



TRÍCIA PIRES DE FARIAS PAIVA

**INFLUÊNCIA DO CIMENTO OBTURADOR NO TEMPO DE
CONTAMINAÇÃO MICROBIANA DE CANAIS RADICULARES
OBTURADOS E EXPOSTOS AO MEIO BUCAL – ESTUDO *IN VITRO***

**Recife
2005**

TRÍCIA PIRES DE FARIAS PAIVA

**INFLUÊNCIA DO CIMENTO OBTURADOR NO TEMPO DE
CONTAMINAÇÃO MICROBIANA DE CANAIS RADICULARES
OBTURADOS E EXPOSTOS AO MEIO BUCAL-ESTUDO *IN VITRO***

Dissertação apresentada à Coordenação do Curso de Mestrado em Odontologia, com área de concentração em Clínica Integrada, Departamento de Prótese e Cirurgia Buco-Facial, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Menezes Aguiar.

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Célia Maria Machado Barbosa de Castro.

**Recife
2005**

Paiva, Trícia Pires de Farias

Influência do cimento obturador no tempo de contaminação microbiana de canais radiculares obturados e expostos ao meio bucal – estudo *in vitro*
/ Trícia Pires de Farias Paiva. – Recife : O Autor, 2005.
81 folhas : il., fig., tab., gráf.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Odontologia, 2005.

Inclui bibliografia e anexo.

1. Odontologia – Endodontia - Microbiologia. 2. Canal radicular obturado – Cimentos obturadores – Infiltração bacteriana e fúngica pós-obturação. 3. Tempo do experimento (120 dias) – Resina epóxica (AH-PlusTM) – Selamento superior ao hidróxido de cálcio (Sealer 26[®]). I. Título.

**616.314.163
617.6342**

**CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)**

**UFPE
BC2005-338**

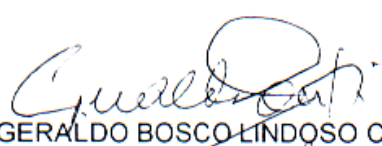
TRÍCIA PIRES DE FARIAS PAIVA

**INFLUÊNCIA DO CIMENTO OBTURADOR NO TEMPO DE
CONTAMINAÇÃO MICROBIANA DE CANAIS RADICULARES
OBTURADOS E EXPOSTOS AO MEIO BUCAL -ESTUDO *IN VITRO***

Dissertação apresentada à Coordenação do Curso de Mestrado em Odontologia, com área de concentração em Clínica Integrada, Departamento de Prótese e Cirurgia Buco-Facial, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Odontologia.

Aprovado em 23 de março de 2005

Banca Examinadora


Prof. Dr. GERALDO BOSCO LINDOSO COUTO - UFPE

Presidente


Profa. Dra. ROSANA MARIA COELHO TRAVASSOS - FOP/UPE

1º Examinador


Profa. Dra. JUREMA FREIRE LISBOA DE CASTRO - UFPE

2º Examinador

Confere com o original
Em 06/06/2005
Ozicleire Sena de Araújo
Secretária do Programa de Pós
Graduação em Odontologia
SIAPE - 11333995

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Socorro e Sizé, os melhores exemplos de perseverança e amor que eu poderia ter tido. A Cristiano, pelo respeito genuíno ao meu estudo, aceitando com amor minha ausência.

AGRADECIMENTOS

Ao Magnífico Reitor da Universidade Federal de Pernambuco Prof. Dr. Amaro Henrique Pessoa Lins; ao Prof. Dr. José Thadeu Pinheiro Diretor do Centro de Ciências da Saúde da UFPE; a Prof^a. Dr^a. Lúcia Carneiro de Souza Beatrice chefe do Departamento de Prótese e Cirurgia Buco-Facial; ao Prof. Dr. Geraldo Bosco Lindoso Couto coordenador da Pós-Graduação em Odontologia da UFPE, pela oportunidade a mim concedida para realizar o Curso de Mestrado em Odontologia.

Ao Prof. Dr. Edir Carneiro Leão, ex-coordenador da Pós-graduação de Odontologia da UFPE, pela confiança e apoio.

A todos os que fazem parte do Gabinete Odontológico do Corpo de Bombeiros Militar de Pernambuco, que tornaram possível a realização deste trabalho em especial ao Cel. Ricardo Alves de Santana, autorizando o meu ingresso no Mestrado em Clínica Integrada.

Ao meu orientador Prof. Dr. Carlos Menezes Aguiar pelos ensinamentos, incentivo e laboriosa ajuda na execução desta dissertação.

À minha co-orientadora Prof^a. Dr^a. Célia Maria M. B. de Castro Chefe do Departamento de Microbiologia do Laboratório de Imunopatologia Keiso Asami-LIKA e à Maria de Fátima Diniz biomédica do LIKA pela paciência e dedicação.

Aos colegas de turma em especial à Maria Cristina de O. A. Marques, pela amizade incentivo, sem a qual eu não teria conseguido.

À Prof^a. Dr^a. Jurema Freire Lisboa Chefe do Departamento de Patologia Oral
da Universidade Federal de Pernambuco pelas fotomicrografias das lâminas.

RESUMO

O propósito deste estudo *in vitro* foi avaliar a capacidade de selamento de canais radiculares obturados pela técnica da condensação lateral ativa da gutta-percha associada aos cimentos endodônticos Sealer 26[®] e AH-PlusTM e sua influência no tempo de contaminação bacteriana e fúngica em canais radiculares expostos ao meio bucal. Foram utilizados quarenta pré-molares inferiores com 21mm de comprimento em processo de rizogênese completo. Os espécimes foram divididos aleatoriamente em dois grupos de quinze dentes cada, de acordo com o cimento utilizado, além dos grupos controles com cinco espécimes cada: controle positivo o qual não foi realizada a obturação endodôntica e controle negativo onde não foram feitas aberturas coronárias. Os canais radiculares foram biomecanizados conforme a técnica coroa-ápice sem pressão e em seguida foram montados em aparatos, esterilizados a óxido de etileno e expostos à saliva artificial na qual foram adicionados o *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *C. albicans* que serviram como marcadores biológicos de infiltração. A avaliação foi conduzida até 120 dias, onde foi observada a contaminação de 33,3% dos espécimes obturados com Sealer 26[®] e 6,7% dos canais obturados com AH-PlusTM. Concluiu-se que o cimento à base de resina epóxica (AH-PlusTM) ofereceu um selamento superior quando comparado ao cimento à base de hidróxido de cálcio (Sealer26[®]) no intervalo de tempo observado ($p < 0,05$).

PALAVRAS-CHAVE – Infiltração, microrganismos, cimentos endodônticos.

ABSTRACT

ABSTRACT

The purpose of this *in vitro* study was to evaluate the sealing capacity of root canals obturated by lateral condensation of gutta-percha using the endodontic sealers Sealer 26[®] and AH-Plus[™], and their influence on the bacterial and fungal recontamination time of endodontically treated teeth once exposed to the saliva. Forty inferior pre-molars with 21mm of length and complete formation of the apex had been used. The teeth were randomly divided into 2 groups based on the sealer used, with fifteen specimens each beyond the groups controls with five specimens each: positive control which was not carried through the endodontically obturation, negative control where had been made coronary openings. Root canals were instrumented in agreement the technique crown-apex without pressure and after that the specimens had been mounted in apparatus sterilized by oxide of ethylene gas and then exposed to an artificial saliva in which had been added the *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* and *C. albicans* that they had served as biological marking of infiltration. The evaluation was lead up to 120 days, where it was observed contamination of 33,3% of the specimens obturated with Sealer 26 group and 6,7% of the root canals obturated with AH-Plus[™]. The study concluded that epoxy resin root canal sealer provides superior resistance to microbial leakage than the hydroxide sealer in the interval of the observed time ($p < 0,05$).

KEY WORDS – Leakage, microorganisms, root canal sealer.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Prancha 1 – Composição do cimento endodôntico AH-Plus™	49
Prancha 2 – Composição do cimento endodôntico Sealer 26®	49
Figura 1- Sistema de Avaliação da Infiltração	50
Figura 2- Porção apical da raiz em contato com o meio	52
Figura 3- Espécime da esquerda apresenta turbidez do BHI após contaminação	54
Figura 4- Meios de cultura Ágar-Sangue (esquerda) e Sabourad mostrando o crescimento bacteriano e fúngico de alíquotas obtidas após a turbidez do meio	54
Figura 5- Fotomicrografia de cocos gram-positivos em cadeias (<i>E. faecalis</i>) e em cachos (<i>S. aureus</i>) com aumento de 10X/0,25	55
Figura 6- Fotomicrografia de cocos gram-positivos (<i>E. faecalis</i> / <i>S. aureus</i>) e bacilos gram-negativos (<i>P. aeruginosa</i>) com aumento de 10X/0,25	55
Figura 7- Fotomicrografia de cocos gram-positivos e bacilos gram-negativos com aumento de 10X/0,25	56
Figura 8- Fotomicrografia de cocos gram-positivos (<i>E. faecalis</i>) com aumento de 40X/0,65	56
Figura 9- Fotomicrografia de cocos gram-positivos, bacilos gram-negativos e levedura (<i>C. albicans</i>) com aumento de 10X/0,25	57
Figura 10- Fotomicrografia de cocos gram-positivos, bacilos gram-negativos e levedura (<i>C. albicans</i>) com aumento de 40X/0,65	57
Gráfico 1 – Curvas de Kaplan-Meier para o tempo de contaminação das amostras	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Relação entre os cimentos, tempo de contaminação e microrganismos que infiltraram	61
Tabela 2 – Estimativa da probabilidade de permanecer livre de contaminação pelo método Kaplan-Meier (evento: contaminação por bactéria) após 120 dias	62
Tabela 3 – Resultados da avaliação da infiltração microbiana após 60 dias de avaliação	63
Tabela 4 – Resultados da avaliação da infiltração microbiana após 120 dias de avaliação	65

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

% = Por cento

: = para (proporção)

+ = mais

± = mais ou menos

° = grau

°C = grau celcius

A. = *Actinomyces*

BHI = Brain Heart Infusion (Infusão cérebro coração)

CCS = Centro de Ciências da Saúde

C. = *Candida*

CDTA = Ácido ciclohexano diamino tetracético

DNA = Ácido desoxirribonucléico

D. pneumocintes = *Dialister pneumocintes*

E. = *Enterococcus*

EDTA = Ácido etileno diamino tetracético

EGTA = Ácido etileno glicol bis (b-amino etilenoéter) tetracético

F. alocis = *Fusobacterium alocis*

HL = haste longa

h = hora

ISO = International Standardization for Organization

LIKA = Laboratório de Imunopatologia Keiso Asami

mm = milímetro

min = minuto

NaOCl = Hipoclorito de Sódio

PCR = Reação em Cadeia da Polimerase

P. aeruginosa = *Pseudomonas aeruginosa*

P. alactolyticus = *Pseudoramibacter alactolyticus*

P. propionicum = *Propionibacterium propionicum*

pH = Potencial hidrogeniônico

s = segundo

S. aureus = *Staphylococcus aureus*

UFC = Unidade Formadora de Colônia

UFPE = Universidade Federal de Pernambuco

vol/vol = volume por volume

X = vezes

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
2 REVISÃO DA LITERATURA	25
2.1 Importância das bactérias na infecção endodôntica	26
2.2 Influência fúngica das infecções endodônticas	31
2.3 Atividade Antimicrobiana dos cimentos obturadores	34
2.4 Infiltração microbiana em dentes tratados endodonticamente	37
2.5 Propriedades físico-químicas: solubilidade, desintegração, selamento do AH-Plus™ e Sealer 26®	40
3 PROPOSIÇÃO	44
4 METODOLOGIA	46
4.1 Considerações Éticas	47
4.2 Seleção da amostra	47
4.3 Preparo dos espécimes	47
4.4 Divisão dos grupos experimentais	48
4.5 Preparo do Sistema experimental	50
4.6 Teste de infiltração	51
4.7 Microrganismos indicadores	52
4.8 Preparo da Saliva	53
4.9 Destino do Material Biológico	58
4.10 Análise Estatística	58
5 RESULTADOS	60
6 DISCUSSÃO	65

1 INTRODUÇÃO

Um dos requisitos básicos para o êxito do tratamento endodôntico consiste no controle da infecção nos sistemas de canais radiculares. Para tanto, assume papel primordial a manutenção da cadeia asséptica durante todos os passos operatórios. Após o término da obturação, constitui importância fundamental a realização de um adequado selamento coronário visando minimizar os índices de percolação das bactérias e dos seus subprodutos, e conseqüentemente, a recontaminação endodôntica.

Ressalta-se a relevância da limpeza e modelagem deste sistema, removendo o material orgânico, além da utilização de um adequado selamento por meio de materiais obturadores que associem biocompatibilidade com propriedades bactericidas e físico-químicas satisfatórias. Existe, atualmente, uma imensa gama de cimentos obturadores endodônticos que são divididos de acordo com a sua composição química em: cimentos à base de óxido de zinco e eugenol, cimentos à base de hidróxido de cálcio, cimentos à base de resina epóxica e cimentos à base de ionômero de vidro (SALEH et al., 2002).

Apesar dos fatores químicos e físicos poderem induzir inflamações perirradiculares, os agentes microbianos são essenciais para progressão e perpetuação destas doenças constituindo a principal fonte de irritação persistente dos tecidos periapicais. Denominou-se infecção primária àquela causada por microrganismos que colonizam o tecido necrótico pulpar, em geral são mistas e predominantemente compostas por bactérias anaeróbicas. As espécies mais freqüentemente encontradas são usualmente do gênero *Bacterioides*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Treponema*, *Peptostreptococcus*, *Eubacterium* e *Campylobacter*; também são comumente

encontradas *Streptococcus microaerófilos* e facultativos. A Infecção secundária do canal radicular caracteriza-se pela presença de microrganismos que não estão presentes na Infecção Primária e penetraram no sistema de canais radiculares durante o tratamento, entre sessões, ou após a conclusão da terapia endodôntica (SIQUEIRA JÚNIOR, 2002).

A contaminação do canal radicular pode ocorrer durante e após a restauração dos dentes tratados endodonticamente. Obturações endodônticas seguidas por vedamentos coronários insatisfatórios ou ausentes, permitem a penetração de bactérias e endotoxinas no sistema de canais radiculares e iniciam, ou perpetuam, uma inflamação periapical. Segundo os autores, os elementos dentários que perderam suas restaurações provisórias ou definitivas por mais de dois meses necessitam de retratamento endodôntico (ILANA et al., 2002)

Pelo exposto, observaram-se as dificuldades existentes na prevenção da recontaminação do sistema de canais radiculares via coroa dentária, sobretudo considerando a inexistência de um cimento endodôntico selador ideal, bem como, os elevados índices de dentes tratados endodonticamente e expostos à contaminação da flora microbiana salivar. Foram estas observações que despertaram o interesse em abordar um tema tão relevante à classe odontológica, esperando, contribuir para aumentar as taxas de êxito da terapia endodôntica e reduzir o número de retratamentos desnecessários.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 IMPORTÂNCIA DAS BACTÉRIAS NA INFECÇÃO ENDODÔNTICA

Siren et al. (1997) enfatizaram a importância no controle asséptico durante o tratamento dos canais radiculares. Os autores correlacionaram os achados bacteriológicos com os procedimentos clínicos. A maior predominância de *Enterococcus faecalis* foi constatada em canais em que não houve selamento coronário em alguma etapa do tratamento endodôntico. As bactérias entéricas também foram mais frequentes nos casos com maior número de atendimentos clínicos e nos retratamentos.

Dahlén et al. (2000) identificaram espécies de *Enterococcus faecalis* em infecções endodônticas que receberam curativos à base de hidróxido de cálcio. Um teste de susceptibilidade *in vitro* demonstrou que o *Enterococcus faecalis* foi resistente a benzilpenicilina, ampicilina, clindamicina, metronidazol e tetraciclina, porém foi sensível a eritromicina e vancomicina. Devido à baixa sensibilidade aos agentes antimicrobianos, o *Enterococcus faecalis* pode ser isolado em canais radiculares submetidos a tratamentos endodônticos convencionais, contribuindo de forma significativa para os insucessos da terapia endodôntica.

Love (2001) estudou o mecanismo pelo qual o *Enterococcus faecalis* pode sobreviver e crescer dentro dos túbulos dentinários, reinfectando um canal obturado. Os fatores de virulência desta espécie bacteriana em dentes tratados endodonticamente são considerados responsáveis pelo fracasso da terapia empregada e podem estar relacionados com a capacidade do *E. faecalis* em invadir os túbulos dentinários e aderir ao colágeno na presença do soro humano.

Hancock et al. (2001), objetivando determinar a composição da flora

microbiana presente nos dentes com insucessos endodônticos, observaram que a microbiota, nestes casos, é composta predominantemente de uma ou duas linhagens de microrganismos gram-positivos, sendo o *Enterococcus faecalis* a espécie mais comumente encontrada.

Cheung, Ho (2001) investigando a microflora de dentes tratados endodonticamente portadores de lesões periapicais assintomáticas encontraram uma variedade de até seis gêneros bacterianos, sendo os cocos gram-positivos facultativos o grupo de maior prevalência. Salientaram, ainda, a presença dos anaeróbios facultativos em todos os espécimes estudados, ao passo que bactérias anaeróbias restritas foram infreqüentes. O tamanho da rarefação óssea periapical não apresentou correlação com a quantidade de microrganismos encontrados. Os autores concluíram que os *Staphylococcus coagulase-negativo*, *Streptococcus* e *Pseudomonas aeruginosa* constituíram as linhagens isoladas com mais freqüência neste grupo de pacientes.

Sunde et al. (2002) demonstraram, em seu estudo, uma variedade de microrganismos especialmente gram-positivos, nas lesões periapicais de dentes com periodontite apical refratária. As linhagens anaeróbias constituíram 51% dos casos; 79,5% da flora foram espécies gram-positivas. Microrganismos facultativos dos gêneros *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Pseudomonas*, *Candida*, *Enterobacter*, *Stenotrophomonas*, *Sphingomonas* e *Bacillus* foram evidenciados em 75% da amostragem. Grânulos sulfurosos contendo *Actinomyces israelii*, *A. viscosus*, *A. naeslundii*, *A. meyeri* foram identificados em 25% dos casos.

Pinheiro et al. (2003a) obtiveram amostras para um exame microbiológico, a partir dos restos de materiais obturadores coletados durante o retratamento endodôntico. As características clínicas foram associadas com os achados bacterianos. Baseados nos dados obtidos, os pesquisadores deduziram que a

composição da flora microbiana de canais com insucessos na terapêutica aplicada foi limitada a um pequeno número de espécies gram-positivas. Anaeróbios facultativos, especialmente *Enterococcus faecalis*, foram os microrganismos mais comumente encontrados; contudo, infecções polimicrobianas e anaeróbios obrigatórios foram freqüentes em canais obturados de dentes sintomáticos.

Estudo realizado por Pinheiro et al. (2003b) avaliou os microrganismos isolados em dentes com falhas na terapia endodôntica e sua susceptibilidade a antibióticos. Foram isoladas em 30 canais radiculares obturados e com lesões periapicais persistentes um total de 55 espécies bacterianas; 80% foram gram-positivos e 58% anaeróbios facultativos. Os gêneros bacterianos mais freqüentes foram o *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Peptostreptococcus* e *Actinomyces*., sendo o *E. faecalis* a espécie mais prevalente.

Chávez de Paz et al. (2003) isolaram um total de 248 linhagens bacterianas de 107 dentes portadores de tratamento endodôntico e que apresentavam crescimento bacteriano. Houve predominância de gram-positivos (85%), *Lactobacillus ssp* (22%), *Streptococcus não mutans* (18%), *Enterococcus ssp* (12%) e presença esporádica de anaeróbios gram-negativos. A colonização bacteriana foi correlacionada positivamente com o tamanho de lesões radiográficas persistentes, dor e uso de medicação intracanal com hidróxido de cálcio. Os autores concluíram que o grupo de *Streptococcus não mutans*, *Enterococcus* e *Lactobacillus* freqüentemente sobrevivem à terapia endodôntica antimicrobiana.

Radcliffe et al. (2004) determinaram a resistência dos microrganismos associados a lesões endodônticas refratárias, para tanto, utilizaram o hipoclorito de sódio como solução irrigadora. O *E. faecalis* apresentou os seguintes resultados: usando 0,5% de NaOCl por 30 min reduziu a UFC a 0; equivalendo a 10min para 1%; 5 min para 2,5% e 2 min para 5,25%. A associação do *E. faecalis* com infecções

endodônticas refratárias pode ser justificada parcialmente pela grande resistência das espécies às soluções à base de hipoclorito de sódio.

Sedgley, Lennan, Clewell (2004) investigaram o fenótipo, genótipo e a prevalência do *Enterococcus* oral. Este microrganismo foi detectado na saliva de 11% dos pacientes que realizaram tratamento endodôntico e 1% dos estudantes de odontologia com histórico de tratamento endodôntico. Os *Enterococcus* isolados foram identificados como *Enterococcus faecalis*. A produção de hemolisina e gelatinase, e a resposta aos ferormônios determinaram o potencial de virulência. Todas as espécies foram susceptíveis à ampicilina, benzilpenicilina, gentamicina e vancomicina; uma linhagem bacteriana produziu hemolisina, gelatinase, bacteriocina e foi resistente a vários antibióticos. Os autores observaram um polimorfismo genético do *E. faecalis* oral.

De acordo com Kayaoglu, Orstavik (2004) o *Enterococcus faecalis* é um microrganismo que pode sobreviver a alterações ambientais. Esta patogenicidade varia de doenças com ameaça de morte para condições menos severas, tais como infecções em canais radiculares obturados e com periodontite apical crônica. Os autores concluíram que os fatores de virulência do *E. faecalis* podem estar relacionados com a infecção endodôntica e a resposta inflamatória periapical. Alguns produtos bacterianos podem ser diretamente associados aos danos dos tecidos periapicais, ficando a maior parte desta destruição tecidual provavelmente mediada pela resposta do hospedeiro às bactérias e seus sub-produtos.

Moller et al. (2004) averiguaram o desenvolvimento da periodontite apical e a resposta bacteriana ao tratamento endodôntico. A periodontite apical foi registrada em mais de 96% dos casos; contudo, o preparo biomecânico reduziu significativamente a linhagem bacteriana. As bactérias anaeróbicas facultativas foram mais resistentes ao tratamento do que as anaeróbicas.

Gomes et al. (2004a) investigaram a microbiota de canais radiculares infectados primária e secundariamente e a associação das espécies com sinais e sintomas endodônticos. Das espécies isoladas, 70% foram anaeróbicos estritos ou microaerófilos. Os anaeróbicos mais isolados foram: *Peptostreptococcus micros* (35%), *Fusobacterium necrophorum* (23,3%), *Fusobacterium nucleatum* (11,7%), *Prevotella intermedia/nigrescens* (16,7%), *Porphyromonas gingivalis* (6,7%) e *Porphyromonas endodontalis* (5%). A microflora de canais radiculares não tratados com periodontite apical compreendeu microrganismos gram-positivos e gram-negativos sendo a maioria anaeróbios e contendo mais de 3 espécies por canal. Anaeróbios facultativos e bactérias Gram-positivas foram predominantes em dentes com canais obturados e com falhas no tratamento, contendo 1 ou 2 espécies por canal. O *Enterococcus faecalis* foi associado aos casos com tratamento endodôntico prévio. A interação entre espécies produziu características clínicas não encontradas nas espécies isoladas. A microbiota das infecções primárias diferiu em número e espécies das infecções secundárias.

Paisano et al. (2004) observaram o crescimento bacteriano em dentina humana infectada pelo *E. faecalis* em canais radiculares contaminados por esta bactéria durante o período testado (120 dias), sendo observada a grande capacidade do *Enterococcus faecalis* em penetrar em dentes não selados e expostos à saliva, resultando em insucessos no tratamento endodôntico.

Rôças, Siqueira Júnior, Santos (2004) estudaram a associação do *Enterococcus faecalis* com as diferentes formas de doenças periapicais. Embora esta bactéria seja ocasionalmente relacionada com as infecções primárias, é mais freqüentemente encontrada em lesões refratárias ao tratamento endodôntico. Os autores concluíram que o *E. faecalis* está mais associado aos casos assintomáticos, sobretudo nas infecções endodônticas secundárias.

Através da PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), Siqueira Júnior, Rôças (2004a) verificaram que os microrganismos ocorrem em todos os casos de canais obturados associados a lesões periapicais. O *Enterococcus faecalis* foi a espécie mais prevalente, seguida de quatro outras espécies anaeróbicas: *P. alactolyticus*, *P. propionicum*, *D. pneumosintes* e *F. alocis*. Todas as espécies analisadas apresentaram pelo menos uma das bactérias gram-positivas dos tipos *E. faecalis*, *P. alactolyticus* ou *P. propionicum*.

Adib et al. (2004) cultivaram a flora microbiana de canais radiculares com periapicopatias persistentes e infiltração coronária após o tratamento endodôntico. A amostra consistiu de dentes com canais radiculares obturados e recentemente extraídos. Os microrganismos predominantes foram os anaeróbios gram-positivos facultativos (75%), dentre os quais o *Staphylococcus* (19%) seguido do *Streptococcus* (17%) e *Enterococcus* (8%) foram os mais prevalentes.

2.2 INFLUÊNCIA FÚNGICA NAS INFECÇÕES ENDODÔNTICAS

A ocorrência de pelo menos 967 espécies microbiológicas em canais radiculares com lesões endodônticas persistentes foi estudada por Waltimo et al. (1997). A *Candida albicans* foi a mais comum das espécies fúngicas, sendo, também isoladas, a *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. inconspícua*, e *geotrichum*. Os autores concluíram que a presença regular de leveduras indicam que estas podem exercer um importante papel nos casos de periodontite apical persistente após o tratamento endodôntico convencional.

Waltimo et al. (2000) verificaram que o tempo necessário para ocorrer a penetração da *Candida albicans* nos túbulos dentinários apresentou grande variação, enquanto que o *Enterococcus faecalis* penetrou no intervalo de 1 a 5 dias.

Os autores observaram que a penetração dentinária da *Candida albicans* foi menor e limitada em comparação ao *Enterococcus faecalis*.

Segundo Waltimo et al. (2001) a causa da infecção endodôntica por *Candida albicans* não foi totalmente elucidada.; contudo, o uso de medicação intra-canal poderia modificar o equilíbrio ecológico favorecendo a proliferação de fungos e promovendo a imunossupressão de outros microrganismos; além disso, as raízes infectadas poderiam servir como um reservatório de leveduras, ficando estas inacessíveis às defesas do hospedeiro e aos agentes antifúngicos. Este ambiente único dos canais radiculares poderia contribuir para o crescimento de genótipos e fenótipos específicos da *C. albicans*, entretanto, observando amostras deste fungo em infecções endodônticas na população filandesa, os autores concluíram que esta heterogeneidade de fenótipos e genótipos era semelhante a outras infecções de origem oral ou não e em diferentes regiões geográficas.

Os microrganismos são agentes etiológicos das maiorias das periapicopatias e pulpopatias. Com o propósito de analisar o conteúdo dos canais radiculares infectados e secreções aspiradas de abscessos e celulites de origem endodônticas, Baumgartner, Watts, Xia (2000) utilizaram a PCR para detecção da *Candida albicans*. O fungo estava presente em 21% das amostras dos canais radiculares, porém nenhum foi detectado na aspiração periapical. O PCR mostrou-se um método molecular extremamente sensível para identificação de *Candida albicans* em infecções endodônticas.

Lana et al. (2001) observaram que as leveduras mais constantes em polpas necrosadas foram as *Candidas* e *Sacchoromyces*. Mesmo após instrumentação destes canais e utilização de curativo de demora à base de hidróxido de cálcio, alguns microrganismos anaeróbios e fungos puderam ser identificados, demonstrando a resistência fúngica a esta medicação intracanal.

Investigando a colonização fúngica da dentina radicular, Siqueira Júnior et al. (2002) inocularam, em secções radiculares bovinas, cinco espécies de fungos (*Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida guilliermondii*, *Candida parapsilosis* e *Saccharomyces cerevisiae*). Os autores observaram que a *Candida albicans* apresentou diferentes padrões de infecção dentinária. Em algumas espécies, a colonização foi leve, sem penetração nos túbulos dentinários; em outras, algumas áreas dos canais radiculares foram profundamente infectados. No entanto, foi concluído que a *C. albicans* é a espécie fúngica mais encontrada em infecções endodônticas.

Radcliffe et al. (2004) testaram a resistência do *Actinomyces naeslundii* e da *Candida albicans* frente às soluções à base de hipoclorito de sódio nas mais diversas concentrações (0,5%, 1,0%, 2,5% e 5,25%). Foi observado que todas as concentrações desta solução diminuíram as unidades formadoras de colônias após 10 segundos para ambos os fungos.

Segundo Siqueira Júnior, Sen (2004b) os fungos constituem microrganismos eucarióticos e têm um importante papel nas infecções endodônticas e doenças periapicais. São ocasionalmente encontrados na infecção primária dos canais radiculares, porém eles ocorrem mais freqüentemente em dentes obturados com lesões refratárias ao tratamento. A *Candida albicans* constitui a espécie fúngica mais prevalente sendo considerada um microrganismo dentinofílico; também tem sido resistente a algumas medicações intracanaís como àquelas à base de hidróxido de cálcio. A habilidade em invadir os túbulos dentinários e a resistência à maioria dos curativos de demora pode elucidar o fato da *Candida albicans* estar associada a lesões endodônticas persistentes.

2.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS CIMENTOS OBTURADORES

A atividade antimicrobiana dos cimentos obturadores pode auxiliar na neutralização do remanescente bacteriano dos canais radiculares e minimizar a percolação de bactérias e seus produtos, favorecendo a manutenção da cadeia asséptica.

Kaplan et al. (1999) determinaram o efeito antimicrobiano dos cimentos endodônticos ApexitTM, EndionTM, AH-26TM, AH-PlusTM, ProcosolTM e Ketac-EndoTM nos períodos de 2, 20 e 40 dias frente aos microrganismos *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* e *Actinomyces israelii*. Os cimentos ApexitTM, EndionTM e AH-PlusTM exibiram halos de inibição maiores sobre o *Streptococcus mutans* em 20 dias e sobre o *Actinomyces israelii* durante todo intervalo de tempo. Não apresentaram efeito sobre a *Candida albicans* e o *Staphylococcus aureus*. O Ketac-EndoTM apenas produziu efeito antimicrobiano sobre o *Actinomyces israelii*. O AH-26TM apresentou efeito antimicrobiano após 40 dias sobre a *Candida albicans*, entre 20 e 40 dias sobre o *Streptococcus mutans* e o *Staphylococcus aureus* e inibição efetiva do *Actinomyces israelii* durante todo intervalo de tempo. Os cimentos estudados exibiram diferentes efeitos inibitórios em intervalos de tempo distintos. Acima de tudo, os cimentos contendo óxido de zinco e eugenol e formaldeído mostraram-se mais efetivos sobre os microrganismos durante o período avaliado.

Leonardo et al. (2000) avaliaram a ação antimicrobiana dos cimentos endodônticos AH-PlusTM, SealapexTM, Ketac EndoTM e Fill Canal[®] sobre as bactérias *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* e uma linhagem

de *Streptococcus mutans* isolada da saliva humana. Todas as linhagens bacterianas foram inibidas pelos materiais testados.

Segundo Siqueira Júnior et al. (2000) os cimentos endodônticos que possuem ótimas propriedades de escoamento e antimicrobianas podem auxiliar na eliminação de microrganismos localizados em áreas confinadas do sistema de canais radiculares. Analisando os cimentos Kerr Pulp Canal EWTTM, Grossman'sTM, ThermaSealTM, Sealer26[®], AH-PlusTM e Sealer PlusTM, os autores concluíram que eles apresentam potencial efeito no controle microbiano do sistema de canais radiculares.

De acordo com Mickel, Nguyen, Chogle (2003) o *Enterococcus faecalis* tem mostrado um alto poder de virulência nas infecções do sistema de canais radiculares podendo ser um importante fator nas falhas endodônticas. Os autores avaliaram a atividade antimicrobiana dos cimentos endodônticos Roth 811TM, AH-PlusTM, SealapexTM e Kerr EWTTM sobre o *Enterococcus faecalis*. O Roth 811TM apresentou maior zona de inibição, seguido pelo SealapexTM e Kerr EWTTM, enquanto que o AH-PlusTM não apresentou atividade antimicrobiana.

Cobankara et al. (2004) utilizaram o *Enterococcus faecalis* como microrganismo para avaliar a atividade antimicrobiana dos cimentos endodônticos RoekoSealTM, Ketac-EndoTM, AH-PlusTM, SealapexTM e SultanTM, através dos testes de difusão e de contato. Os cimentos Ketac-EndoTM, SultanTM e AH-PlusTM apresentaram resultados semelhantes no teste de contato direto e foram mais eficazes na inibição do crescimento bacteriano do que o SealapexTM e RoekosealTM. De acordo com o teste Agar difusão, o RoekoSealTM não apresentou atividade antibacteriana, e não houve diferenças entre o SealapexTM, AH-PlusTM e SultanTM. O Ketac-EndoTM apresentou melhores propriedades antibacterianas do que todos cimentos. Os autores concluíram que a técnica, tempo e constituintes dos materiais

testados podem afetar os estudos microbiológicos.

Saleh et al. (2004) investigaram a atividade antimicrobiana dos cimentos endodônticos AH-Plus™, Cimento de Grossman, Ketac-Endo™, Apexit™, RoekoSeal Automix™, RoekoSeal Automix™ com um primer experimental e do hidróxido de cálcio sobre os túbulos dentinários infectados com *Enterococcus faecalis* por três semanas. Posteriormente, foram divididos em 8 grupos de acordo com o cimento obturador utilizado. Os autores concluíram que o preenchimento *in vitro* com gutta-percha e AH-Plus™ ou Cimento de Grossman é efetivo na destruição do *Enterococcus faecalis* dos túbulos dentinários. Os outros cimentos, assim como o hidróxido de cálcio, foram menos efetivos.

Gomes et al. (2004b) analisaram as propriedades antimicrobianas, através dos testes de contato direto e difusão em Ágar, dos cimentos endodônticos Endo-Fill®, Endomethasone™, Endomethasone N™, Sealer 26® e AH-Plus™, em diferentes períodos: imediatamente após a manipulação, após 24 horas, 48 horas e 7 dias, contra os microrganismos: *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus sanguis* e *Actinomyces naeslundii*. Os resultados demonstraram que imediatamente após a manipulação o Endo-Fill® e o Endomethasone™ apresentaram maior atividade antimicrobiana, sem diferenças estatísticas entre eles; nos outros tempos de manipulação, não houve diferenças estatisticamente significantes entre os cimentos testados. Os autores chegaram a conclusão de que nenhum dos cimentos inibiu completamente o crescimento dos microrganismos. A atividade antimicrobiana de cada cimento diminuiu com o tempo e dependeu da susceptibilidade microbiana entre eles.

2.4 INFILTRAÇÃO MICROBIANA EM DENTES TRATADOS ENDODONTICAMENTE

Numerosos estudos têm demonstrado infiltração a nível coronário significativa através de corantes e bactérias em canais radiculares obturados e expostos à saliva natural e artificial. Khayat, Lee, Torabinejad (1993), compararam as técnicas de condensação lateral e vertical e concluíram não haver diferenças significativas entre as duas técnicas de obturação. Após exposição à saliva humana, todos os canais obturados foram contaminados em menos de trinta dias.

Alves, Walton, Drake (1998), afirmam a importância da realização de uma restauração coronária logo após a conclusão da obturação dos canais radiculares. Os autores averiguaram a penetração de bactéria e suas endotoxinas em dentes preparados para pinos intra-radicares. Os resultados demonstraram que a infiltração de endotoxinas é mais rápida que a penetração bacteriana. Os referidos pesquisadores especularam que a rápida infiltração de endotoxinas, componentes das bactérias gram-negativas e potentes agentes inflamatórios, poderia resultar em reação periapical e subsequente necessidade de retratamento e/ou cirurgia parendodôntica.

Barthel et al. (1999) compararam os testes de corantes e bactérias como marcadores da infiltração em canais radiculares obturados. Os autores concluíram que o tamanho molecular e o curto tempo de exposição para os corantes constituem parâmetros inadequados para mensurar a infiltração microbiana.

Siqueira Júnior et al. (1999), analisando a infiltração coronária da saliva humana dentro de canais radiculares obturados pela condensação lateral da gutta-percha usando dois cimentos endodônticos à base de hidróxido de cálcio (Sealapex® e Sealer 26®), observaram, após sessenta dias, um índice de infiltração

bacteriana significativamente menor no grupo correspondente ao Sealer 26[®].

Siqueira Júnior et al. (2001b) avaliaram a habilidade quanto à prevenção de penetração bacteriana em três materiais – um cimento endodôntico resinoso preparado em uma consistência mais espessa (Sealer 26[®]), um cimento à base de óxido de zinco e eugenol reforçado com zinco (IRM[®]), e um cimento ionomérico (Fuji IX[®]). Os dentes foram retrobturados e após 60 dias observou-se infiltração em todos os dentes obturados com Fuji IX[®]; em 95% do grupo no qual o IRM[®] foi utilizado e em 65% dos espécimes pertencentes ao Sealer 26[®]. Não houve diferenças estatisticamente relevantes entre Fuji IX[®] e IRM[®], contudo o Sealer 26[®] foi o material selador mais efetivo.

Um estudo comparando o AH-Plus[™], Apexit[™] e Ketac-Endo[™] foi executado por Timpawat, Amornchat, Triswan (2001). Os autores utilizaram a bactéria *Enterococcus faecalis* como marcador microbiológico de infiltração coroa-ápice. Os dentes foram observados por trinta e sessenta dias. Não houve diferenças significativas entre o Ketac-Endo[™] e o AH-Plus[™], contudo o Apexit[™] teve uma infiltração expressivamente superior após trinta dias. No período de sessenta dias, não foram observadas diferenças estatísticas entre o Ketac-Endo[™] e o Apexit[™], no entanto, o Apexit[™] infiltrou mais que o AH-Plus[™]. Os pesquisadores concluíram uma superioridade da resina epóxica relacionada à adaptação nas paredes dos canais quando comparados aos cimentos à base de hidróxido de cálcio.

Miletic et al. (2002a), num estudo comparativo quanto à eficácia seladora de cinco cimentos endodônticos (AH-26[™], AH-Plus[™], Apexit[™], Diaket[™] e Ketac-Endo[™]), destacaram o seguinte resultado: o Apexit[™] obteve uma infiltração expressivamente maior que o AH-Plus[™] e o Ketac-Endo[™], ao passo que o AH-26[™] e o Diaket[™] não demonstraram diferenças entre o Apexit[™], o AH-Plus[™] e o Ketac-Endo[™].

Miletic et al. (2002b) realizaram outro experimento objetivando avaliar a penetração da *Candida albicans* isolada ou combinada com bactérias em canais radiculares obturados com gutta-percha associados aos cimentos AH-26TM ou AH-PlusTM. Os autores observaram infiltração de bactérias em 45% das amostras com o AH-26TM e 60% de infiltração fúngica; ao passo que o AH-PlusTM apresentou infiltração bacteriana em 50% dos casos e infiltração fúngica em 55%. A infiltração ocorreu em um período de 14 a 87 dias. Os autores concluíram que a *Candida Albicans* tem a mesma habilidade de penetração em canais obturados do que as bactérias, sendo importante o estabelecimento de possíveis implicações clínicas de uma infecção fúngica.

Analizando a contaminação bacteriana (*Peptostreptococcus micros* e *Prevotella intermedia*) na saliva artificial de dentes tratados endodonticamente utilizando diferentes técnicas de obturação e cimentos, Brito, Grimaudo, Vertucci (2003) observaram, por um período de 60 dias, que nem a técnica da condensação lateral da gutta-percha, nem a Técnica do MicroSeal associadas a cinco cimentos diferentes (Sealer Roth's801TM, AH-26TM, Thermaseal plusTM, SealapexTM e Ketac-EndoTM) impediram a infiltração dos microorganismos. No entanto, a combinação do Ketac-EndoTM com a Técnica do Microseal apresentou resistência superior quanto à solubilidade e migração bacteriana.

Barbosa et al. (2003) observaram *in vivo* a influência da infiltração coronária nos tecidos periapicais de cães após a obturação dos canais e preparação para pinos intra-radiculares. Os espécimes foram obturados pela condensação lateral com cones de gutta-percha e os cimentos Sealer 26[®] e RothTM. Após o preparo para pino, o remanescente da obturação foi protegido ou não com um cimento temporário LumiconTM. Após exposição ao meio oral, por um período de 90 dias, os animais foram sacrificados e os espécimes preparados para análise histomorfológica.

Os pesquisadores observaram infiltração microbiana em 70% dos casos onde foi usado o cimento Roth™ sem o Lumicon™ e em 20 % , com o Sealer 26®. Com o uso do Lumicon™, houve 30% de infiltração com o cimento Roth™, ao passo que o Sealer 26® não apresentou contaminação.

Kopper et al. (2003) compararam a capacidade seladora dos cimentos endodônticos AH-Plus™, Sealer 26® e Endofill®. Após o preparo biomecânico e obturação dos canais radiculares, estes foram desobturados até o terço apical da raiz e expostos à cavidade oral por 45 dias. Os espécimes foram impregnados com nanquim e analisados por um estereomicroscópio com magnitude de 20X. Nenhum dos cimentos foi capaz de impedir a penetração do corante, entretanto, o AH-Plus™ foi mais efetivo que os demais, seguidos pelo o Endofill® e o Sealer 26®.

2.5 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS: SOLUBILIDADE, DESINTEGRAÇÃO, SELAMENTO DO AH-PLUS™ E SEALER 26®

De Almeida et al. (2000) avaliaram a habilidade de selamento apical dos cimentos endodônticos Fill-Canal®, Ketac-Endo™ e AH-Plus™ através da penetração de corantes. Os resultados demonstraram infiltrações semelhantes entre o Fill Canal® e Ketac-Endo™. A infiltração do AH-Plus™ foi significativamente menor que os demais materiais.

Considerando a infiltração apical uma das principais falhas do tratamento endodôntico, Siqueira Júnior, Rôças, Valois (2001b) compararam os cimentos endodônticos Kerr Pulp Canal Sealer EWT™, Grossman's Sealer™, Thermaseal™, Sealer 26® e AH-Plus™, através da combinação infiltração de corante e diafanização. O AH-Plus™ apresentou menor infiltração do que os outros cimentos testados, ficando o Sealer 26® como o segundo melhor cimento para este requisito.

O efeito do pré-tratamento dentinário pode alterar a adesão dos cimentos endodônticos. Saleh et al. (2002) estudaram o cimento de Grossman, ApexitTM, Ketac EndoTM, Roeko Seal AutomixTM, Roeko Seal AutomixTM com primer experimental e AH-PlusTM. As superfícies dentinárias foram condicionadas com ácido fosfórico a 37% por 30s, ácido cítrico a 25% por 30s, EDTA a 17% por 5min ou um controle feito com água destilada. O pré-tratamento com EDTA não produziu efeitos ou promoveram adesões mais fracas do que o grupo controle; o ácido fosfórico e o cítrico aumentaram a adesão do cimento de Grossman; o primer associado ao Roeko sealTM acentuou a adesão em dentina não tratada; as falhas do AH-PlusTM e ApexitTM foram essencialmente coesivas. Os pesquisadores concluíram que a remoção do smear-layer pode alterar a adesão dentinária e que diferentes cimentos requerem diferentes pré-tratamentos dentinários para otimizar a adesão.

Deus et al. (2002) avaliaram a capacidade de penetração de diferentes cimentos endodônticos (Endo Fill[®], SealapexTM, AH-PlusTM e Pulp Canal SealerTM). Os grupos foram divididos em 4 de acordo com o cimento utilizado e subdivididos em função do uso ou não do EDTA a 17% antes da obturação dos canais. O Pulp Canal SealerTM apresentou a maior capacidade de penetração nos túbulos, ficando os piores resultados para o grupo em que se utilizou o SealapexTM. A penetração dentinária não foi considerada significativa em nenhuma das amostras em que o EDTA não foi utilizado o que reforça a validade da remoção da lama dentinária. O AH-PlusTM apresentou valores estatisticamente semelhantes ao Endo-Fill[®] e superiores ao SealapexTM.

Averiguando a infiltração apical dos cimentos endodônticos AH-PlusTM, RoekosealTM, Ketac EndoTM e SultanTM, Cobankara et al. (2002) observaram que todos os espécimes apresentaram menor índice de infiltração após 21 dias. O SultanTM demonstrou maior infiltração, ficando os melhores resultados para o

Roekoseal™.

Sousa-Neto et al. (2002) estudaram o efeito das soluções quelantes EDTA (ácido etileno diamino tetracético), EGTA (ácido etilenoglicol bis (b-amino etilenoéter) teracético), CDTA (ácido ciclohexano-1,2-diamino tetracético) na adesividade dentinária e infiltração apical quando utilizado o Sealer 26®, Sealapex™, N-Rickert™ e Endofill®. O Sealer 26® apresentou os melhores resultados para a adesividade e microinfiltração, embora não tenha havido correlação para os testes de adesividade e microinfiltração.

McMichen et al. (2003) estudaram as propriedades físicas de solubilidade dos cimentos endodônticos Roth 801™, Tubliseal EWT™, AH-Plus™, Apexit™ e Endion™. A solubilidade foi medida através da mudança de peso dos espécimes standardizados na água após período de 3 meses. O AH-Plus™ foi o menos solúvel.

Estudando a solubilidade dos cimentos endodônticos Sealapex™, Apexit™, AH-26™, AH-Plus™, Diaket™, Ketac-Endo™, Aptal-Harz™ e Roeko Seal™ na água e saliva artificial com diferentes valores de pH, Schafer, Zandbiglari (2003) observaram que a maioria dos cimentos obteve baixa solubilidade, entretanto o Sealapex™, Aptal-Harz™ e Ketac-Endo™ apresentaram marcada perda de peso em todos os líquidos. Após 28 dias de estocagem, o AH-Plus™, AH26™, Diaket™ e RSA Roeko Seal™ demonstraram uma perda de peso inferior a 3%. O AH-Plus™ apresentou a menor taxa de solubilidade dentre os cimentos testados.

Kardon et al. (2004) estudaram a capacidade de selamento de canais radiculares obturados com o EndoRez™ (cimento baseado em resina uretano-metacrilato) associado a um cone único de gutta-percha, o AH-Plus™ e cone único de gutta-percha e o AH-Plus™ com compactação vertical aquecida da gutta-percha.

Os grupos onde foram utilizados o cimento AH-Plus™ apresentaram as menores taxas de infiltração e não houve diferenças estatisticamente significantes entre eles.

De Moor, De Bruyne (2004) avaliaram a capacidade seladora em raízes obturadas com o AH-Plus™ e AH-26™ em conjunto com três técnicas de obturação. Os pesquisadores não encontraram diferenças estatísticas na infiltração apical usando ambos os cimentos. O AH-Plus™ e AH-26™ quando usados com a mesma técnica de obturação apresentaram habilidades seladoras semelhantes no período avaliado (1 dia a 6 meses).

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* a capacidade de selamento dos cimentos endodônticos Sealer 26[®] e AH-Plus[™] e sua influência no tempo de contaminação bacteriana e fúngica em dentes tratados endodonticamente e expostos ao meio bucal.

4 METODOLOGIA

4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, sob o protocolo nº190/2003-CEP/CCS (Anexo), sendo os espécimes adquiridos do Banco de Dentes da Pós-Graduação em Odontologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

4.2 SELEÇÃO DA AMOSTRA

Quarenta pré-molares inferiores humanos com o processo de rizogênese completo, foram radiografados no sentido vestibulo-lingual e mésio-distal para se padronizar a anatomia interna dos espécimes. Para participar do estudo os elementos dentários deveriam apresentar um único canal radicular e comprimento total coroa-ápice de 21mm, com o objetivo de se padronizar distâncias semelhantes de infiltração bacteriana.

4.3 PREPARO DOS ESPÉCIMES

Foram realizadas aberturas coronárias com auxílio de brocas esféricas diamantadas 1014 HL (KG Sorensen-Brasil). Em seguida, foi introduzida uma lima tipo K10# para a determinação do comprimento real de trabalho (CRT), sendo ela transpassada em 1mm além do forame apical, para em seguida ser recuada em 2mm com a finalidade de se padronizar o CRT em 1mm aquém do ápice. Por

consequente, os espécimes foram biomecanizados, utilizando-se limas FlexoFile (Maillefer-Swiss), conforme técnica coroa-ápice sem pressão e a solução irrigadora utilizada foi o NaOCl 1% (Farmácia Roval-Recife). Para se padronizar o forame apical uma lima tipo K 15# foi trabalhada em todo o comprimento real do dente. O terço cervical foi preparado com as brocas de Gattes-Glidden nº1 e nº2, e o terço apical foi preparado até a lima K 30# (memória).

Os espécimes foram acondicionados em tubos de ensaio individualizados e levados para esterilização em autoclave por 15min a 121°C (VULLO, WACHSMAN, ALLCHE, 2000). Posteriormente, um espécime escolhido aleatoriamente, foi transferido para o meio de cultura Brain Heart Infusion (BHI, Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) e incubado por 24 h a 37°C, com o objetivo de se avaliar a esterilidade dos espécimes.

Para acondicionamento, até a fase seguinte do processo, os espécimes foram armazenados em solução salina sob refrigeração até o momento do uso.

4.4 DIVISÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

Após o preparo biomecânico dos canais radiculares, os espécimes foram divididos aleatoriamente em quatro grupos a saber:

Grupo I – quinze espécimes que tiveram os canais radiculares obturados pela técnica da condensação lateral ativa com gutta-percha e cimento à base de resina plástica (AH-Plus™, Dentsply, Konstanz, Germany) (Prancha 1);

Grupo II – quinze espécimes que tiveram os canais radiculares obturados pela técnica da condensação lateral ativa com gutta-percha e cimento à base de hidróxido de cálcio (Sealer 26®, Dentsply, Petrópolis, Brasil) (Prancha 2);

Grupo III- cinco espécimes que não tiveram o canal radicular obturado

(controle positivo);

Grupo IV- cinco espécimes que não tiveram abertura coronária realizadas
(controle negativo).

	Pasta A	Resina epóxica Tungstênio de cálcio Óxido de zircônio Aerosil Óxido de ferro
	Pasta B	Amina Adamantana N, N-Dibencil-5-oxanonano-diamina-1,9 Tungsteanato de cálcio Óxido de zircônio Aerosil Óleo de silicone

Prancha 1- Composição química do cimento endodôntico AH-Plus™

		
PÓ	Hidróxido de cálcio Óxido de bismuto Hexametileno tetramina Dióxido de titânio	37% 43% 14% 5%
RESINA	Resina epóxica bisfenol	100%

Prancha 2. Composição química do cimento endodôntico Sealer 26®

4.5 PREPARO DO SISTEMA EXPERIMENTAL

A preparação do sistema experimental para avaliação da infiltração no sistema de canais radiculares está de acordo com o preconizado por Siqueira Júnior et al. (1999). Este sistema consistiu de frasco de um vidro com tampa de borracha e, este foi ajustado para utilização neste experimento.

Com um instrumento aquecido foi confeccionado um orifício no centro da tampa do frasco no qual os dentes foram inseridos sobre pressão até o limite da junção esmalte-cimento, de modo que apenas a coroa dentária ficasse exteriorizada e a raiz imersa no meio de cultura Brain Heart Infusion (BHI, Difco Laboratories, Detroit, MI, USA).

Cilindros-recipientes foram preparados a partir de seringas plásticas de 10ml (Plascalp, Bahia, Brasil) que foram adaptadas a superfície externa da tampa de borracha para criar um reservatório em torno da coroa. Em seguida estes cilindros-reservatório foram colados aos stops de borracha com etil-cianoacrilato (super-bonder, Henkel Loctite Adesivos Ltda., Brasil) (Fig 1.).



Figura1- Sistema de Avaliação da Infiltração.

4.6 TESTE DE INFILTRAÇÃO

Após a esterilização de todo material, os espécimes foram removidos da solução de estocagem (soro fisiológico- Gaspar Viana, Fortaleza, Brasil) e os canais radiculares já preparados foram secos com pontas de papel absorventes esterilizadas (Cellpack-Dentsply, Petrópolis, Brasil) e obturados de acordo com o grupo experimental sob condições assépticas.

A qualidade da obturação foi avaliada por três examinadores especialistas em endodontia e previamente calibrados, que consideraram todas as amostras satisfatórias (ausência de espaços radiolúcidos ou áreas radiolúcidas em menos de 1/3 da porção cervical do canal).

Em seguida, o elemento dentário foi introduzido no orifício confeccionado na tampa de borracha do sistema experimental e utilizou-se o etil-cianoacrilato para o selamento periférico e a fixação do dente ao sistema; desta forma, permitiu-se que apenas 2mm da raiz estivesse em contato com o meio de cultura BHI.

Para garantir a infiltração apenas pelo forame apical o elemento dentário foi impermeabilizado, na totalidade de seu comprimento exceto os 2mm aquém do forame apical, com três camadas de etil-cianoacrilato. Aguardou-se por um período de duas horas para a secagem total do sistema, com o objetivo de possibilitar a infiltração apenas pelo canal radicular. Após a montagem do sistema este foi submetido a uma nova esterilização a óxido de etileno (Galdi Hospitalar, Paulista, Brasil). Posteriormente, em fluxo laminar, os frascos de vidro foram preenchidos com meio de cultura BHI de modo que aproximadamente 2mm da raiz ficasse imersa no meio de cultura (Fig 2).

Para se testar a efetividade da esterilização o sistema foi incubado em estufa biológica a 37°C por 4 dias. Como após este período o meio de cultura não apresentou turvação, ficou estabelecido que o sistema foi efetivamente esterilizado.



Figura 2- Porção apical da raiz em contato com o meio.

4.7 MICRORGANISMOS INDICADORES

No desenvolvimento deste estudo, foram utilizados microrganismos com distintas características: cocos gram-positivos, bastonetes gram-negativos, além de uma levedura. Assim o painel de microrganismos indicadores estava constituído por uma linhagem de *Candida albicans* (IBB-50/NFC U.S.A.) da coleção de cultura do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (DAUFPE-1007) e três linhagens de bactérias (*Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*) isoladas no Setor de Microbiologia do Laboratório de Imunopatologia Keiso Asami-LIKA.

4.8 PREPARO DA SALIVA

Neste estudo foi utilizada saliva artificial (Phormula Ativa, Recife, Brasil) a qual foram adicionadas as linhagens bacterianas específicas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*) e uma levedura (*Candida albicans*) na concentração aproximada de 3×10^8 células por ml (concentração salivar), funcionando como marcadores biológicos de infiltração.

Os reservatórios foram preenchidos com 4ml de saliva artificial misturada com BHI na proporção de 3:1 (vol/vol) por meio de seringa descartável, evitando-se a produção de bolhas de ar. Esse material foi substituído a cada três dias de acordo com Siqueira Júnior et al. (1999) e avaliado por um período de até 120 dias.

Todo o sistema foi incubado a 37°C em estufa biológica, sendo observado a cada 24 horas para detecção ou não da turvação do meio.

O intervalo de dias para que esta contaminação (turbidez) do meio (Fig.3) pudesse ocorrer, foi determinante para o conhecimento do período necessário de re-contaminação do canal radicular por bactérias oriundas do meio bucal.

Após detectar a turbidez do meio BHI, alíquotas foram retiradas e semeadas em Ágar Sangue, Levine e Sabourad, incubadas em estufa biológica a 37°C (Fig.4) por 24 horas. Após o crescimento bacteriano ou fúngico, realizou-se a coloração de Gram e a bacterioscopia com análise microscópica para detecção das bactérias e/ou fungos que infiltraram o canal radicular e contaminaram o meio. As lâminas foram fotomicrografadas pelo microscópio Olympus BX41 com resoluções de 10X /0,25 e 40X/0,65 (Figs. 5, 6, 7, 8,9 e 10).



Figura 3 – Espécime da esquerda apresenta turbidez do BHI após contaminação

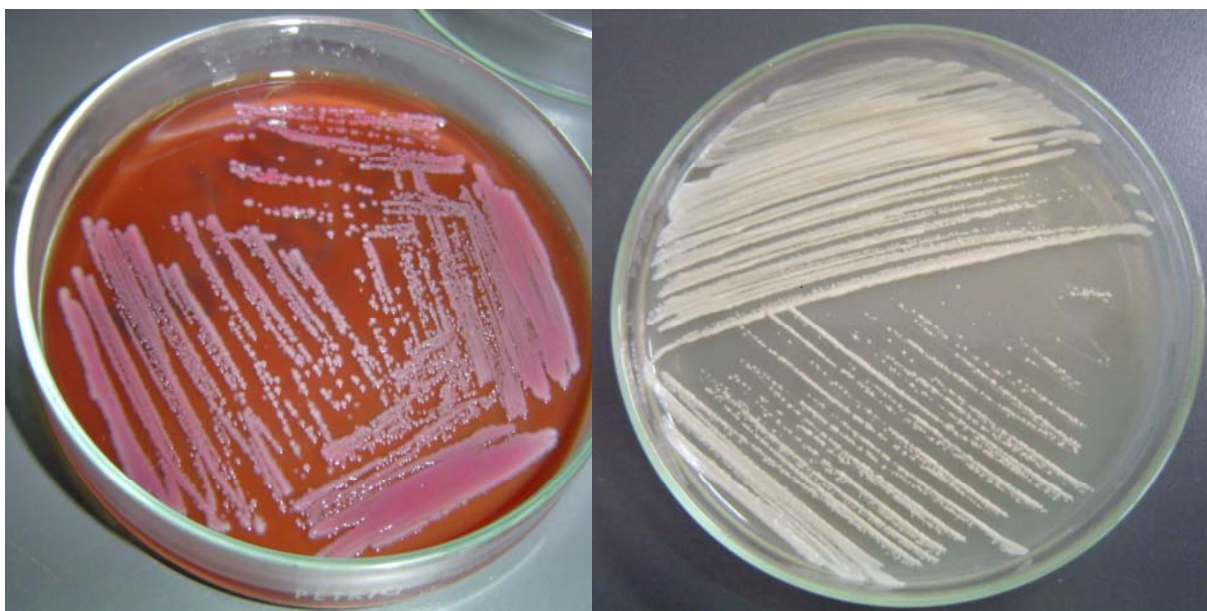


Figura 4 – Meios de cultura Ágar-Sangue (esquerda) e Ágar-Sabourad mostrando o crescimento bacteriano e fúngico das alíquotas obtidas após a turbidez do meio.

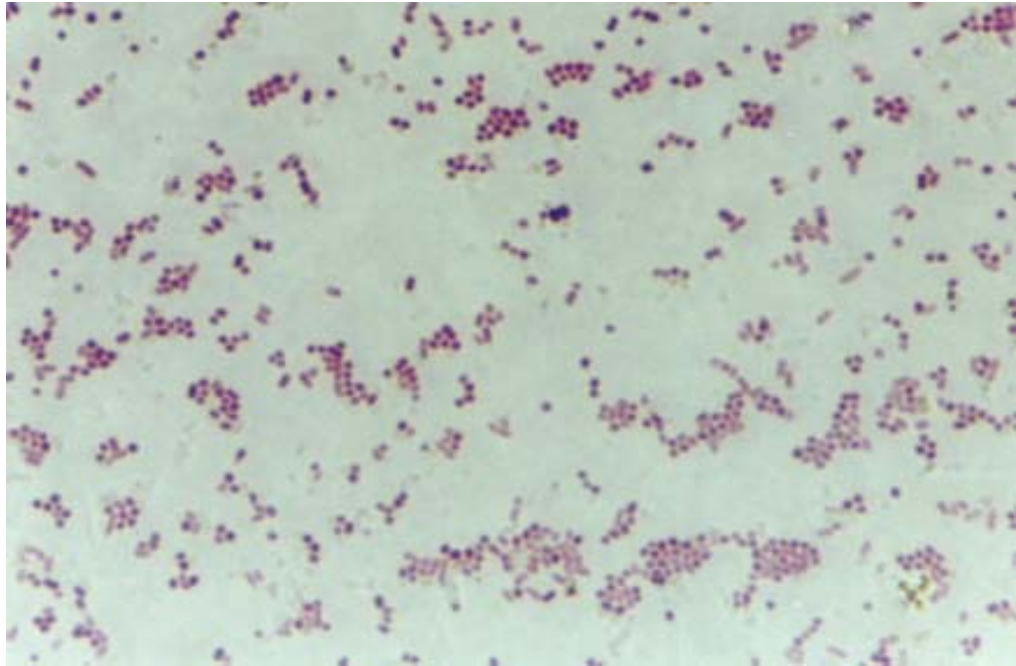


Figura 5 - Fotomicrografia de cocos gram-positivos em cadeias (*E. faecalis*) e cachos (*S. aureus*) com resolução de 10X/0,25.

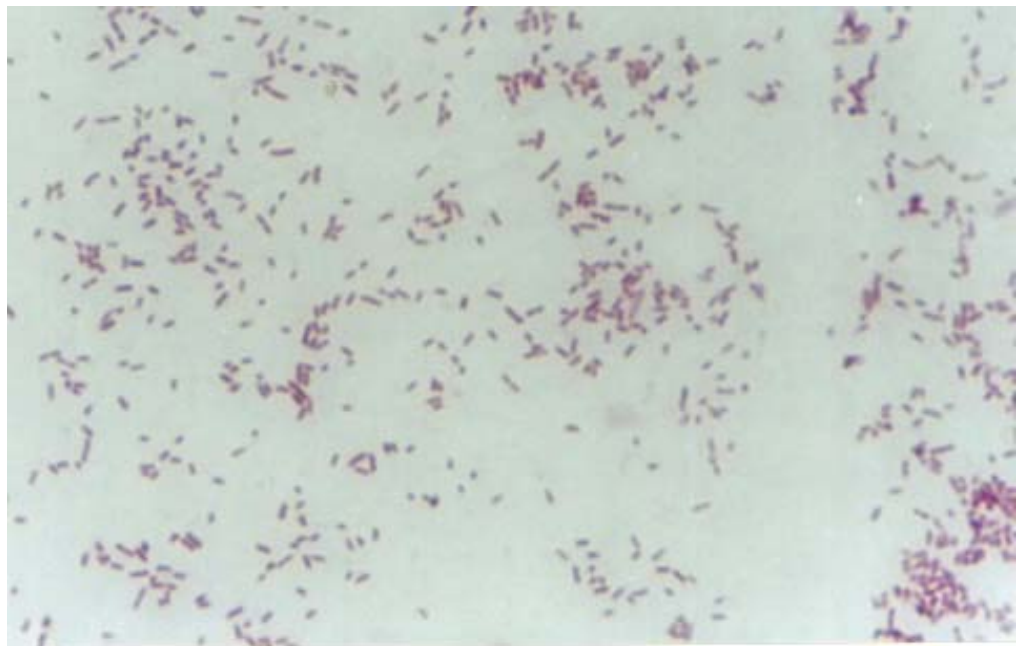


Figura 6 - Fotomicrografia de cocos gram-positivos (*E. faecalis*/ *S. aureus*) e bacilos gram-negativos (*Pseudomonas aeruginosa*) com resolução de 10X/0,25.

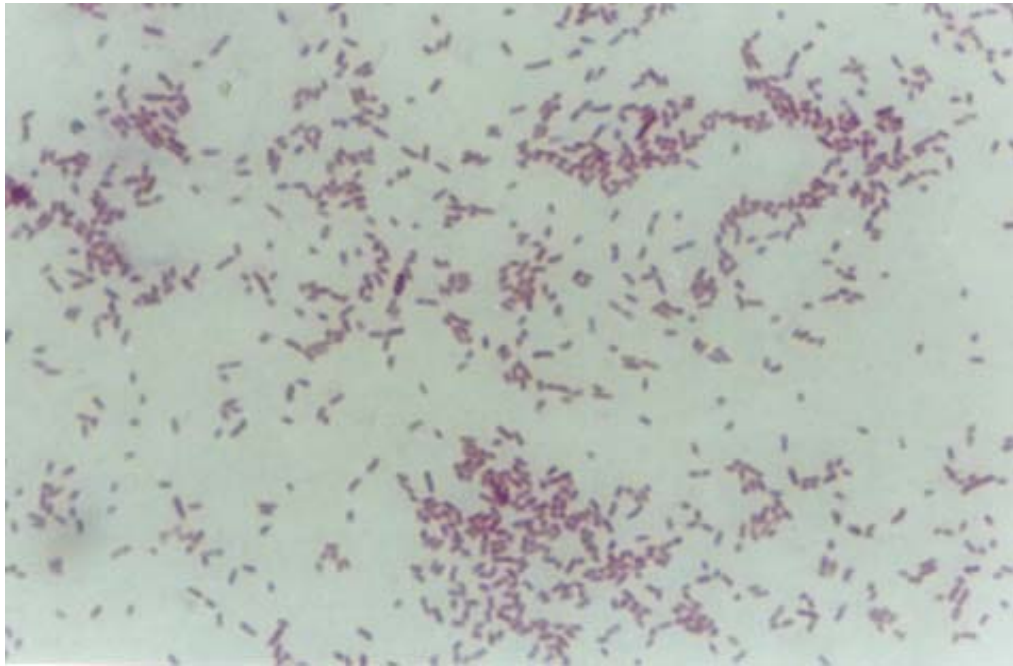


Figura 7 - Fotomicrografia de cocos gram-positivos e bacilos gram-negativos com resolução de 10X/0,25.

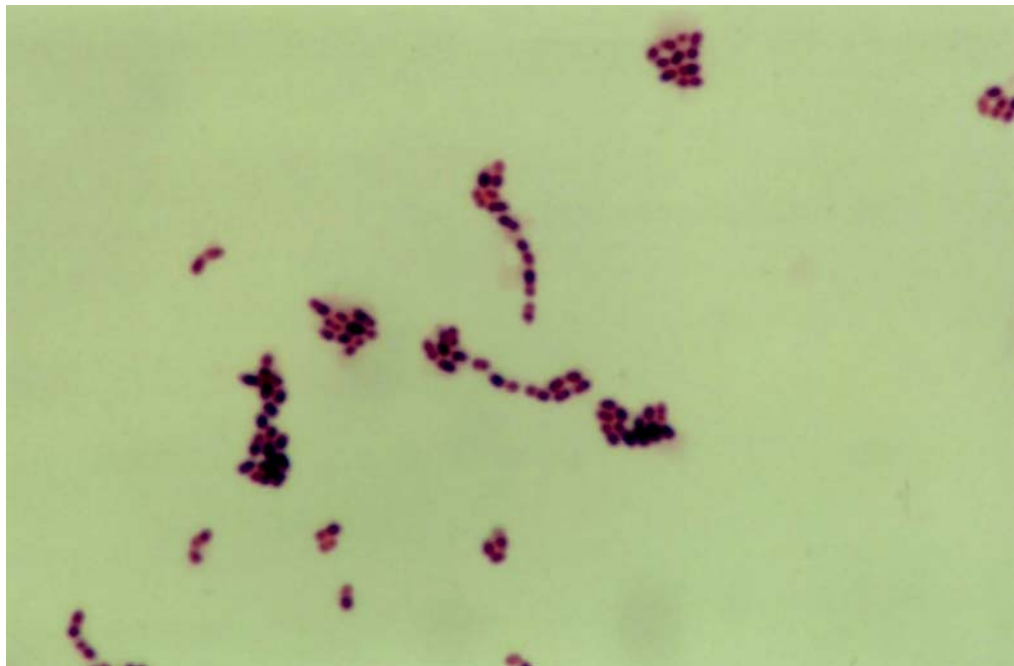


Figura 8 - Fotomicrografia de cocos gram-positivos (*E. faecalis*) com resolução de 40X/0,65.

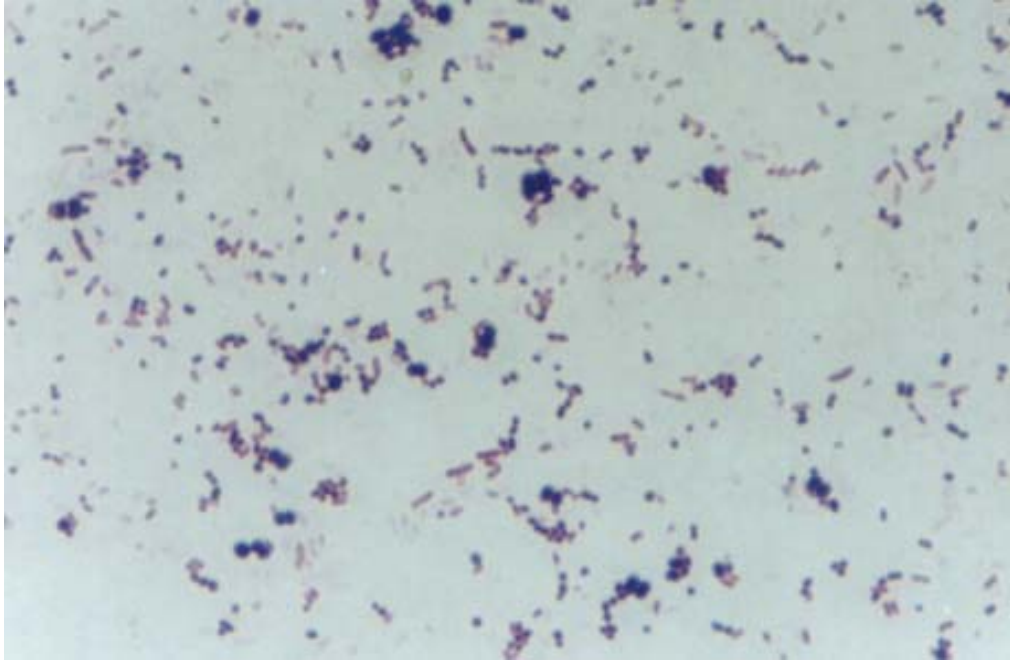


Figura 9 - Fotomicrografia de cocos gram-positivos, bacilos gram-negativos e levedura (*C. albicans*) com resolução de 10X/0,25.

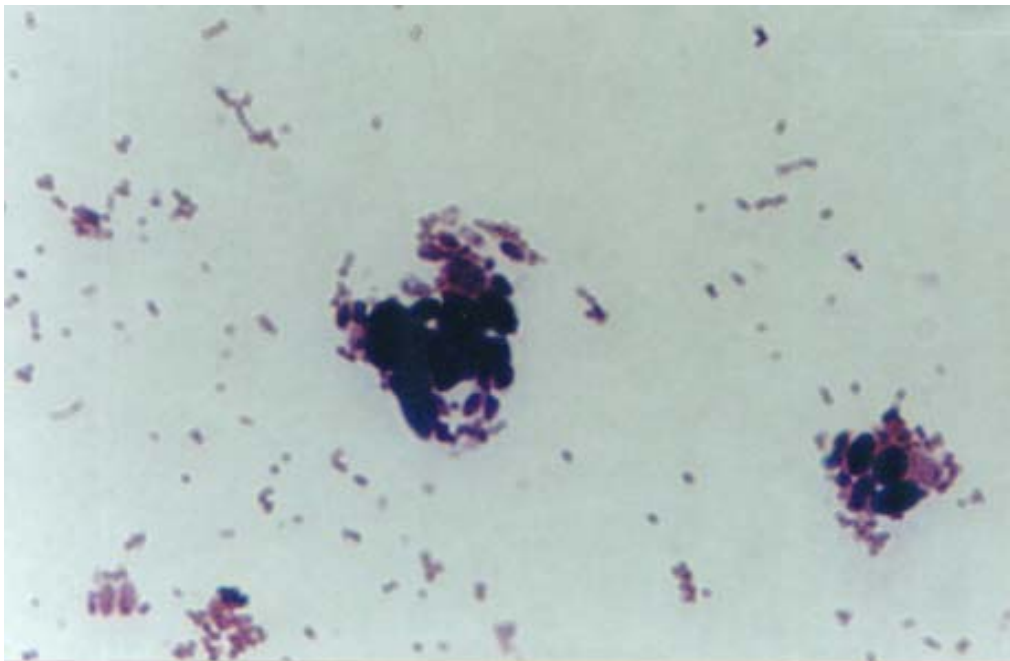


Figura 10 - Fotomicrografia de cocos gram-positivos, bacilos gram-negativos e levedura (*C. albicans*) com resolução de 40X/0,65.

4.9 DESTINO DO MATERIAL BIOLÓGICO

- Espécimes: após o término do experimento os elementos dentais foram esterilizados em autoclave a 121°C e devolvidos ao banco de dentes da Universidade Federal de Pernambuco-UFPE.

- Saliva artificial: após o uso da saliva no experimento, foi colocada em um tubo de vidro hermeticamente fechado levada ao autoclave para esterilização a 121°C e encaminhado ao lixo hospitalar em saco de cor branco leitoso padrão identificado com a palavra “infectado”.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O teste de Kappa foi realizado para determinar a coincidência entre os examinadores, da análise da qualidade radiográfica da obturação endodôntica.

Para análise dos dados foram obtidas distribuições absolutas e percentuais, probabilidade de permanência sem contaminação e as curvas de Kaplan-Meier (técnicas de Estatística Descritiva) e utilizado o teste Exato de Fisher (desde que não foram verificadas as exigências para o teste Qui-quadrado), o teste Log Rank e obtidos intervalos de confiança para os valores médios do tempo de permanência sem contaminação (Técnicas de estatística inferencial).

Para a análise do tempo de permanência sem contaminação foram obtidas as probabilidades do referido evento e as curvas de Kaplan-Meier.

O nível de significância utilizado na decisão do teste estatístico foi de 5% (0,05) e os intervalos foram obtidos considerando-se confiabilidade de 95%.

Os dados foram digitados na planilha Excel e o “software” utilizado para a obtenção dos cálculos estatísticos foi o SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) na versão 11.

5 RESULTADOS

A qualidade radiográfica da obturação endodôntica foi considerada satisfatória. Foi realizado o teste da Kappa e este assumiu o valor máximo ($\kappa=1$ entre cada par de examinadores), sendo observado 100% de coincidência.

Todos os espécimes do controle positivo apresentaram turbidez dentro de um a dois dias de incubação. Entretanto, não houve evidência de turbidez no controle negativo durante todo o intervalo do experimento (120 dias). Após sessenta dias de avaliação, dois dos quinze canais radiculares (13,3%) do grupo do Sealer 26[®] apresentaram recontaminação. O primeiro espécime contaminado foi observado no quadragésimo terceiro dia. Analisando por cento e vinte dias, observou-se que cinco dos quinze canais (33,3%) obturados com Sealer 26[®] apresentou contaminação. Apenas um espécime (6,7%) obturado com o AH-PlusTM apresentou contaminação observada no quinquagésimo sétimo dia dos 120 dias do período do experimento (Tabela 1).

Tabela 1. Relação entre os cimentos, tempo de contaminação e microrganismos que infiltraram.

CIMENTO ENDODÔNTICO	TEMPO/CONTAMINAÇÃO	MICROORGANISMOS
SEALER 26 [®]	43 DIAS	<i>E. faecalis</i> / <i>P.aeruginosa</i> / <i>S.aureus</i>
SEALER 26 [®]	45 DIAS	<i>E. faecalis</i> / <i>P.aeruginosa</i> / <i>S.aureus</i>
SEALER 26 [®]	89 DIAS	<i>E. faecalis</i> / <i>P.aeruginosa</i> / <i>S.aureus</i> <i>C.albicans</i>
SEALER 26 [®]	96 DIAS	<i>E. faecalis</i> / <i>P.aeruginosa</i> / <i>S.aureus</i>
SEALER 26 [®]	110 DIAS	<i>E. faecalis</i> / <i>P.aeruginosa</i> / <i>S.aureus</i>
AH - Plus TM	57 DIAS	<i>E. faecalis</i> / <i>P.aeruginosa</i> / <i>S.aureus</i>

Na Tabela 2, apresentam-se estimativas das probabilidades do tempo livre de contaminação, obtidas através do método de Kaplan-Meier, considerando-se

como evento a contaminação por bactéria até 120 dias do início da observação. Desta tabela observa-se que aos 110 dias a probabilidade de uma amostra permanecer sem contaminação era de 0,67 no grupo Sealer 26® e de 0,93 no grupo AH-Plus™. O tempo médio de sobrevida estimado foi de 106 dias no grupo Sealer 26® e de 116 dias no grupo AH-Plus™. Ao nível de 5% não se comprova diferença significativa entre os dois grupos em relação ao tempo de permanência sem contaminação.

Tabela 2 – Estimativa da probabilidade de permanecer livre de contaminação pelo método de Kaplan-Meier (evento: contaminação por bactéria) após 120 dias.

Material	Tempo de contaminação	Probabilidade de permanência sem contaminação	Amostras contaminadas acumuladas	Amostras em Teste	Valor de p
Sealer 26®	43	0,93	1	15	p ⁽¹⁾ = 0,0758
	45	0,87	2	14	
	89	0,80	3	13	
	96	0,73	4	12	
	110	0,67	5	11	
AH-Plus™	57	0,93	1	15	

(1) – Através do teste de Log Rank.

Tempo médio de permanência sem contaminação estimada e intervalo de confiança;

Grupo: Sealer 26® : 106 (92 a 119);

Grupo AH-Plus™ : 116 (108 a 124).

Os valores medianos não foram determinados porque menos da metade das amostras foram contaminadas.

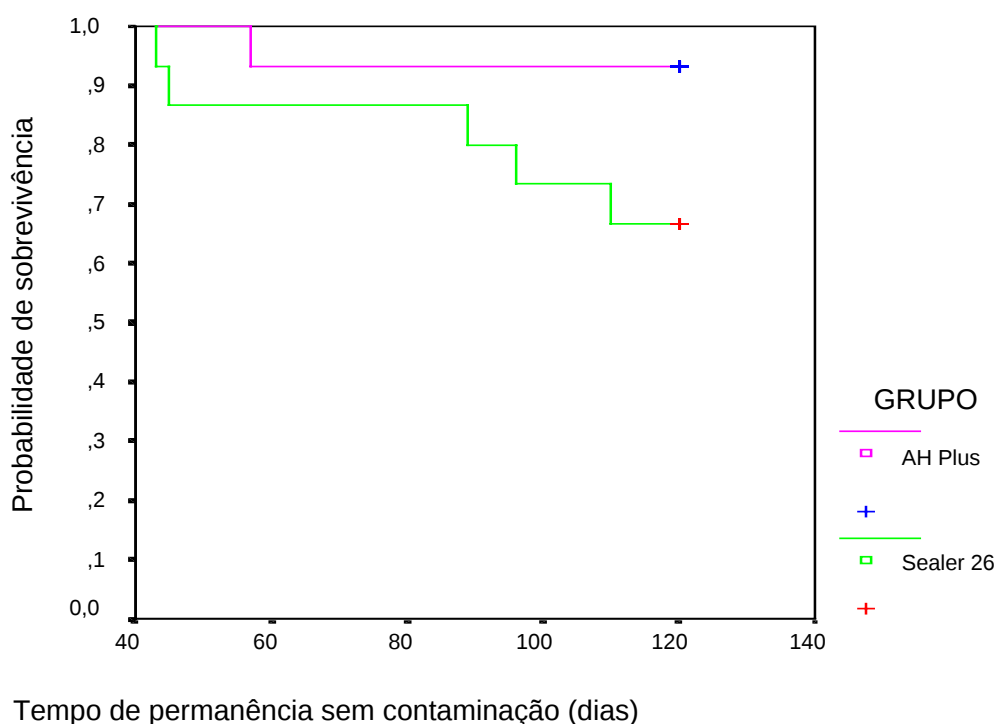


Gráfico 1 – Curvas de Kaplan-Meier para o tempo para contaminação das amostras

Da Tabela 3, destaca-se que após 60 dias de avaliação todas as amostras do grupo controle positivos foram contaminadas; nenhuma amostra do grupo controle negativo foi contaminada. No grupo Sealer 26[®] ocorreu contaminação de duas amostras (13,3%) enquanto que no grupo AH-Plus[™] ocorreu um caso de contaminação (6,7%). Através do teste Exato de Fisher, comprova-se diferença significativa entre os dois grupos em relação à ocorrência de contaminação ($p < 0,05$).

Tabela 3 – Resultados da avaliação da infiltração microbiana até 60 dias de avaliação

Grupo	N	Infiltração microbiana				TOTAL	Valor de p	Dias
		Sim	%	Não	%			
Sealer 26 [®]	2		13,3	13	86,7	15	$p^{(1)} = 0,0002^*$	43-45
AH-Plus [™]	1		6,7	14	93,3	15		57
Controle +	5		100,0	-	-	5		1-2
Controle -	-		-	5	100,0	5		-

(*) – Diferença significativa ao nível de 5%.

(1) – Através do teste Exato de Fisher.

Na avaliação com 120 dias (Tabela 4) destaca-se: todas as amostras do grupo controle positivos foram contaminadas; nenhuma amostra do grupo controle negativo foi contaminada. No grupo Sealer 26® ocorreu 1/3 de contaminação das amostras (33,3%), enquanto que no grupo AH-Plus™ ocorreu um caso de contaminação (6,7%). Através do teste Exato de Fisher, comprova-se diferença significativa entre os dois grupos em relação à ocorrência de contaminação ($p < 0,05$).

Tabela 4 – Resultados da avaliação da infiltração microbiana até 120 dias de avaliação

Grupo	Infiltração microbiana				TOTAL	Valor de p	Dias
	Sim n	Não %	Sim n	Não %			
Sealer 26®	5	33,3	10	66,7	15	$p^{(1)} = 0,0003^*$	43-110
AH-Plus	1	6,7	14	93,3	15		57
Controle +	5	100,0	-	-	5		1-2
Controle -	-	-	5	100,0	5		-

(*) – Diferença significativa ao nível de 5%.

(1) – Através do teste Exato de Fisher.

6 DISCUSSÃO

A infiltração de corantes e bactérias em canais radiculares obturados e que perderam o selamento coronário tem sido objeto de estudo por vários pesquisadores (KHAYAT, LEE, TORABINEJAD, 1993; ALVES, WALTON, DRAKE, 1998; BARTHEL et al., 1999; SIQUEIRA JÚNIOR et al., 1999; SIQUEIRA JÚNIOR et al., 2001a; TIMPAWAT, AMORNCHAT, TRISWAN, 2001; ILANA et al., 2002; MILETIC et al., 2002b; BRITO, GRIMAUDO, VERTUCCI, 2003; BARBOSA et al., 2003; KOPPER et al., 2003; ADIB et al., 2004). Para Alves, Walton e Drake (1998), além da infiltração bacteriana, a percolação de endotoxinas pode resultar em reação periapical e subsequente necessidade de retratamento e/ou cirurgia parendodôntica.

O presente estudo utilizou microrganismos para avaliar a infiltração coronária por ser este método considerado o mais relevante sob o aspecto clínico e biológico, pois segundo Barthel et al. (1999) o tamanho molecular das partículas de corante é menor do que o das bactérias, conseqüentemente, poder-se-ia obter resultados não condizentes com a realidade. Adicionalmente, o curto tempo de exposição, utilizado em testes com corantes, constitui parâmetros inadequados para mensurar a infiltração microbiana, em concordância com estudos realizados por Siqueira Júnior et al. (1999), Timpawat, Amornchat, Triswan (2001), Miletic et al. (2002a).

Os microrganismos selecionados para este experimento constituíram-se daqueles com maior freqüência em canais radiculares obturados com lesões periapicais refratárias, com distintas características (cocos e bastonetes; gram-positivos e negativos; anaeróbios facultativos; além de uma levedura). A escolha procedeu-se também com base em microrganismos estudados em outros experimentos, sendo estes constituídos por *Enterococcus faecalis* (SIREN et al., 1997; DAHLÉN et al., 2000; LOVE, 2001; HANCOCK et al., 2001; SUNDE et al.,

2002; PINHEIRO et al., 2003a; CHÁVEZ DE PAZ et al., 2003; RADCLIFE et al., 2004; SEDGLEY, LENNAM, CLEWELL, 2004; KAYAOGLU, ORSTOVIK, 2004; MOLLER et al., 2004; GOMES et al., 2004; RÔÇAS, SIQUEIRA JÚNIOR, SANTOS, 2004; SIQUEIRA JÚNIOR, RÔÇAS, 2004a; ADIB et al., 2004), *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (SIREN et al., 1997; CHEUNG, HO, 2001; ADIB et al., 2004), *Candida albicans* (WALTIMO et al., 1997; WALTIMO et al., 2001; BAUMGARTNER, WATTS, XIA, 2000; LANA et al., 2001; SIQUEIRA JÚNIOR et al., 2002; RADCLIFE et al., 2004; SIQUEIRA JÚNIOR, SEN, 2004b).

Optou-se por utilizar o *E. faecalis* uma vez que vários estudos detectaram a composição da flora microbiana presentes em dentes com insucessos endodônticos e observaram a predominância de microrganismos gram-positivos e anaeróbios facultativos sendo o *Enterococcus faecalis* a espécie mais comumente encontrada (DAHLÉN et al., 2000; HANCOCK et al. 2001; ROLPH et al. 2001; SUNDE et al. 2002; PINHEIRO et al. 2003b; MICKEL, NGUYEN E CHOGLÉ 2003; GOMES et al., 2004a; RÔÇAS, SIQUEIRA JÚNIOR, SANTOS, 2004; SIQUEIRA JÚNIOR, RÔÇAS 2004a). Siren et al. (1997) e Adib et al. (2004) observaram uma maior frequência do *Enterococcus faecalis* isolados ou associados a *Pseudomonas ssp.* em canais que não foram selados em alguma etapa do tratamento, naqueles que necessitaram de um maior número de sessões ou nos retratamentos.

Os fatores de virulência do *Enterococcus faecalis*, a capacidade de invasão e sobrevivência nos túbulos dentinários, além da grande resistência às medicações antimicrobianas, podem justificar a relação desta bactéria com as infecções endodônticas secundárias (LOVE, 2001; CHÁVEZ DE PAZ et al., 2003; RADCLIFE et al., 2004; SEDGLEY, LENNAN, CLEWELL, 2004; KAYAOGLU, ORSTOVIK, 2004; MOLLER et al., 2004; PAISANO et al., 2004).

O *Enterococcus faecalis* pode sobreviver às mudanças ambientais, e os

fatores de virulência desta bactéria podem estar relacionados com infecções endodônticas e resposta inflamatória periapical (KAYAOGLU, ORSTAVIK, 2004). Paisano et al. (2004) observaram o crescimento bacteriano em dentina humana infectada pelo *E. faecalis* em canais radiculares contaminados por esta bactéria durante o período testado (120 dias), comprovando a grande capacidade do *Enterococcus faecalis* em penetrar em dentes não selados e expostos à saliva, resultando em insucessos no tratamento endodôntico.

Além do *Enterococcus faecalis* também foram utilizados no presente estudo a *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, devido à freqüência destes microrganismos em infecções endodônticas secundárias (SIREN et al., 1997; CHEUNG, HO., 2001; SUNDE et al., 2002; GOMES et al., 2004a). Neste estudo foi observada a infiltração do *Enterococcus faecalis*, da *Pseudomonas aeruginosa* e do *Staphylococcus aureus* em todos os elementos contaminados.

Segundo Cheung, Ho (2001) a microbiota de dentes tratados endodonticamente e portadores de lesões periapicais assintomáticas é composta predominantemente por *Staphylococcus coagulase negativos*, *Streptococcus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Analisando a flora microbiana de periapicopatias persistentes em dentes com infiltração coronária após tratamento endodôntico, Adib et al. (2004) observaram que o grupo de bactérias predominantes foi os anaeróbios gram-positivos facultativos sendo o *Staphylococcus*, *Streptococcus*, e *Enterococcus* os mais prevalentes.

A presença de leveduras, sobretudo da *Candida albicans* isoladas ou freqüentemente associadas às bactérias, indica que os fungos podem exercer um importante papel nas lesões refratárias ao tratamento endodôntico convencional (WALTIMO et al., 1997; WALTIMO et al., 2000; BAUMGARTNER, WATTS E XIA, 2000; LANA et al., 2001; SUNDE et al., 2002; SIQUEIRA JÚNIOR et al., 2002).

Pinheiro et al. (2003a) analisando amostras de materiais obturadores coletados durante o retratamento endodôntico, encontraram uma correlação da presença do *Streptococcus ssp.* e da *Candida ssp.* em elementos dentários obturados e que não apresentavam selamento coronário. De acordo com Siqueira Júnior e Sen (2004b), embora a presença fúngica possa ser ocasionalmente observada em infecções endodônticas primárias, é constante em canais obturados com lesões refratárias, sendo a *Candida albicans* a espécie mais prevalente, tendo habilidade em colonizar os túbulos dentinários e resistir à maioria dos curativos de demora; apresentando, no entanto, sensibilidade às soluções à base de hipoclorito de sódio em concentrações de uso clínico (RADCLIFE et al., 2004).

Devido a incontestável frequência da *Candida albicans* nas lesões endodônticas persistentes, o presente estudo utilizou esta espécie fúngica objetivando analisar a sua percolação em canais obturados e expostos à saliva artificial, porém em apenas uma amostra obturada com gutta-percha e Sealer 26® foi detectada a presença desta levedura associada ao *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. O AH-Plus™ não apresentou contaminação pela *C. albicans* até 120 dias, discordando do estudo de Miletic et al. (2002b) que checando o crescimento bacteriano e fúngico em canais radiculares obturados com AH-Plus™ após um período de 90 dias, observaram infiltração bacteriana em 50% dos casos e infiltração de fungos em 55% e concluíram que a *Candida albicans* tem a mesma habilidade de penetração em canais obturados que as bactérias. Para Siqueira Júnior et al. (2002) a *Candida albicans* apresentou diferentes padrões de infecção dentinária. Em algumas espécies, a colonização foi leve, sem penetração nos túbulos dentinários; em outras, algumas áreas dos canais radiculares foram profundamente infectadas. Waltimo et al. (2000) verificaram que o tempo necessário para ocorrer penetração da *Candida albicans* nos túbulos

dentinários apresentou grande variação, enquanto que o *Enterococcus faecalis* penetrou no intervalo de 1 a 5 dias. Este estudo demonstrou que a penetração dentinária da *Candida albicans* foi menor e limitada em comparação ao *Enterococcus faecalis*.

Como, no presente experimento foi observada infiltração microbiana em apenas uma amostra obturada com o AH-Plus™, questionou-se a possível ação antimicrobiana deste cimento, Kaplan et al. (1999) observaram que o AH-Plus™ não apresentou efeito sobre a *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus*; por outro lado, Leonardo et al. (2000) verificaram inibição microbiana deste cimento sobre o *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa*. Siqueira Júnior et al. (2000) relataram que além da propriedade antimicrobiana dos cimentos, o escoamento pode auxiliar na inibição de microrganismos no sistema de canais radiculares e observaram que o AH-Plus™ apresenta superioridade nestas duas propriedades. Mickel, Nguyen e Chogle (2003) não observaram atividade antimicrobiana do AH-Plus™ para o *E. faecalis*, resultado este que divergiu do estudo de Cobankara et al. (2004) que observou eficácia na inibição do crescimento bacteriano do AH-Plus™ no teste de contato direto. Saleh et al. (2004) observaram que o AH-Plus™ associado a gutta-percha é efetivo na destruição do *Enterococcus faecalis* dos túbulos dentinários sendo mais eficaz que os cimentos à base de hidróxido de cálcio; entretanto, Gomes et al. (2004b) não observaram diferenças na propriedade antimicrobiana entre os cimentos Sealer 26® e AH-Plus™, nenhum destes cimentos inibiu completamente o crescimento microbiano (*C. albicans*, *E. faecalis*, *Staphylococcus aureus*) e a atividade antimicrobiana diminuiu ao longo do tempo. Como estes dois cimentos foram utilizados na presente pesquisa, pode-se pressupor que o baixo índice de infiltração microbiana pode ser justificado principalmente pela efetiva propriedade de selamento do que pela atividade

antimicrobiana.

Este estudo analisou por um período de 120 dias a infiltração fúngica e bacteriana em canais obturados com AH-PlusTM e Sealer 26[®] associados a gutta-percha e expostos à saliva artificial; observando o Sealer 26[®], foi constatada uma infiltração de 13,3% no período de 60 dias e 33,3% em 120 dias. No que se refere ao Sealer 26[®], Siqueira Júnior et al. (1999) observaram um índice de infiltração microbiana inferior ao SealapexTM (35% e 80% respectivamente) após 60 dias de avaliação. Segundo os autores, a recontaminação do sistema de canais radiculares pela infiltração coronária poderia ocorrer devido à dissolução da saliva, percolação na interface entre o cimento e as paredes dos canais e/ou entre o cimento e a gutta-percha; logo, com a perda do selamento coronário, bactérias e seus produtos podem atingir os tecidos perirradiculares promovendo ou perpetuando lesões periapicais. Barbosa et al. (2003) obtiveram 20% de infiltração bacteriana quando os canais foram obturados com gutta-percha e Sealer 26[®] e expostos à saliva por 90 dias. A utilização de um plug coronário com LumiconTM promoveu um percentual de 0% de infiltração, comprovando a importância do selamento visando proteger a obturação endodôntica.

Outro estudo *in vitro* executado por Siqueira Júnior. et al. (2001b) observou infiltração bacteriana em 65% de canais retrobturados com Sealer 26[®] e expostos à saliva humana por um período de 60 dias. Brito, Grimaudo e Vertucci (2003) verificaram que após 60 dias nem a técnica da condensação lateral da gutta-percha associada ao Sealer 26[®] nem a técnica do Microseal impediu a percolação microbiana.

A infiltração constitui uma das principais falhas do tratamento endodôntico, nesta pesquisa, o AH-PlusTM apresentou menor infiltração que o Sealer 26[®] (33,3% e 6,7% respectivamente), apresentando resultados similares aos estudos de

Siqueira Júnior, Rôças e Valois (2001a) diferindo pela utilização de bactérias ao contrário de corantes e concordando com De Almeida et al. (2000) que observaram a eficácia seladora do AH-PlusTM. Estes resultados podem ser devido ao fato dos cimentos à base de hidróxido de cálcio apresentarem maior solubilidade, provocando uma redução na capacidade de vedamento após exposição ao meio fluido por períodos prolongados.

A superioridade nas propriedades seladoras do AH-PlusTM observada nesta pesquisa, foi confirmada nos estudos de Deus et al. (2002), Cobankara et al. (2002) e Kardon et al. (2004). De Moor e De Bruyne (2004), entretanto, encontraram habilidades seladoras semelhantes entre o AH-PlusTM e o AH 26TM. Saleh et al. (2002) observaram que as falhas encontradas no AH-PlusTM foram essencialmente coesivas e a força de tensão adesiva foi superior ao ApexitTM.

A remoção da lama dentinária aumenta a vedação dos cimentos AH-PlusTM e Sealer 26[®] (SALEH et al. 2002; DEUS et al. 2002; SOUSA NETO et al. 2002). Entretanto, Saleh et al. (2003) não observaram acréscimo na força adesiva após a remoção do smear-layer. McMichen et al. (2003) estudaram as propriedades físicas e concluíram que o AH-PlusTM foi o menos solúvel entre os cimentos testados e apresentou a menor espessura de película, concordando com Schafer e Zardbiglari (2003) que também observou a baixa solubilidade do AH-PlusTM, o que poderia ser uma justificativa para o baixo nível de infiltração bacteriana observada no corrente estudo (6,7% em 120 dias).

Neste estudo, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os cimentos utilizados com relação ao tempo de permanência sem contaminação. A primeira amostra contaminada do Sealer 26[®] ocorreu no quadragésimo terceiro dia e a do AH-PlusTM, no quinquagésimo sétimo dia.

A variação no percentual de infiltração observada pode ser parcialmente explicada pelas diferenças nas metodologias empregadas. Devido às limitações dos estudos *in vitro*, torna-se fundamental a realização de experimentos *in vivo* para obtenção de dados que mimetizem a realidade clínica.

7 CONCLUSÕES

Nas presentes condições experimentais, é lícito concluir que:

1. Nenhum dos cimentos (AH-PlusTM e Sealer 26[®]) conseguiu inibir completamente a infiltração de microrganismos durante o período testado;
2. O AH-PlusTM apresentou-se estatisticamente superior ao Sealer 26[®] no que se refere à percentagem de amostras livres de contaminação durante o período de 120 dias;
3. Os resultados demonstrados pelos grupos controles comprovaram a eficácia da metodologia empregada. Todas as amostras do controle positivo (canais não obturados) contaminaram no intervalo de um a dois dias, ao passo que nenhuma das amostras do controle negativo (dentes hígidos) contaminou durante o período do experimento.

REFERÊNCIAS*

- ADIB, V.; SPRATT, D.; GULABIVALA, K. Cultivable microbial flora associated with persistent periapical disease and coronal leakage after root canal treatment: a preliminary study. **Int Endod J**, v. 37, n. 8, p. 542, Aug. 2004.
- ALVES, J.; WALTON, R.; DRAKE, D. Coronal leakage: endotoxin penetration from mixed bacterial communities through obturated, post-prepared root canals. **J Endod**, v.24, n.9, p.587-91, Sep.1998.
- BARTHEL, C. R.; MOSHONOV, J.; SHUPING, G.; ORSTAVIK, D. Bacterial leakage versus dye leakage in obturated root canals. **Int Endod J**, v. 32, n. 5, p. 370-5, Sep. 1999.
- BARBOSA, H. G.; HOLLAND, R.; SOUZA, V.; DEZAN JÚNIOR, E.; BERNABÉ, P. F. E.; OTOBONI FILHO, J. A.; NERY, M. J. . Healing process of dog teeth after post space preparation and exposition of the filling material to the oral environment. **Braz Dent J**, v.14, n.2, p. 103-8, 2003.
- BAUMGARTNER, J. C.; WATTS, C.M.; XIA, T. Occurrence of candida albicans in infections of endodontic origin. **J Endod**, v. 26, n. 12, p. 695-8, Dec. 2000.
- BRITO, L. R.; GRIMAUDO, N. J.; VERTUCCI, F. J. Coronal Microleakage Assessed by Polymicrobial Markers. **J Contemp Dent Pract**, v.4, n.3, p.001-10, Aug. 2003.
- CHEUNG, G. S. ; HO, M. W. Microbial flora of root canal treated teeth associated with asymptomatic periapical lesions. **Oral Microbiol Immunol**, v.16, n.6, p. 332-7, Dec. 2001.
- CHÁVEZ DE PAZ, L. E.; DAHLÉN, G.; MOLANDER, A.; MÖLLER, Â.; BERGENHOLTZ, G. Bacteria recovered from teeth with apical periodontitis after antimicrobial endodontic treatment. **Int Endod J**, v.36, p.500-508, 2003.
- COBANKARA, F. K.; ADANIR, N.; BELLI, S.; PASHLEY, D. H. A quantitative evaluation of apical leakage of four root-canal sealers. **Int Endod J**, v.35, n. 12, p.979-84, Dec. 2002.
- COBANKARA, F. K.; ALTINOZ, H. C.; ERGANIS, O.; KAV, K.; BELLI, S. In vitro antibacterial activities of root-canal sealers by using two different methods. **J Endod**, v.30, n.1, p.57-60, Jan.2004.
- DAHLÉN, G.; SAMUELSON, W.; MOLANDER, A.; REIT, C. Identification and antimicrobial susceptibility of enterococci isolated from the root canal. **Oral Microbiol Immunol**, v. 15, p.309-312, 2000.

DE ALMEIDA, W. A.; LEONARDO, M. R.; TANOMARU FILHO, M.; SILVA, L. A. Evaluation of apical sealing of three endodontic sealers. **Int Endod J**, v.33, n. 1, p. 25-7, Jan. 2000.

DE MOOR, R. J.; DE BRUYNE, M. A. The long-term ability of a AH 26 e AH Plus used with three gutta-percha obturation techniques. **Quintessence Int**, v. 35, n. 4, p. 326-31, Apr. 2004.

DEUS, G.; GURGEL FILHO, E. D.; FERREIRA, C. M.; COUTINHO FILHO, T. Penetração intratubular de cimentos endodônticos. **Pesqui Odontol Bras**, v. 16, n.4, Dec. 2002.

GOMES, B. P.; PEDROSO, J. A.; JACINTO, R. C.; VIANNA, M. E.; FERRAZ, C. C.; ZAIA, A. A.; SOUZA-FILHO, F. J. Microbiological examination of infected dental root canals. **Oral Microbiol Immunol**, v.19, n. 2, p.71-6, Apr. 2004a.

GOMES, B. P.; PEDROSO, J. A.; JACINTO, R. C.; VIANNA, M. E.; FERRAZ, C. C.; ZAIA, A. A.; SOUZA-FILHO, F. J. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of five root canal sealers. **Braz Dent J**, v. 15, n.1, 2004b.

HANCOCK, H. H.; SIGURDSSON, A.; TROPE, M.; MOISEWITSCH, J.; HILL, C. Bacterial isolated after unsuccessful endodontic treatment in north american population. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 91, n.5, p.579-86, 2001.

ILANA, H.; GORFIL, C.; SLUTZKY, H.; KOPOLOVIC, K.; ZALKIND, M.; SLUTZKY-GOLDBERG, I. Endodontic failure caused by inadequate restorative procedures. Review and treatment recommendations. **J Prosthet Dent**, v.87, n.6, p.674-8, 2002.

KAPLAN, A. E.; PICCA, M.; GONZALEZ, M. I.; MACCHI, R. L.; MOLGATINI, S. L. Antimicrobial effect of six endodontic sealers: an in vitro evaluation. **Endod Dent Traumatol**, v.15, n.1, p.42-5, Feb. 1999.

KARDON, B. P.; KUTTLER, S.; HARDIGAN, P.; DORN, S. O. An in vitro evaluation of the sealing ability of a new root-canal-obturation system. **J Endod**, v. 30, n. 2, p.122, 2004.

KAYOGLU, G.; ORSTAVIK, D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. **Crit Rev Oral Biol Med**, v.15, n.5, p.308-20, Sep. 2004.

KHAYAT, A. ; LEE, S. J.; TORABINEJAD, M. Human saliva penetration of coronally unsealed obturated root canals. **J Endod**, v.19, n.9, p.458-61, Sep. 1993.

KOPPER, P. M.; FIGUEIREDO, J. A. P.; DELLA BONA, A.; VANNI, J. R.; BIER, C. A.; BOPP, S. . comparative in vivo analysis of the sealing ability of three endodontic sealers in post-prepared root canals. **Int Endod J**, v.36, n.12, p.857-63, Dec. 2003.

LANA, M.A.; RIBEIRO-SOBRINHO, A. P.; STEHLING, R.; GARCIA, G. D.; SILVA, B. K. C.; HAMDAN, J. S.; NICOLI, M. A.; CARVALHO, M. A. R.; FARIAS, L. M.

Microrganisms isolated from root canals presenting necrotic pulp and their drug susceptibility in vitro. **Oral Microbiol Immunol**, v.16, n.2, p.100-5, Apr. 2001.

LEONARDO, M. R.; DA SILVA, L. A.; TANOMARU FILHO, M.; BONIFACIO, K. C.; ITO, I. Y. In vitro evaluation of antimicrobial activity of sealers and pastes used in endodontics. **J Endod**, v. 26, n. 7, p. 391-4, Jul. 2000.

LOVE, R. M. Enterococcus faecalis- a mechanism for its role in endodontic failure. **Int Endod J**, v.34, p.399-405, 2001.

McMICHEN, F. R.; PEARSON, G.; RAHBARAN, S.; GULABIVALA, K. A comparative study of selected physical properties of five root-canal sealers. **Int Endod J**, v.36, n. 9, p. 629-35, Sep. 2003.

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

MILETIC, I.; RIBARIC, S. P.; KARLOVIC, Z.; JUKIC, S.; BOSNJAK, A.; ANIC, I. Apical leakage of five root canal sealers after one year of storage. **J Endod**, v.28, n.6, p. 431-2, Jun. 2002a.

MILETIC, I.; PRPIĆ-MEHICIC, G.; MARSAN, T.; TAMBIC-ANDRASEVIC, A.; PLESKO, S.; KARLOVIC, Z.; ANIC, I. Bacterial and fungal microleakage of AH 26 e AH Plus root canal sealers. **Int Endod J**, v.35, p.428-32, 2002b.

MOLLER, A. J. R.; FABRICIUS, L.; DAHLÉN, G.; SUNDQVIST, G.; HAPPONEN, R. Apical periodontitis development response to endodontic treatment. Experimental root canal infections in monkeys with selected bacterial strains. **Eur J Oral Sci**, v.112, n.3, p.207-15, Jun. 2004.

PAISANO, A. F.; SPIRA, B.; CAI, S.; BOMBANA, A. C. In vitro antimicrobial effect of bacteriophages on human dentin infected with enterococcus faecalis ATCC29212. **Oral Microbiol Immunol**, v. 19, p. 327-330, 2004.

PINHEIRO, E. T.; GOMES, B. P.; FERRAZ, C. C.; SOUSA, E. L.; TEIXEIRA, F. B.; SOUZA-FILHO, F. J. . Microorganisms from canals of root-filled with periapical lesions. **Int Endod J**, v.36, n.1, p.1-11, Jan. 2003a.

PINHEIRO, E. T.; GOMES, B. P. F. A.; FERRAZ, C. C. R.; TEIXEIRA, F. B.; ZAIA, A. A.; SOUZA-FILHO, F. J. Evaluation of root canal microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. **Oral Microbiol Immunol**, v.18, p.100-103, 2003b.

RADCLIFFE, C. E.; POTOUIDOU, L.; QURESHI, R.; HABAHBEH, N.; QUALTROUGH, A.; WORTHINGTON, H.; DRUCKER, D. B. Antimicrobial activity of varying concentrations of sodium hypochlorite on the endodontic microorganisms Actinomyces israelii, A. Naeslundii, Candida albicans e Enterococcus faecalis. **Int Endod J**, v. 37, n.7, p.438-46, Jul. 2004.

RÔÇAS, I. N.; SIQUEIRA JÚNIOR, J. F.; SANTOS, K. R. Association of Enterococcus faecalis with different forms of periradicular diseases. **J Endod**, v. 30, n.5, p.315-20, May. 2004.

ROLPH, H. J.; LENNON, A.; RIGGIO, M. P.; SAUNDERS, W. P.; MACKENZIE, D.; COLDERO, L.; BAGG, J. Molecular Identification of microorganisms from Endodontic Infections. **J Clin Microbiol**, v.39, n.9, p.3282-3289, Sep. 2001.

SALEH, I. M.; RUYTER, I. E.; HAAPASALO, M.; ORSTAVIK, D. The effects of dentine pretreatment on the adhesion of root-canal sealers. **Int Endod J**, v.35, n. 10, p. 859-66, Oct. 2002.

SALEH, I. M.; RUYTER, I. E.; HAAPASALO, M.; ORSTAVIK, D. Survival of Enterococcus faecalis in infected dentinal tubules after root canal filling with different root canal sealers in vitro. **Int Endod J**, v. 37, n. 3, p. 193-8, Mar. 2004.

SCHAFER, E.; ZANDBIGLARI, T. . Solubility of root-canal sealers in water and artificial saliva. **Int Endod J**, v.36, n. 10, p. 660-9, Oct. 2003.

SEDGLEY, C. M.; LENNAN, S. L.; CLEWELL, D. B. Prevalence, phenotype and genotype of oral enterococci. **Oral Microbiol Immunol**, v.19, n. 2, p.95-101, Apr. 2004.

SIQUEIRA JÚNIOR, J. F. Endodontic infections: concepts, paradigms, and perspectives. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.94, n.3, p.281-93, Sep. 2002.

SIQUEIRA JÚNIOR, J. F.; FAVIERI, A.; GAHYVA, S. M. M.; MORAES, S. R.; LIMA, K. C.; LOPES, H. P. Antimicrobial activity and flow rate of newer and established root canal sealers. **J Endod**, v. 26, n. 5, p. 274-7, May. 2000.

SIQUEIRA JÚNIOR, J. F.; RÔÇAS, I. N.; LOPES, H. P.; UZEDA, M. . Coronal leakage of two root canal sealers containing calcium hydroxide after exposure to human saliva. **J Endod**, v.25, n. 1, p.14-6, Jan.1999.

SIQUEIRA JÚNIOR, J. F.; RÔÇAS, I. N.; VALOIS, C. R. Apical sealing ability of five endodontic sealers. **Aust Endod J**, v. 27, n.1, p. 33-5, Apr. 2001a.

SIQUEIRA JÚNIOR, J. F.; RÔÇAS, I. N.; ABAD, E. C.; CASTRO, A. J. R.; GAHYVA, S. M.; FAVIERI, A. . Ability of three root-end filling materials to prevent bacterial leakage. **J Endod**, v.27, n.11, p.673-5, Nov. 2001b.

SIQUEIRA JÚNIOR, J. F.; RÔÇAS, I. N.; LOPES, H. P.; ELIAS, C. N.; UZEDA, M. Fungal infection of radicular dentin. **J Endod**, v.28, n.11, p.770-3, Nov. 2002.

SIQUEIRA JÚNIOR, J. F.; RÔÇAS, I. N. Polymerase chain reaction-based analysis of microorganism associated with failed endodontic treatment. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 97, n.1, p.85-94, Jan. 2004a.

SIQUEIRA JÚNIOR, J. F.; SEN, B. H. Fungi in endodontic infections. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 97, n.5, p.632-41, May. 2004b.

SIREN, E. K.; HAAPASALO, M. P. P.; RANTA, K.; SALMI, P.; KEROSUO, E. N. J. Microbiological findings and clinical treatment procedures in endodontic cases selected for microbiological investigation. **Int Endod J**, v.30, n.2, p.91-5, Mar. 1997.

SOUSA-NETO, M. D.; PASSARINHO-NETO, J. G.; CARVALHO JÚNIOR, J. R.; CRUZ-FILHO, A. M.; PÉCORA, J. D.; SAQUY, P. C. Evaluation of EDTA, EGTA and CDTA on dentin adhesiveness and microleakage with different root canal sealers. **Braz Dent J**, v.13, n. 2, p. 123-8, 2002.

SUNDE, P. T.; OLSEN, I.; DEBELIAN, G. J.; TRONSTAD, L. Microbiota of periapical lesions refractory to endodontic therapy . **J Endod**, v.28, n.4, p.304-10, Apr. 2002.

TIMPAWAT, S. ; AMORNCHAT, C. ; TRISUWAN, W. R. Bacterial coronal leakage after obturation with three root canal sealers. **J Endod**, v.27, n.1, p.36-9, Jan. 2001.

VULLO, D. ; WACHSMAN, M. B. ; ALLCHE, L. **Microbiologia en practica- Manual de técnicas de laboratorio para la enseñanza de la microbiología aplicada**. Buenos Ayres: Atlante, 2000. 266p.

WALTIMO, T. M. T.; SIRÉN, E. K.; TORKKO, H. L. K.; OLSEN, I.; HAAPASALO, M. P. P. Fungi in therapy-resistant apical periodontitis. **Int Endod J**, v. 30, n.2, p. 96-101, Mar. 1997.

WALTIMO, T. M. T.; ORSTAVIK, D.; SIRÉN, E. K.; HAAPASALO, M. P. P. In vitro Yeast Infection of Human Dentin. **J Endod**, v.26, n.4, Apr. 2000.

WALTIMO, T. M. T.; DASSANAYAKE, R. S.; ORSTAVIK, D.; HAAPASALO, M. P. P.; SAMARANAYARE, L. P. Phenotypes and randomly amplified polymorphic DNA profiles of *Candida albicans* in a Finnish population. **Oral Microbiol Immunol**, v.16, p.106-112, 2001.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. Nº 420/2003-CEP/CCS

Recife, 17 de novembro de 2003.

Ref. Protocolo de Pesquisa nº 190/2003-CEP/CCS intitulado "Influência do cimento obturador no tempo de contaminação microbiana da canais radiculares obturados e expostos ao meio bucal".

Senhor (a) Pesquisador (a):

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco CEP/CCS/UFPE analisou, de acordo com a Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, o protocolo de pesquisa em epigrafe aprovando-o e liberando-o para início da coleta de dados em 17 de Novembro de 2003.

Ressaltamos que a pesquisadora responsável deverá apresentar relatório, em 30/01/2004

Atenciosamente,


Clara Albuquerque
Coordenadora do Comitê de Ética
em Pesquisa CCS/UFPE

A
Trícia Pires de Farias Paiva
Coordenação de Pós-graduação em Odontologia

