos nas áreas de istmos estão nas tabelas 10,11 e 12. As tabelas apresentam a Mediana e intervalo Mínimo e Máximo das quantidades, porcentagem, de fendas e perímetro de penetração nas secções Apical (2mm), Média (4mm) e Cervical (6mm) das áreas de istmos. Entre os grupos analisados houve diferença significativa ($p < 0,05$) com relação a menor presença de fendas nas secções média (4mm) e cervical (6mm). Já a porcentagem do perímetro de penetração apresentou um aumento significativo ($p < 0.05$) em todas as secções analisadas.

Tabela 10. Mediana e intervalo Mínimo e Máximo das quantidades, em porcentagem, de Fendas e Perímetro de penetração na secção Apical (2 mm) dos istmos. A sigla CUS e SUS correspondem aos cimentos ativados ou não pelo ultrassom respectivamente.

Secção Apical (2 mm)		
	% Fenda	% Penetração
CUS	0,00 (0,00 - 9,31) ^a	87,05 (6,00 - 100,0) ^a
SUS	0,00 (0,00 - 52,55) ^b	0,00 (0,00 - 82,11) ^b

As siglas % Fenda e % Penetração correspondem ao perímetro das fendas e de penetração do cimento obturador nos túbulos dentinários em porcentagem respectivamente. As letras a, b diferentes correspondem às diferenças estatísticas significantes entre os grupos ($p < 0.05$)

Tabela 11. Mediana e intervalo Mínimo e Máximo das quantidades, em porcentagem, de Fendas e Perímetro de penetração na secção Média (2 mm) dos istmos. A sigla CUS e SUS correspondem aos cimentos ativados ou não pelo ultrassom respectivamente.

Secção Média (4 mm)		
	% Fenda	% Penetração
CUS	0,00 (0,00 - 32,63) ^a	84,36 (24,33 - 100,0) ^a
SUS	0,00 (0,00 - 30,69) ^a	4,90 (0,00 - 100,0) ^b

As siglas %Fenda e % Penetração correspondem ao perímetro das fendas e de penetração do cimento obturador nos túbulos dentinários em porcentagem respectivamente. As letras a, b diferentes correspondem às diferenças estatísticas significantes entre os grupos ($p < 0.05$)

Tabela 12. Mediana e intervalo Mínimo e Máximo das quantidades, em porcentagem, de Fendas e Perímetro de penetração na secção Cervical (6 mm) dos istmos. A sigla CUS e SUS correspondem aos cimentos ativados ou não pelo ultrassom respectivamente.

Secção Cervical (6 mm)		
	% Fenda	% Penetração
CUS	0,00 (0,00 - 40,06) ^a	76,25 (24,40 - 100,0) ^a
SUS	2,50 (0,00 - 34,43) ^b	36,79 (0,00 - 76,22) ^b

As siglas % Fenda e % Penetração correspondem ao perímetro das fendas e de penetração do cimento obturador nos túbulos dentinários em porcentagem respectivamente. As letras a, b diferentes correspondem às diferenças estatísticas significantes entre os grupos ($p < 0.05$)

As figuras 16 e 18 representam as imagens das secções apical (2 mm), média (4 mm) e cervical (6 mm) em estereomicroscópio (A, B e C) e em microscopia confocal de varredura à laser (D, E e F) de alguns espécimes do grupo em que o cimento foi agitado com o ultrassom. O grupo sem agitação ultrassônica está representado nas figuras 17 e 19, sendo as imagens representativas das secções apical (2mm), média (4mm) e cervical (6mm) em estereomicroscópio (A, B e C) e microscopia confocal de varredura à laser (D, E e F)

Figura 16: Imagens representativas A, B e C das seções apical (2 mm), média (4 mm) e cervical (6 mm) em estereomicroscópio e D, E e F em microscopia confocal de varredura à laser do grupo em que o cimento foi agitado com ultrassom.

Figura 17: Imagens representativas A, B e C das seções apical (2 mm), média (4 mm) e cervical (6 mm) em estereomicroscópio e D, E e F em microscopia confocal de varredura à laser do grupo em que o cimento não foi agitado com ultrassom.

Figura 18: Imagens representativas A, B e C das secções apical (2 mm), média (4 mm) e cervical (6 mm) em estereomicroscópio e D, E e F em microscopia confocal de varredura à laser do grupo em que o cimento foi agitado com ultrassom

Figura 19: Imagens representativas A, B e C das secções apical (2 mm), média (4 mm) e cervical (6 mm) em estereomicroscópio e D, E e F em microscopia confocal de varredura à laser do grupo em que o cimento não foi agitado com ultrassom.

5.2 Análise da ação antimicrobiana intra-dentinária em microscopia confocal de varredura à laser

Por meio das análises das imagens obtidas em microscopia confocal de varredura à laser, foi possível constatar que o uso do ultrassom para agitação do cimento obturador proporcionou uma redução significativa ($p < 0.05$) na viabilidade intratubular do *Enterococcus faecalis* em relação ao grupo controle e ao grupo sem agitação ultrassônica na área superficial da dentina (gráfico 1). Não houve diferença estatística significativa ($p > 0.05$) entre o grupo controle superficial e o grupo sem agitação ultrassônica. Os testes não paramétrico de Kruskal-Wallis e de Dunn foram utilizados na análise entre os grupos.

Gráfico 1 - Gráfico apresentando a mediana, intervalo mínimo e máximo da porcentagem de bactérias viáveis na dentina superficial dos grupos: Controle superficial (CS), Sem ultrassom superficial (SUSS) e Com Ultrassom superficial. Diferentes letras indicam diferença estatística ($p < 0.05$)

Na área de dentina profunda não houve diferença estatística significativa ($p > 0.05$) entre o grupo em que o cimento foi agitado com ultrassom e o sem agitação e também entre o grupo controle e o grupo sem agitação. No entanto, houve diferença estatística significativa ($p < 0.05$) na viabilidade intratubular do *Enterococcus faecalis* entre o grupo agitado com ultrassom e o grupo controle (gráfico 2).

Gráfico 2 - Gráfico apresentando a mediana, intervalo mínimo e máximo da porcentagem de bactérias viáveis na dentina profunda dos grupos: Controle profundo (CP), Sem ultrassom Profundo (SUSP) e Com Ultrassom profundo (CUSP). Diferentes letras indicam diferença estatística ($p < 0.05$).

Por meio das análises das imagens obtidas em microscopia confocal de varredura à laser, constatou-se que não houve diferença estatística significativa ($p > 0.05$) de biovolume entre os grupos na dentina superficial. Os testes não paramétrico de Kruskal-Wallis e de Dunn foram utilizados na análise entre os grupos.

Tabela 13. Mediana e intervalo Mínimo e Máximo de Biovolume, em μm^3 , dos grupos avaliados no teste antimicrobiano na dentina superficial. As siglas **CUSS**, **SUSS** e **CS** correspondem ao grupo em que o cimento obturador foi agitado com o ultrassom, sem agitação ultrassônica e grupo controle, da dentina superficial respectivamente.

Biovolume na Dentina Superficial			
	CUSS	SUSS	CS
Biovolume (μm^3)	8096 (2054- 29284) ^a	7376 (2015- 28960) ^a	9731 (2039 – 33412) ^a

A letra a corresponde que não houve diferença estatística significantes entre os grupos ($p < 0.05$).

Na dentina profunda, as imagens obtidas em microscopia confocal de varredura à laser, constatou-se que houve diferença estatística significativa ($p > 0.05$) de biovolume entre os grupos na dentina profunda. Os testes não paramétrico de Kruskal-Wallis e de Dunn foram utilizados na análise entre os grupos.

Tabela 14. Mediana e intervalo Mínimo e Máximo de Biovolume, em μm^3 , dos grupos avaliados no teste antimicrobiano na dentina profunda. As siglas **CUSS**, **SUSS** e **CS** correspondem ao grupo em que o cimento obturador foi agitado com o ultrassom, sem agitação ultrassônica e grupo controle, da dentina profunda respectivamente.

Biovolume na Dentina Profunda			
	CUSS	SUSS	CS
Biovolume (μm^3)	10263 (1863- 32284) ^a	6376 (1103- 24960) ^b	4370 (695 – 19277) ^b

As siglas **CUSS**, **SUSS** e **CS** correspondem ao grupo em que o cimento obturador foi agitado com o ultrassom, sem agitação ultrassônica e grupo controle, da dentina profunda respectivamente. As letras a, b diferentes correspondem às diferenças estatísticas significantes entre os grupos ($p < 0.05$).

Figura 20: Imagens representativas da viabilidade bacteriana na dentina superficial em microscopia confocal de varredura à laser: A (grupo controle), B (sem agitação ultrassônica do cimento obturador) e C (com agitação do cimento obturador). Pode se observar as bactérias vivas (verde) e mortas (vermelho).

Figura 21: Imagens representativas da viabilidade bacteriana na dentina profunda em microscopia confocal de varredura à laser: A (grupo controle), B (sem agitação ultrassônica do cimento obturador) e C (com agitação do cimento obturador). Pode se observar as bactérias vivas (verde) e mortas (vermelho).

6 Discussão

6 DISCUSSÃO

6.1 Discussão das metodologias

6.1.1 Discussão da metodologia da obturação

A microtomografia tem sido amplamente utilizada para estudos anatômicos, avaliação do preparo dos canais radiculares, obturação e retratamento endodôntico (PLOTINO et al., 2006). Sua alta resolução, tem se mostrado promissora para análises qualitativas e quantitativas em pesquisas laboratoriais “in vivo” e “ex vivo” (SWAIN; XUE, 2009). A abordagem não destrutiva do microtomógrafo torna possível estudar anatomia de forma mais precisa e ao mesmo tempo superar as deficiências de técnicas anteriores. Outra vantagem deste método é que a anatomia interna dos canais radiculares pode ser estudada e reconstruída tridimensionalmente (PETERS et al., 2000). Assim, o uso da microtomografia computadorizada permitiu a seleção de 2 tipos anatômicos de molares inferiores para realização deste estudo. Foram selecionados primeiros molares inferiores que apresentassem anatomia do canal tipo II e IV de Vertucci (1984) e com a presença de istmos do tipo V de HSU & KIM, (1997). Após a seleção os dentes foram randomicamente divididos em 2 grupos e realizou-se o cálculo do volume dos 6 mm apicais dos canais e dos istmos de cada amostra, os quais foram similares perante a análise estatística. Este procedimento foi realizado, pois canais com maiores volumes apresentam maior facilidade de serem preenchidos pelos materiais obturadores e, ao mesmo tempo é necessário maiores volumes dos mesmos. Portanto, grandes diferenças de volume entre os espécimes poderiam influenciar na presença de falhas na obturação e consequentemente nos resultados. Assim, o microtomógrafo foi um auxiliar importante para maior padronização dos espécimes e na diminuição de viés relacionados à anatomia.

A solução irrigadora de escolha para o preparo dos canais radiculares foi o Hipoclorito de sódio, por possuir ação na dissolução de tecidos orgânicos e ser a solução irrigadora mais utilizada na endodontia (MOHAMMADI, 2008). A ativação ultrassônica da solução irrigadora potencializa o efeito de limpeza dos canais radiculares, removendo eficientemente os debris dentinários, restos de tecidos

orgânicos, bactérias e seus subprodutos dos canais e dos istmos (Burleson et al., 2007). No presente estudo optou-se por dividir o preparo dos canais radiculares em 3 partes (terço cervical, médio e apical) para facilitar a padronização do preparo e do protocolo de irrigação utilizado. A cada etapa do preparo foi realizada a agitação passiva ultrassônica do hipoclorito de sódio visando otimizar a limpeza dos canais e dos istmo, pois debris são formados durante a instrumentação e estes tendem a se acumular podendo obliterar istmos, canais laterais e ramificações do sistema de canais radiculares (PAQUÉ et al., 2009). Impedindo que estas áreas sejam preenchidas pelos materiais obturadores (ENDAL et al., 2011). Ao final do preparo dos canais o EDTA 17% foi agitado ultrassônicamente 3 vezes por 20 segundos para remoção da smear layer, expondo mais túbulos dentinários, favorecendo a penetração do cimento obturador (VAN DER SLUIS et al., 2007a).

Para o presente estudo, todos os canais radiculares foram instrumentados até o diâmetro 35 e conicidade de 4%, pois canais com diâmetros iguais ou maiores que 35 e conicidade de 2% favorecem a remoção de debris e restos de tecidos pulpar dos mesmos (FORNARI et al., 2010). Além disso, uma maior conicidade no preparo dos canais favorece a remoção de debris durante a agitação ultrassônica, quando comparados com canais dilatados com o mesmo diâmetro apical e com menor conicidade, pois há maior capacidade de fluxo da solução irrigadora e de agitação do inserto ultrassônico (LEE et al., 2004; VAN DER SLUIS et al., 2005).

O cimento obturador tem a função de preencher áreas onde a guta-percha não consegue preencher e unir a massa obturadora às paredes dentinárias (RAHIMI et al., 2009; BRANSTETTER & FRAUFOER, 1982). Uma das principais características de um bom cimento obturador é um bom escoamento, podendo penetrar em istmos, canais laterais, túbulos dentinários e outros componentes do sistema de canais radiculares (SIQUEIRA et al., 1995). O cimento AH Plus é um dos cimentos obturadores que apresenta um bom escoamento, no entanto, algumas de suas propriedades obturadoras, tal como o escoamento, podem variar dependendo de qual porção do tubo foi utilizada (BALDI et al., 2012). Baldi et al. (2012) avaliaram o tempo de presa, escoamento, radiopacidade e o grau de conversão da resina de 3 diferentes porções (inicial, médio e final) do tubo do cimento AH Plus. Os resultados mostraram que os maiores valores de tempo de presa e de escoamento foram encontrados nas amostras da parte inicial do tubo, a maior radiopacidade na parte final e que a porção média apresentou os resultados mais homogêneos. Acredita-se

que essa alteração esteja relacionada à segregação dos componentes orgânicos e inorgânicos do cimento. Por esta razão, foi realizada a padronização da porção do tubo a ser utilizada, sendo que a porção escolhida foi a média, diminuindo assim variáveis relacionadas às essas alterações físico-químicas. Outro detalhe importante foi a padronização da quantidade (em massa) do cimento endodôntico para obturação, o que auxiliou a diminuir o viés nos nossos resultados em decorrência de maior ou menor quantidade de cimento que poderia ter sido inserida em cada amostra.

A técnica do cone único vem sendo amplamente utilizada juntamente à instrumentação rotatória. Assim o uso de um cone principal de diâmetro e conicidade semelhantes aos instrumentos dos sistemas rotatórios reduz o tempo de trabalho e facilita a obturação (GORDON et al., 2005). No entanto, Marciano et al. (2011) demonstraram que a obturação de dentes com anatomia complexa (primeiros molares inferiores) pela técnica do cone único tende a apresentar maior presença de espaços vazios na obturação, sendo que o istmo é um fator que influência na qualidade da obturação. Esta técnica de obturação foi escolhida por se tratar de uma técnica simples, rápida e de fácil padronização (GOUND et al., 2009). Além disso, optou-se por esta técnica por ela necessitar de baixas força compressivas (MARCIANO et al., 2011), o que provavelmente diminui a influência sobre o escoamento do cimento obturador para os túbulos dentinários e áreas de istmo. Assim foi possível avaliar melhor a influência da agitação ultrassônica sobre o cimento obturador

Embora não haja uma vasta literatura científica abordando a agitação ultrassônica de cimentos, há artigos relacionados ao uso do ultrassom em outros procedimentos endodônticos. As primeiras pesquisas com a utilização do ultrassom na Odontologia surgiram por volta da década de 50. Atualmente ele é largamente utilizado na pratica endodôntica. Sua principal utilização é na irrigação, devido sua otimização na limpeza dos canais radiculares (PLOTINO et al., 2007; VAN DER SLUIS et al., 2007b). A proposta da utilização do ultrassom durante a etapa de obturação não é nova. Estudos mostraram que o uso do ultrassom para inserção do cimento obturador proporciona uma melhor distribuição do cimento nos canais e nas suas ramificações (HOEN; LABOUNTY; KELLER, 1988), uma melhor qualidade da obturação (WEST; LABOUNTLY; KELLER, 1989) e maior penetração do cimento obturador nos túbulos dentinários (NIKHIL& SINGH, 2013).

Os métodos mais utilizados para avaliação de técnicas obturadoras e materiais obturadores é a microscopia de confocal de varredura à laser e o estereomicroscópio. A microscopia confocal de varredura à laser permite a visualização da interface cimento/canal e penetração do cimento nos túbulos dentinários (GHARIB, S. et al., 2007; ZAPATA et al., 2009). Para possibilitar a visualização do cimento obturador em microscopia confocal a laser foi adicionada a Rodamina B, que é um fluoróforo marcador. O uso da Rodamina B não interfere na presa dos cimentos endodônticos, porém sua adição precisa ser cuidadosa para não dificultar a visualização do cimento na microscopia confocal de varredura a laser, pelo excesso de fluorescência (PIOCH et al., 1996; GHARIB et al., 2007). A proporção utilizada durante o preparo do cimento obturador foi de 0,1% conforme estudos prévios que avaliaram a qualidade da obturação, fendas e penetrabilidade do cimento no interior dos túbulos dentinários (GHARIB et al., 2007; ORDINOLA-ZAPATA et al., 2009b; MARCIANO et al., 2011). No entanto, somente as imagens obtidas pela microscopia confocal não permitem um delineamento preciso do contorno do canal quando os cones de guta-percha estão em contato com as paredes do canal. Por esta razão o estereomicroscópio tem sido utilizado como um método complementar para análise de trabalhos de obturação, permitindo melhor visualização da guta-percha e espaços vazios.

Estudos prévios avaliaram diferentes técnicas obturadoras em canais mesiais de molares inferiores (HORSTED-BINDSLEV et al., 2007; DE-DEUS et al., 2007; ORDINOLA-ZAPATA et al., 2009a). No entanto, a maioria deles não levou em consideração as áreas de istmos. Marciano et al. (2011) são um dos poucos autores que consideraram os istmos para análise da qualidade de obturação proporcionada por diferentes técnicas. Os autores concluíram que a técnica obturadora e a presença de istmos influenciam na presença de espaços vazios.

A metodologia empregada neste estudo para análise das imagens de microscopia confocal de varredura à laser e de estereomicroscópio teve objetivo de avaliar individualmente áreas de canais e dos istmos, sendo possível avaliar a influência da agitação ultrassônica do cimento obturador nestas áreas.

6.1.2 Discussão da metodologia da ação antimicrobiana intra-dentinária

A literatura esta repleta de estudos que avaliaram os efeitos antimicrobianos do cimento AH Plus frente a diversos micro-organismos por meio de testes de difusão em ágar, contato direto (MIYAGAK et al., 2006; NAWAL et al., 2011; HEYDER et al., 2013; WANG; SHEN; FARIA JUNIOR et al., 2013; WANG; SHEN; HAAPASALO, 2014), porém os resultados obtidos com as diferentes metodologias são divergentes.

Apesar de muito utilizados os testes de difusão em ágar apresentam limitações conhecidas, talvez a principal seja que a formação dos halos de inibição depende muito da capacidade de difusão do material testado no ágar, fato este que pode influenciar os resultados (COBANKARA et al., 2004). Atualmente o teste de contato direto é o mais utilizado, pois é um método quantitativo que simula o contato do micro-organismo. Este método permite um melhor controle sobre algumas variáveis em relação ao teste de difusão em ágar, como a difusão do material testado (WEISS et al., 1996; ZHANG et al., 2009).

Neste estudo foi utilizada outra metodologia para a avaliação do efeito antimicrobiano do cimento AH Plus quando agitado ou não com o ultrassom. A metodologia empregada foi a da microscopia confocal de varredura à laser. O uso de tubos de dentina bovina contaminados por *Enterococcus faecalis* foram descritos na literatura (HAAPASALO; ORSTAVIK, 1987; EVANS et al., 2003) para avaliar diferentes substâncias utilizadas no tratamento endodôntico. Até o presente momento não há nenhum estudo avaliando as propriedades antimicrobianas do cimento AH Plus e a influência da sua agitação ultrassônica frente ao *Enterococcus faecalis* utilizando a metodologia empregada neste estudo. Esse micro-organismo foi escolhido para realização desta metodologia pelo fato de possuir alta capacidade de penetrar e colonizar os túbulos dentinários (LOVE, 2001), sendo possível detectar sua viabilidade nesses túbulos empregando uma técnica de imunofluorescência por meio da microscopia confocal de varredura à laser (MCVL) (ZAPATA et al., 2008).

A associação de metodologias de contaminação dentinária com *Enterococcus faecalis* e a verificação de sua viabilidade por MCVL foi proposta por Ma et al. (2011). Os autores recomendaram a realização de ciclos de centrifugação para promover a contaminação dos corpos de prova e a marcação com o corante fluorescente LIVE/DEAD para analisar tridimensionalmente a viabilidade microbiana.

Com essa metodologia os autores obtiveram uma contaminação volumosa e uniformemente distribuída em profundidade nos túbulos dentinários com 21 dias de contaminação e que a MCVL foi efetiva para verificação da viabilidade microbiana.

A metodologia de contaminação utilizada no presente estudo foi a proposta por Andrade et al. (2015), a qual proporciona uma contaminação intratubular homogênea e uniforme, assim como a de Ma et al. (2011), porém, em apenas 4 dias de contaminação, enquanto outras metodologias demandam até 21 dias (MA et al., 2011; WANG; SHEN; HAAPASALO, 2014).

Para a avaliação da viabilidade microbiana foi utilizada a MCVL associada ao corante LIVE/DEAD como proposto por estudos prévios (ZAPATA et al., 2008; SHEN et al., 2009; CHÁVEZ DE PAZ, 2009; CHAVEZ DE PAZ; BERGENHOLTZ; SVENSATER, 2010; MA et al., 2011; WANG; SHEN; HAAPASALO, 2014; DEL-CARPIO PEROCHENA et al., 2015). Assim, por meio do software BioimageL é possível quantificar tridimensionalmente o biovolume microbiano, bem como a porcentagem de bactérias vivas e mortas (CHÁVEZ DE PAZ, 2009), sendo possível avaliar o efeito de determinadas substâncias ou tratamentos sobre os micro-organismos (CHAVEZ DE PAZ; BERGENHOLTZ; SVENSATER, 2010; OWANG; SHEN; HAAPASALO, 2014; DEL-CARPIO PEROCHENA et al., 2015).

Dentes de bovinos foram utilizados devido à semelhança estrutural da sua dentina com a dentina humana. Os canais radiculares foram instrumentados até a lima tipo K número 80 e tratados com EDTA; este procedimento foi adotado para padronizar o volume do canal e facilitar o processo de contaminação, pois de acordo com Haapasalo e Orstavik (1987) a remoção da camada de dentina mais superficial é importante para facilitar o ingresso de micro-organismos nos túbulos dentinários.

O ultrassom tem sido amplamente utilizado na endodontia em diversas etapas do tratamento endodôntico. A literatura apresenta ótimos resultados do seu uso para a agitação da solução irrigadora (VAN DER SLUIS et al., 2007b), da medicação intracanal (DUARTE et al., 2012) e do cimento obturador (GUIMARÃES et al., 2014; NIKHIL; BANSAL; SAWANI, 2015). Seu uso para agitação de cimentos obturadores promove um maior perímetro de penetração e profundidade do mesmo (NIKHIL; BANSAL; SAWANI, 2015). Aparentemente a penetração do cimento no interior dos túbulos dentinários pode favorecer a morte de micro-organismo devido a sua ação antimicrobiana e pelo confinamento de micro-organismo (KOKKAS et al., 2004; MOON et al., 2010). Assim, torna-se interessante avaliar se a agitação ultrassônica do cimento obturador potencializa o efeito antimicrobiano do cimento AH Plus.

6.2 Discussão dos resultados

6.2.1 Discussão dos resultados da obturação

Os resultados encontrados na análise em estereomicroscopia mostraram a presença de espaços vazios em ambos os grupos. Nos canais e nas áreas de istmos houve diferença estatística significativa ($p > 0.05$) na porcentagem de espaços vazios nas secções cervical (6mm), média (4mm) e apical (2mm). A técnica de obturação do cone único vem sendo amplamente utilizada com cones de gutapercha de conicidades semelhantes aos instrumentos empregados na instrumentação rotatória, facilitando a obturação e reduzindo o tempo de trabalho (GORDON; LOVE; CHANDLER, 2005). No entanto, seu emprego em dentes com anatomia interna irregular (istmos, achatamentos, canais ovais) tende a apresentar maior presença de espaços vazios (WEIS; PARASHOS; MESSER, 2004; MARCIANO et al., 2011). No presente estudo constatou-se que o uso do ultrassom para agitação do cimento obturador, proporcionou uma diminuição significativa na presença de vazios tanto nos canais (tabela 1, 2 e 3) como nas áreas de istmos (tabela 4, 5 e 6), sendo que nesta última essa diminuição foi mais significativa. Isto pode ser visto nos valores das medianas do grupo em que o cimento obturador foi agitado com o ultrassom (CUS). Estes valores foram de 0% para todas as secções avaliadas, enquanto que no grupo em que o cimento não foi agitado (SUS) o menor valor foi 0.11% e 5.46% respectivamente para canal e istmos, ambos nas secções apical (2 mm).

O ultrassom promove uma intensa agitação da solução irrigadora, desencadeando um efeito mecânico devido à ação de transmissão acústica (VERHAAGEN et al., 2014; VAN DER SLUIS et al., 2007b) favorecendo uma limpeza mais eficiente principalmente das áreas de complexidades anatômicas (GUTARTS et al., 2005; BURLESON et al., 2007; CARVER et al., 2007). Provavelmente este mesmo fenômeno ocorra durante a agitação do cimento obturador, de modo que áreas dos canais e dos istmos são preenchidas de forma mais homogênea, diminuindo a presença de espaços vazios. A presença desses espaços pode servir como via de infiltração de micro-organismos ou ser invadido pelos mesmos quando presentes nos túbulos dentinários, podendo induzir ou perpetuar a lesão periapical (SIQUEIRA JR, 1999; SIQUEIRA JR, 2001). Von Arx (2005) demonstrou que áreas

de istmos pobremente limpas e obturadas estão intimamente relacionadas com o fracasso do tratamento endodôntico em molares inferiores.

Com relação à porcentagem da área ocupada pelo cimento obturador não houve diferença estatística significativa ($p > 0.05$) nos canais radiculares (tabela 1, 2 e 3). No entanto, nas áreas de istmos houve diferença estatística significativa ($p < 0.05$) nas secções apical (2mm), médio (4mm) e cervical (6mm) (tabela 4,5 e 6). A técnica de obturação com cone único é uma técnica que permite a inserção da quantidade de guta-percha de forma mais padronizada (BAL, HICKS, BARNETT, 2001; GORDON, LOVE, CHANDLER. 2005). Este fato, somado a realização do pareamento anatômico, do volume dos espécimes e a padronização da quantidade de cimento obturador (em peso), pode ter contribuído para a ausência de diferença estatística significativa ($p < 0.05$) da porcentagem da área de cimento obturador nos canais, pois quantidades similares de materiais obturadores foram utilizadas em canais com anatomias semelhantes. Os espécimes de istmos que tiveram o cimento obturador agitado com ultrassom apresentaram maiores porcentagem das áreas de cimento obturador, sendo significativa ($p > 0.05$) quando comparado com o grupo que não foi agitado. Todos os cuidados citados anteriormente como pareamento anatômico, técnica obturadora e volume de cimento inserido garantiu um menor número de variáveis e pode ter tornado os resultados mais confiáveis. Por isso, a diferença no volume de cimento obturador nas áreas de istmos possivelmente ocorreu exclusivamente pelo uso do ultrassom. Jiang et al. (2010) demonstraram que a variação no direcionamento da ponta do ultrassom influencia na limpeza de ranhuras simuladas preenchidas com raspas de dentina, sendo que a maior limpeza destas áreas foi obtida quando a ponta do ultrassom foi direcionada para as ranhuras. Durante a agitação do cimento em nosso estudo o inserto utilizado para agitação foi direcionada no sentido dos istmos, impulsionando o cimento obturador para estas áreas, favorecendo seu preenchimento.

A guta-percha é um material obturador sólido e não tem a capacidade de preencher áreas de irregularidades, istmos e ramificações sem a sua plastificação (WESSELINK, 2005; GURGEL-FILHO et al., 2006). No presente estudo não foi mensurada a área de guta-percha nos istmos, devido à técnica obturadora empregada. Nos canais a mensuração da porcentagem da área de guta-percha entre os grupos mostrou não haver diferença estatística significativa ($p > 0.05$) entre os grupos nas secções cervical (6mm), média (4mm) e apical (2mm). O cálculo da

porcentagem de guta-percha baseia-se na área total do canal; logo, canais de maiores diâmetros pode apresentar menor volume de guta-percha do que outros de menores mesmo com o emprego da técnica do cone único. Constatou-se a ausência de diferença estatística significativa ($p < 0.05$) entre os grupos em todas as seções avaliadas. Provavelmente esse resultado se deve ao fato de que a obturação pela técnica do cone único proporciona a inserção da guta-percha de forma mais padronizada quando comparada à condensação lateral, por exemplo (GORDON; LOVE; CHANDLER, 2005). Além disso, o pareamento anatômico e do volume dos espécimes favoreceram a presença de dentes com anatomias semelhantes, o que pode ter resultado em porcentagens de áreas de guta-percha semelhantes já que para o seu cálculo, o seu valor é dividido pela área total do canal x 100. Assim, espécimes com grande diferença de volume nos canais poderiam interferir nos resultados.

Os resultados das análises em microscopia confocal de varredura à laser mostraram diferença estatística significativa ($p < 0.05$) na porcentagem do perímetro de penetração do cimento obturador nos túbulos dentinários dos canais e dos istmos nas seções cervical (6mm), médio (4mm) e apical (2mm) quando o cimento obturador é agitado com o ultrassom. A penetração intratubular do cimento obturador depende de fatores como presença de smear layer, presença de umidade no canal, número e tamanho dos túbulos dentinários e taxa de escoamento do cimento (De-Deus et al., 2004; ORSTAVIK, 2005). Os resultados do presente estudo mostraram que o uso do ultrassom proporcionou um aumento significativo na penetração do cimento nos túbulos dentinários nos canais e nos istmos em todas as seções avaliadas. A diferença mais significativa da penetração ocorreu nas áreas de istmos, sendo de 76.25% no grupo agitado com ultrassom (CUS) e 0% para o grupo sem agitação (SUS). Os benefícios do uso do ultrassom na agitação da solução irrigadora (VAN DER SLUIS et al., 2007b; PLOTINO et al., 2007) e na medicação intracanal (DUARTE et al., 2012) já estão comprovadas na literatura. Porém o seu uso para a agitação do cimento obturador foi pouco explorado. Estudos prévios mostraram que a agitação ultrassônica do cimento obturador promove maior penetração do mesmo nos túbulos dentinários e menor presença de fendas, porém estes estudos foram realizados em dentes com canal único (GUIMARÃES et al., 2014; NIKHIL, BANSAL, SAWANI, 2015). O aumento de temperatura proporciona um aumento na taxa de escoamento do cimento AH Plus, aumentando sua fluidez

(CAMILERI, 2015). O uso do ultrassom para agitação da solução irrigadora promove um aumento na temperatura da mesma (MACEDO et al., 2014), o que possivelmente pode ter ocorrido com o AH plus, aumentando seu escoamento. Assim, a associação do efeito mecânico produzido pela transmissão acústica do ultrassom e o aumento de temperatura causada por ele pode ter favorecido a maior penetração do cimento obturador nos túbulos dentinários e até mesmo em áreas onde normalmente há dificuldade de um bom preenchimento pelo cimento obturador, como são as áreas de istmos.

A penetração do cimento obturador nos túbulos dentinários parece apresentar um papel importante na prevenção de reinfecção devido à ação antimicrobiana desses materiais e pela ação de confinamento de micro-organismos (KOKKAS et al., 2004; MOON et al., 2010). Assim, o aumento na penetração do cimento gerado pelo uso do ultrassom pode apresentar grande relevância clínica. Nikhil, Bansal, Sawani (2015) mostraram que a ativação ultrassônica do cimento obturador favorece a penetração mais profunda nos túbulos dentinários. Assim, o aumento na penetração e na profundidade do cimento, pode contribuir com um maior selamento dos túbulos dentinários e a ação de confinamento dos micro-organismos alojados mais profundamente nos mesmo. Vera et al., (2012) mostraram que nas áreas de istmos permanecem micro-organismos viáveis nos túbulos dentinários mesmo após o uso do hidróxido de cálcio como medicação intracanal. Logo, o melhor preenchimento dessas áreas e dos túbulos dentinários pode contribuir para o prognóstico do tratamento por se tratar de uma área crítica para ser limpa. Além disso, alguns autores afirmam existir uma correlação entre penetração intratubular do cimento obturador e a retenção mecânica da obturação (WHITE, GOLDMAN, LIN, 1984; MOON et al., 2009), portanto a maior penetração pode contribuir para a maior retenção da mesma.

Com relação à interface de adaptação (fendas) nenhum dos grupos apresentou total adaptação entre cimento e as paredes dentinárias. A agitação ultrassônica do cimento obturador promoveu menor presença de fendas nos canais e nos istmos. Nos canais, houve diferença estatística significativa ($p < 0.05$) apenas no terço cervical (6 mm). Já nas áreas de istmos houve diferença estatística significativa ($p > 0.05$) nas secções média (4 mm) e cervical (6 mm). A presença de fendas, em cimentos à base de componentes resinosos, esta relacionada com a contração volumétrica durante o processo de presa (BERGMANS et al., 2005;

SCHWARTS, 2006;). A técnica de obturação do cone único proporciona maiores áreas de cimento obturador no terço médio e cervical do que no apical (AKMAN et al., 2010; MARCIANO et al., 2011), o que aumenta as chances de surgimento de fendas na interface cimento/dentina, pois maiores volumes de cimento obturador, sofrem maior contração volumétrica durante a presa (SCHWARTS & FRANSMAN, 2005; SCHWARTS, 2006). A agitação ultrassônica do cimento obturador proporcionou uma diminuição das fendas nestas áreas vistas como críticas, o que pode apresentar grande relevância clínica, pois micro-organismo ou fluidos, que sirvam de substrato para os mesmo, podem se infiltrar por estas áreas (SIQUEIRA JR, 2001; DE-DEUS et al., 2011) e gerar uma nova lesão periapical ou sua persistência (SIQUEIRA JR, 2001).

6.2.2 Discussão dos resultados da ação antimicrobiana intra-dentinária

O cimento AH Plus apresenta um bom potencial antimicrobiano frente a diversos micro-organismos dentre eles, o *Enterococcus faecalis*. A maioria dos estudos avaliou o seu potencial antimicrobiano por testes de difusão em ágar e contato direto (MIYAGAK et al., 2006; NAWAL et al., 2011; HEYDER et al., 2013; WANG; SHEN; HAAPASALO, 2014). No entanto, consultando a literatura não há, até o presente momento, estudos avaliando o potencial antimicrobiano intradentinário do cimento AH Plus pela metodologia utilizada.

As análises em microscopia confocal de varredura à laser mostraram que o grupo em que o cimento obturador foi agitado com ultrassom apresentou uma significativa ($p < 0.05$) redução da viabilidade do *Enterococcus faecalis* na dentina superficial quando comparado com o grupo controle e com o grupo em que o cimento não foi agitado. Atualmente o ultrassom vem sendo largamente utilizado para a agitação da solução irrigadora (VAN DER SLUIS et al., 2007b; HARRINSON et al., 2010), medicação intracanal (DUARTE et al., 2012) e até para os cimentos obturadores (GUIMARÃES et al., 2014; NIKHIL; BANSAL; SAWANI, 2015), apresentando resultados relevantes para a prática clínica. A transmissão acústica gerada pelo ultrassom quando ativado é o responsável pela intensa movimentação das soluções irrigadoras (VAN DER SLUIS et al., 2007b). Alguns autores atribuem a este efeito a maior penetração das medicações intracanaís (DUARTE et al., 2012) e dos cimentos obturadores nos túbulos dentinários (GUIMARÃES et al., 2014;

NIKHIL; BANSAL; SAWANI, 2015). Dessa forma, acredita-se que agitação ultrassônica do cimento AH Plus tenha induzido um maior perímetro de penetração intratubular do cimento na porção superficial da dentina quando comparado com o grupo sem agitação, resultando em uma redução significativa ($p < 0.05$) na viabilidade de micro-organismos. A possível explicação para os resultados encontrados no presente estudo pode estar relacionada ao maior contato entre cimento obturador e micro-organismos quando agitado com o ultrassom, já que este possui efeito antimicrobiano comprovado (HEYDER et al., 2013; WANG; SHEN; HAAPASALO, 2014).

Nas porções dentinárias mais profundas os resultados mostraram que houve diferença estatística significativa ($p < 0.05$) na viabilidade de micro-organismos apenas entre o grupo em que o cimento foi agitado com ultrassom e o grupo controle. Não houve diferença estatística significativa ($p > 0.05$) entre o grupo controle e o sem agitação do cimento obturador e este último com o grupo que foi agitado.

Além disso, houve diferença estatística significativa ($p < 0.05$) em relação ao biovolume entre o grupo em que o cimento foi agitado com o ultrassom (CUSP) e os demais grupos (tabela 14). A provável explicação para estes resultados está relacionada ao maior biovolume bacteriano ($p < 0.05$) do grupo CUSP em relação aos demais, consequentemente maior contaminação intratubular. Assim, houve uma menor eficiência na redução da viabilidade bacteriana quando comparado com os resultados da dentina superficial. Acredita-se que a menor viabilidade destes micro-organismos ocorreu pelo fato do ultrassom favorecer um maior contato entre cimento e micro-organismos, aprisionando-os nos túbulos dentinários em profundidade. Siqueira Jr (2001) especulou que o aprisionamento de micro-organismos pelos materiais obturadores pode gerar sua morte devido à falta de substrato para sua sobrevivência, o que explicaria os resultados deste estudo.

O *Enterococcus faecalis* é um dos micro-organismos mais encontrados em casos de fracassos endodônticos e este tem alta capacidade de penetrar profundamente no interior dos túbulos dentinários, sendo difícil sua eliminação pela ação pelos agentes antimicrobianos (HAAPASALO & ORSTAVIK, 1987; SIQUEIRA JR, 2001; SAKAMOTO et al., 2008). O ultrassom vem sendo largamente utilizado na prática clínica com o objetivo de potencializar a ação das substâncias antimicrobianas e de limpeza principalmente nas áreas onde o instrumentos endodônticos não alcançam (GUTARTS et al., 2005; HARRISON et al., 2010)

favorecendo o prognóstico do tratamento. A penetração do cimento obturador nos túbulos dentinários parece apresentar um papel importante na prevenção de reinfecção devido à ação antimicrobiana desses materiais e pela ação de confinamento de micro-organismos (KOKKAS et al., 2004; MOON et al., 2010). Assim, o aumento no perímetro de penetração e na profundidade do cimento obturador gerado pelo uso do ultrassom pode apresentar grande relevância clínica.

Vera et al. (2009) mostraram que micro-organismos permanecem vivos no interior dos túbulos dentinários, mesmo após preparo biomecânico e medicação intracanal. Logo, uma melhor penetração do cimento nos túbulos dentinários pode contribuir para um melhor selamento dos mesmos e o aprisionamento de micro-organismos, cessando vias de nutrição e contribuindo para um melhor prognóstico do tratamento.

7 Conclusões

7 CONCLUSÕES

Baseado nos resultados do presente estudo foi possível concluir que:

- a) Em relação à presença de espaços vazios, a agitação ultrassônica do cimento obturador proporcionou a menor presença de vazios nos canais e nos istmos em todas as secções avaliadas, sendo mais significativa neste último.
- b) Em relação à presença de fendas a agitação ultrassônica do cimento obturador proporcionou a menor presença de fendas nos canais na secção cervical (6 mm) e , nas áreas de istmos, na secção média (4mm) e cervical (6mm).
- c) A porcentagem do perímetro de penetração do cimento obturador aumentou em todos os níveis, nos canais e nos istmos quando foi realizada a agitação ultrassônica do cimento obturador, apresentando um aumento significativo nas áreas de istmos.
- d) O potencial antimicrobiano intradentinário do cimento AH Plus sobre o *Enterococcus faecalis* foi maior na dentina superficial quando a agitação ultrassônica do cimento obturador foi realizada.

Referências

REFERÊNCIAS

- Aguirre AM, el-Deeb ME, Aguirre R. The effect of ultrasonics on sealer distribution and sealing of root canals. *J Endod*. 1997;23(12):759-64.
- Ahmad M, Pitt Ford TR. Comparison of two ultrasonic units in shaping simulated curved canals. *J Endod*. 1989;15(10):457-62.
- Ahmad M. Comparison between two ultrasonic units in shaping curved canals in teeth using macroradiography. *Endod Dent Traumatol*. 1991;7(2):55-8
- Akman M, Akman S, Derinbay O, Belli S. Evaluation of gaps or voids occurring in roots filled with three different sealers. *Eur J Dent*. 2010;4(2):101-9.
- Andrade FB, Arias MPC, Maliza AGA, Duarte MAH, Graeff MSZ, Midena RZ, Amoroso-silva PA, Moraes IG. (in press). A new improved protocol for in vitro intratubular contamination for antimicrobial endodontic tests: standardization and validation by confocal laser scanning microscopy. *J. Appl. Oral Sci.*, 2015.
- Archer R, Reader A, Nist R, Beck M, Meyers WJ. An in vivo evaluation of the efficacy of ultrasound after step-back preparation in mandibular molars. *J Endod* 1992;18: 549 –52.
- Ardila CN, Wu MK, Wesselink PR. Percentage of filled canal area in mandibular molars after conventional root-canal instrumentation and after a noninstrumentation technique (NIT). *Int Endod J*. 2003;36(9):591-8.
- Bal AS, Hicks ML, Barnett F. Comparison of laterally condensed .06 and .02 tapered gutta-percha and sealer in vitro. *J Endod*. 2001;27(12):786-8.
- Baldi JV, Bernardes RA, Duarte MA, Ordinola-Zapata R, Cavenago BC, Moraes JC, de Moraes IG. Variability of physicochemical properties of an epoxy resin sealer taken from different parts of the same tube. *Int Endod J*. 2012;45(10):915-20.
- Bergmans L, Moisiadis P, De Munck J, Van Meerbeek B, Lambrechts P. Effect of polymerization shrinkage on the sealing capacity of resin fillers for endodontic use. *J Adhes Dent* 2005;7(4):321-329.

Bitter K, Paris S, Martus P, Schartner R, Kielbassa AM. A Confocal Laser Scanning Microscope investigation of different dental adhesives bonded to root canal dentine. *Int Endod J*. 2004;37(12):840-8.

Boucher Y, Matossian L, Rilliard F, Machtou P. Radiographic evaluation of the prevalence and technical quality of root canal treatment in a French subpopulation. *Int Endod J*. 2002;35(3):229-38.

Brait AH. Considerações sobre o uso de aparelhos ultra-sônicos em endodontia. *Rev Odonto*. 1992;2(8):242-246.

Branstetter J, von Fraunhofer JA. The physical properties and sealing action of endodontic sealer cements: a review of the literature. *J Endod*. 1982;8(7):312-6.

Burleson A, Nusstein J, Reader A, Beck M. The in vivo evaluation of hand/rotary/ultrasound instrumentation in necrotic, human mandibular molars. *J Endod*. 2007;33(7):782-7.

Cameron JA. The synergistic relationship between ultrasound and sodium hypochlorite: a scanning electron microscope evaluation. *J Endod*. 1987;13(11):541-5

Carr GB, Schwartz RS, Schaudinn C, Gorur A, Costerton JW. Ultrastructural examination of failed molar retreatment with secondary apical periodontitis: an examination of endodontic biofilms in an endodontic retreatment failure. *J Endod*. 2009;35(9):1303-9.

Carver K, Nusstein J, Reader A, Beck M. In vivo antibacterial efficacy of ultrasound after hand and rotary instrumentation in human mandibular molars. *J Endod*. 2007;33(9):1038-43.

Cavenago BC, Duarte MA, Ordinola-Zapata R, Marciano MA, Carpio-Perochena AE, Bramante CM. Interfacial adaptation of an epoxy-resin sealer and a self-etch sealer to root canal dentin using the System B or the single cone technique. *Braz Dent J*. 2012;23(3):205-11.

Chan C, Chao SY. An in vitro study of the antimicrobial effectiveness of ultrasonic instrumentation. *Zhonghua Ya Yi Xue Hui Za Zhi*. 1990;9(2):61-6.

Chávez de Paz LE, Bergenholtz G, Svensäter G. The effects of antimicrobials on endodontic biofilm bacteria. *J Endod*. 2010;36(1):70-7.

Chávez de Paz LE. Image analysis software based on color segmentation for characterization of viability and physiological activity of biofilms. *Appl Environ Microbiol*. 2009;75(6):1734-9.

Cheung GSP, Stock CJR. In-Vitro Cleaning Ability of Root-Canal Irrigants with and without Endosonics. *International Endodontic Journal*. 1993;26(6):334-43.

Cobankara FK, Altinöz HC, Ergani O, Kav K, Belli S. In vitro antibacterial activities of root-canal sealers by using two different methods. *J Endod*. 2004;30(1):57-60.

De Deus G, Martins F, Lima A, Gurgel-Filho E, Maniglia C, Coutinho-Filho T. Analysis of the film thickness of a root canal sealer following three obturation techniques. *Pesq Odontol Bras*. 2003;17(2):119-25.

De Deus GA, Gurgel-Filho ED, Maniglia-Ferreira C, Coutinho-Filho T. The influence of filling technique on depth of tubule penetration by root canal sealer: A study using light microscopy and digital image processing. *Aust Endod J*. 2004;30(1):23–8.

De-Deus G, Maniglia-Ferreira CM, Gurgel-Filho ED, Paciornik S, Machado AC, Coutinho-Filho T. Comparison of the percentage of gutta-percha-filled area obtained by Thermafil and System B. *Aust Endod J*. 2007;33(2):55-61.

De-Deus G, Reis C, Giorgi KD, Brandao MC, Audi C, Fidel RA. Interfacial adaptation of the Epiphany self-adhesive sealer to root dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2011;111(3):381-86.

de Gregorio C, Estevez R, Cisneros R, Heilborn C, Cohenca N. Effect of EDTA, Sonic, and Ultrasonic Activation on the Penetration of Sodium Hypochlorite into Simulated Lateral Canals: An In Vitro Study. *J Endod*. 2009;35(6):891-5.

Del Carpio-Perochena A, Bramante CM, de Andrade FB, Maliza AG, Cavenago BC, Marciano MA, Amoroso-Silva P, Duarte MH. (in press) Antibacterial and dissolution ability of sodium hypochlorite in different pHs on multi-species biofilms. *Clin Oral Investig*. 2015.

Duarte MA, Balan NV, Zeferino MA, Vivan RR, Morais CA, Tanomaru-Filho M, et al. Effect of ultrasonic activation on pH and calcium released by calcium hydroxide pastes in simulated external root resorption. *J Endod*. 2012;38(6):834-7.

Elayouti A, Achleithner C, Löst C, Weiger R. Homogeneity and adaptation of a new gutta-percha paste to root canal walls. *J Endod*. 2005;31(9):687-90.

Endal U, Shen Y, Knut A, Gao Y, Haapasalo M. A high-resolution computed tomographic study of changes in root canal isthmus area by instrumentation and root filling. *J Endod*. 2011;37(2):223-7.

Esberard RM, Leonardo MR, Leal JM, Simões Filho AP, Bonetti Filho I. Ultrassom em Endodontia. *RGO*. 1987;36(4):297- 300.

Evans MD, Baumgartner JC, Khemaleelakul SU, Xia T. Efficacy of calcium hydroxide: chlorhexidine paste as an intracanal medication in bovine dentin. *J Endod*. 2003;29(5):338-9.

Faria-Júnior NB, Tanomaru-Filho M, Berbert FL, Guerreiro-Tanomaru JM. Antibiofilm activity, pH and solubility of endodontic sealers. *Int Endod J*. 2013 ;46(8):755-62.

Farmakis ET, Kontakiotis EG, Tseleni-Kotsovili A, Tsatsas VG. Comparative in vitro antibacterial activity of six root canal sealers against *Enterococcus faecalis* and *Proteus vulgaris*. *J Investig Clin Dent*. 2012;3(4):271-5.

Fornari VJ, Silva-Sousa YT, Vanni JR, Pécora JD, Versiani MA, Sousa-Neto MD. Histological evaluation of the effectiveness of increased apical enlargement for cleaning the apical third of curved canals. *Int Endod J*. 2010;43(11):988-94.

Gharib SR, Tordik PA, Imamura GM, Baginski TA, Goodell GG. A confocal laser scanning microscope investigation of the epiphany obturation system. *J Endod*. 2007;33(8):957-61.

Gordon MPJ, Love RM, Chandler NP. An evaluation of .06 tapered gutta-percha cones for filling of .06 taper prepared curved root canals. *Int Endod J*. 2005;38:87–96.

Gound TG, Sather JP, Kong TS, Makkawy HA, Marx DB. Graduating dental students ability to produce quality root canal fillings using single- or multiple-cone obturation techniques. *J Dent Educ*. 2009;73(6):696-705.

Guimarães BM, Amoroso-Silva PA, Alcalde MP, Marciano MA, de Andrade FB, Duarte MA. Influence of ultrasonic activation of 4 root canal sealers on the filling quality. *J Endod*. 2014;40(7):964-8.

Gurgel-Filho ED, Feitosa JP, Gomes BP, Ferraz CC, Souza-Filho FJ, Teixeira FB. Assessment of different gutta-percha brands during the filling of simulated lateral canals. *Int Endod J*. 2006;39(2):113-8.

Gutarts R, Nusstein J, Reader A, Beck M. In vivo debridement efficacy of ultrasonic irrigation following hand-rotary instrumentation in human mandibular molars. *J Endod*. 2005;31(5):166-70.

Haapasalo M, Orstavik D. In vitro infection and disinfection of dentinal tubules. *J Dent Res*. 1987;66(8):1375-9.

Haapasalo M, Shen Y, Wang Z, Gao Y. Irrigation in endodontics. *Br Dent J*. 2014;216(6):299-303.

Haragushiku GA, Sousa-Neto MD, Silva-Sousa YTC, Alfredo E, Silva SC, Silva RG. Adhesion of Endodontic Sealers to Human Root Dentine Submitted to Different Surface Treatments. *Photomedicine and laser surgery* 2010;28(3):405-10.

Harrison AJ, Chivatxaranukul P, Parashos P, Messer HH. The effect of ultrasonically activated irrigation on reduction of *Enterococcus faecalis* in experimentally infected root canals. *Int Endod J*. 2010;43(11):968-77.

Heyder M, Kranz S, Völpel A, Pfister W, Watts DC, Jandt KD, Sigusch BW. Antibacterial effect of different root canal sealers on three bacterial species. *Dent Mater*. 2013;29(5):542-9.

Hoen MM, LaBounty GL, Keller DL. Ultrasonic endodontic sealer placement. *J Endod*. 1988;14(4):169-74.

Horsted-Bindslev P, Andersen M, Jensen M, Nilson J, Wenzel A. Quality of molars fillings performed with lateral compaction and the single-cone technique. *J Endod*. 2007;33(4):468-71.

Hsu YY, Kim S. The resected root surface. The issue of canal isthmus. *Dent Clin North Am*. 1997;41:529-540.

Jarrett IS, Marx D, Covey D, Karmazin M, Lavin M, Gound T. Percentage of canals filled in apical cross sections - an in vitro study of seven obturation techniques. *Int Endod J*. 2004;37(6):392-8.

Jiang LM, Verhaagen B, Versluis M, van der Sluis LW. Influence of the oscillation direction of an ultrasonic file on the cleaning efficacy of passive ultrasonic irrigation. *J Endod*. 2010;36(8):1372-6.

Jin Y, Zhang T, Samaranayake YH, Fang HH, Yip HK, Samaranayake LP. The use of new probes and stains for improved assessment of cell viability and extracellular polymeric substances in *Candida albicans* biofilms. *Mycopathol*. 2005;159(3):353-60.

Kokkas AB, Boutsoukis ACh, Vassiliadis LP, Stavrianos CK. The influence of the smear layer on dentinal tubule penetration depth by three different root canal sealers: an in vitro study. *J Endod*. 2004;30(2):100-2.

Lee SJ, Wu MK, Wesselink PR. The efficacy of ultrasonic irrigation to remove artificially placed dentine debris from different-sized simulated plastic root canals. *Int Endod J*. 2004;37(9):607-12.

Leonardo MR, Silva LA, Almeida WA, Utrilla LS. Tissue response to an epoxy resin-based root canal sealer. *Endod Dent Traumatol*. 1999;15(1):28-32.

Love RM. *Enterococcus faecalis*--a mechanism for its role in endodontic failure. *Int Endod J*. 2001;34(5):399-405.

Ma J, Wang Z, Shen Y, Haapasalo M. A new noninvasive model to study the effectiveness of dentin disinfection by using confocal laser scanning microscopy. *J Endod*. 2011;37(10):1380-5.

Macedo RG, Verhaagen B, Wesselink PR, Versluis M, van der Sluis LW. Influence of refreshment/activation cycles and temperature rise on the reaction rate of sodium hypochlorite with bovine dentine during ultrasonic activated irrigation. *Int Endod J*. 2014;47(2):147-54.

Mahammadi Z, Mombeinipour A, Giardino L, Shahriari S. Residual antibacterial activity of a new modified sodium hypochlorite-based endodontic irrigation solution. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2011 ;16(4):588-92.

Marciano MA, Ordinola-Zapata R, Cunha TV, Duarte MA, Cavenago BC, Garcia RB, Bramante CM, Bernardineli N, Moraes IG. Analysis of four gutta-percha techniques used to fill mesial root canals of mandibular molars. *Int Endod J*. 2011;44(4):321-9.

Miyagak DC, de Carvalho EM, Robazza CR, Chavasco JK, Levorato GL. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of endodontic sealers. *Braz Oral Res*. 2006;20(4):303-6.

Mohammadi Z. Sodium hypochlorite in endodontics: an update review. *Int Dent J*. 2008;58(6):329-41.

Moon YM, Shon WJ, Baek SH, Bae KS, Kum KY, Lee W. Effect of final irrigation regimen on sealer penetration in curved root canals. *J Endod*. 2010 ;36(4):732-6.

Mutoh N, Satoh T, Watabe H, Tani-Ishii N. Evaluation of the biocompatibility of resin-based root canal sealers in rat periapical tissue. *Dent Mater J*. 2013;32(3):413-9.

Nawal RR, Parande M, Sehgal R, Naik A, Rao NR. A comparative evaluation of antimicrobial efficacy and flow properties for Epiphany, Guttaflow and AH-Plus sealer. *Int Endod J*. 2011;44(4):307-13.

Nikhil V, Singh R. Confocal laser scanning microscopic investigation of ultrasonic, sonic, and rotary sealer placement techniques. *J Conserv Dent*. 2013 Jul;16(4):294-9.

Nikhil V, Bansal P, Sawani S. Effect of technique of sealer agitation on percentage and depth of MTA Fillapex sealer penetration: A comparative in-vitro study. 2015;18(2):119-23.

Ordinola-Zapata R, Bramante CM, Bernardineli N, Graeff MS, Garcia RB, de Moraes IG, Debelian G. A preliminary study of the percentage of sealer penetration in roots obturated with the Thermafil and RealSeal-1 obturation techniques in mesial root canals of mandibular molars. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009a;108(6):961-8.

Ordinola-Zapata R, Bramante CM, Graeff MS, del Carpio Perochena A, Vivan RR, Camargo EJ, et al. Depth and percentage openetration of endodontic sealers into dentinal tubules after root canal obturation using a lateral compaction technique: a confocal laser scanning microscopy study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009b;108(3):450-7.

Ørstavik D. Materials used for root canal obturation: Technical, biological and clinical testing. *Endod Topics*. 2005;12:25–38.

Özcan E, Eldeniz AU, Arı H. Bacterial killing by several root filling materials and methods in an ex vivo infected root canal model. *Int Endod J*. 2011;44(12):1102-9.

Paqué F, Laib A, Gautschi H, Zehnder M. Hard-tissue debris accumulation analysis by high-resolution computed tomography scans. *J Endod*. 2009;35(7):1044-7.

Peters OA, Laib A, Göhring TN, Barbakow F. Changes in root canal geometry after preparation assessed by high-resolution computed tomography. *J Endod*. 2001;27(1):1-6.

Peters OA, Laib A, Rügsegger P, Barbakow F. Three-dimensional analysis of root canal geometry by high-resolution computed tomography. *J Dent Res*. 2000;79(6):1405-9.

Pioch T. Novel fisiáveis for visualazing the contact zone between dentin and resin by application of the leica CLSM. *Leica scientific and technical information*.1996;(11):80-3.

Plotino G, Grande NM, Pecci R, Bedini R, Pameijer CH, Somma F. Three-dimensional imaging using microcomputed tomography for studying tooth macromorphology. *J Am Dent Assoc*. 2006;137(11):1555-61.

Plotino G, Pameijer CH, Grande NM, Somma F. Ultrasonics in endodontics: a review of the literature. *J Endod*. 2007;33(2):81-95.

Prestegard H, Portenier I, Orstavik D, Kayaoglu G, Haapasalo M, Endal U. Antibacterial activity of various root canal sealers and root-end filling materials in dentin blocks infected ex vivo with *Enterococcus faecalis*. *Acta odont Scand*.2014;72(8):970-976.

Rahimi M, Jainaen A, Parashos P, Messer HH. Bonding of resin-based sealers to root dentin. *J Endod*. 2009;35(1):121-4.

Sakamoto M, Siqueira JF Jr, Rôças IN, Benno Y. Molecular analysis of the root canal microbiota associated with endodontic treatment failures. *Oral Microbiol Immunol*. 2008;23(4):275-81.

Schilder H. Filling root canal in three dimensions.1967. *J Endod*. 2006;32(4):281-90.

Schwartz RS, Fransman R. Adhesive dentistry and endodontics: materials, clinical strategies and procedures for restoration of access cavities: a review. *J Endod*. 2005;31(3):151-65.

Segura-Egea JJ, Jiménez-Pinzón A, Poyato-Ferrera M, Velasco-Ortega E, Ríos-Santos JV. Periapical status and quality of root fillings and coronal restorations in an adult Spanish population. *Int Endod J*. 2004;37(8):525-30.

Shen Y, Qian W, Chung C, Olsen I, Haapasalo M. Evaluation of the effect of two chlorhexidine preparations on biofilm bacteria in vitro: a three-dimensional quantitative analysis. *J Endod*. 2009;35(7):981-5.

Siqueira FJ Jr, Fraga RC, Garcia PF. Evaluation of sealing ability, pH and flow rate of three calcium hydroxide-based sealers. *Endod Dent Traumatol*. 1995;11(5):225-8.

Siqueira JF Jr, Rôças IN, Lopes HP, de Uzeda M. Coronal leakage of two root canal sealers containing calcium hydroxide after exposure to human saliva. *J Endod*. 1999;25(1):14-6.

Siqueira JF Jr. A etiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. *Int Endod J*. 2001;34(1):1-10.

Siqueira JF Jr, Rôças IN, Alves FR, Campos LC. Periradicular status related to the quality of coronal restorations and root canal fillings in a Brazilian population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2005;100(3):369-74

Sjögren U, Figdor D, Persson S, Sundqvist G. Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Int Endod J*. 1997;30(5):297-306.

Slutzky-Goldberg I, Slutzky H, Solomonov M, Moshonov J, Weiss EI, Matalon S. Antibacterial properties of four endodontic sealers. *J Endod*. 2008;34(6):735-8.

Swain MV, Xue J. State of the art of Micro-CT applications in dental research. *Int J Oral Sci*. 2009;1(4):177-88.

Tang MP, Stock CJ. The effect of hand, sonic and ultrasonic instrumentation on the shape of curved root canals. *Int Endod J*. 1989;22(2):55-63.

van der Sluis LW, Shemesh H, Wu MK, Wesselink PR. An evaluation of the influence of passive ultrasonic irrigation on the seal of root canal fillings. *Int Endod J*. 2007a;40(5):356-61.

van der Sluis LW, Versluis M, Wu MK, Wesselink PR. Passive ultrasonic irrigation of the root canal: a review of the literature. *Int Endod J*. 2007b;40(6):415-26.

van der Sluis LW, Wu MK, Wesselink PR. The efficacy of ultrasonic irrigation to remove artificially placed dentine debris from human root canals prepared using instruments of varying taper. *Int Endod J*. 2005;38(10):764-8.

Vera J, Siqueira JF Jr, Ricucci D, Loghin S, Fernández N, Flores B, Cruz AG. One- versus two-visit endodontic treatment of teeth with apical periodontitis: a histobacteriologic study. *J Endod*. 2012;38(8):1040-52.

Verhaagen B, Boutsoukis C, van der Sluis LW, Versluis M. Acoustic streaming induced by an ultrasonically oscillating endodontic file. *J Acoust Soc Am*. 2014;135(4):1717-30.

Versiani MA, Carvalho-Junior JR, Padilha MI, Lacey S, Pascon EA, Sousa-Neto MD. A comparative study of physicochemical properties of AH Plus and Epiphany root canal sealants *Int Endod J*. 2006;39(6):464-71.

Versiani MA, De-Deus G, Vera J, Souza E, Steire L, Pécora JD, Sousa-Neto MD. 3D mapping of the irrigated areas of root canal space using micro-computed tomography. *Clin oral Investig*. 2015;19(4):859-66

Vertucci FJ. Root canal anatomy of the human permanent teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1984;58(5):589-99.

Von Arx T. Frequency and type of canal isthmuses in first molars detected by endoscopic inspection during periradicular surgery. *Int Endod J*. 2005;38(3):160-8.

Wang Z, Shen Y, Haapasalo M. Dentin extends the antibacterial effect of endodontic sealers against *Enterococcus faecalis* biofilms. *J Endod*. 2014 ;40(4):505-8.

Wang Z, Shen Y, Haapasalo M. Effectiveness of endodontic disinfecting solutions against young and old *Enterococcus faecalis* biofilms in dentin canals. *J Endod*. 2012;38(10):1376-9.

Weis MV, Parashos P, Messer HH. Effect of obturation technique on sealer thickness and dentinal tubule penetration. *Int Endod J*. 2004;37(10):653-63.

Weiss EI, Shalhav M, Fuss Z. Assessment of antibacterial activity of endodontic sealers by a direct contact test. *Endod Dent Traumatol*. 1996;12(4):179-84.

Wesselink PR. The filling of the root canal system. *Ned Tijdschr Tandheelkd*. 2005;112(12):471-7.

West LA, LaBounty GL, Keller DL. Obturation quality utilizing ultrasonic cleaning and sealer placement followed by lateral condensation with gutta-percha. *J Endod*. 1989;15(11):507-11.

White RR, Goldman M, Lin PS. The influence of the smeared layer upon dentinal tubule penetration by plastic filling materials. *J Endod*. 1984;10(12):558-62.

Wiemann AH, Wilcox LR. In vitro evaluation of four methods of sealer placement. J Endod. 1991 Sep;17(9):444-7.

Zapata RO, Bramante CM, de Moraes IG, Bernardineli N, Gasparoto TH, Graeff MS, Campanelli AP, Garcia RB. Confocal laser scanning microscopy is appropriate to detect viability of *Enterococcus faecalis* in infected dentin. J Endod. 2008;34(10):1198-201.

Zhang H, Shen Y, Ruse ND, Haapasalo M. Antibacterial activity of endodontic sealers by modified direct contact test against *Enterococcus faecalis*. J Endod. 2009 ;35(7):1051-5.

Anexos

ANEXO A – Parecer comitê de ética e pesquisa

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU-
USP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Influência da agitação ultrassônica do cimento obturador na ação antimicrobiana intra-dentinária e no preenchimento de istmos em canais mesiais de molares inferiores

Pesquisador: Murilo Priori Alcalde

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 34804514.8.0000.5417

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo - Faculdade de Odontologia de Bauru

Patrocinador Principal: FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 788.274

Data da Relatoria: 10/09/2014

Apresentação do Projeto:

Projeto de pesquisa laboratorial intitulado: "Influência da agitação ultrassônica do cimento obturador na ação antimicrobiana intra-dentinária e no preenchimento de istmos em canais mesiais de molares inferiores" de autoria do aluno de mestrado Murilo Priori Alcalde sob orientação do prof. Dr. Clóvis Monteiro Bramante. Para este estudo serão utilizados 30 primeiros molares inferiores humanos extraídos por indicação terapêutica, com ápices completamente desenvolvidos, com curvaturas nas raízes mesiais inferiores a 30 graus e que não tenham sido tratados endodônticamente. Os dentes serão divididos e a o processo de preparo do canal radicular será realizado utilizando a associação de 2 sistema mecanizados. O que se busca observar é a presença ou não do istmo com o cimento obturador.

Objetivo da Pesquisa:

O presente estudo tem por objetivo avaliar, utilizando-se raízes de dentes prototipados a penetrabilidade e qualidade da obturação, em istmos, e em bloco de dentina de dentes bovinos a ação antimicrobiana intra-dentinária do cimento endodôntico (AH Plus) proporcionada pela técnica de obturação cone único quando submetido ou não a agitação ultrassônica no momento da obturação.

Endereço: DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9
Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA **CEP:** 17.012-901
UF: SP **Município:** BAURU

Telefone: (14)3235-8356

Fax: (14)3235-8356

E-mail: cep@fob.usp.br

ANEXO A – Parecer comitê de ética e pesquisa

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU-
USP

Continuação do Parecer: 788.274

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: O único possível risco deste trabalho é que nossa proposta não possua a eficácia esperada.

Benefícios: Caso este trabalho atinja seu objetivo e os resultados encontrados vão de acordo com a proposta do projeto, haverá uma maior qualidade na obturação dos dentes com complexidades anatômicas, favorecendo selamento e potencial antimicrobiano.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa cientificamente relevante.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os documentos necessários foram apresentados.

Recomendações:

Sugiro alteração na hipótese que se nula deve conter uma negativa o que não inviabiliza a aprovação da pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sugestão quanto a hipótese, porém com aprovação do projeto.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Esse projeto foi considerado APROVADO na reunião extraordinária do CEP de 10.9.2014, com base nas normas éticas da Resolução CNS 466/12. Ao término da pesquisa o CEP-FOB/USP exige a apresentação de relatório final. Os relatórios parciais deverão estar de acordo com o cronograma e/ou parecer emitido pelo CEP. Alterações na metodologia, título, inclusão ou exclusão de autores, cronograma e quaisquer outras mudanças que sejam significativas deverão ser previamente comunicadas a este CEP sob risco de não aprovação do relatório final. Quando da apresentação deste, deverão ser incluídos todos os TCLEs e/ou termos de doação assinados e rubricados, se pertinentes.

Endereço: DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9
Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA CEP: 17.012-901
UF: SP Município: BAURU
Telefone: (14)3235-8356 Fax: (14)3235-8356 E-mail: cep@fob.usp.br

ANEXO A – Parecer comitê de ética e pesquisa

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU-
USP

Continuação do Parecer: 788.274

BAURU, 11 de Setembro de 2014

Assinado por:
Flaviana Bombarda de Andrade
(Coordenador)

Endereço: DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9
Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA CEP: 17.012-901
UF: SP Município: BAURU
Telefone: (14)3235-8356 Fax: (14)3235-8356 E-mail: cep@fob.usp.br