

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA  
NÍVEL DOUTORADO  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO CLÍNICA ODONTOLÓGICA  
ENDODONTIA**

*Tese*

**AVALIAÇÃO ATRAVÉS DA MICROSCOPIA ELETRÔNICA  
DE VARREDURA E TRANSMISSÃO DA  
DENTINA BOVINA APÓS USO DE  
DIFERENTES PROTOCOLOS DE IRRIGAÇÃO**

**MÁRCIA HELENA WAGNER**

Porto Alegre  
2014

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA  
NÍVEL DOUTORADO  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO CLÍNICA ODONTOLÓGICA - ENDODONTIA**

**AVALIAÇÃO ATRAVÉS DA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA E  
TRANSMISSÃO DA DENTINA BOVINA APÓS USO DE DIFERENTES  
PROTOCOLOS DE IRRIGAÇÃO**

**MÁRCIA HELENA WAGNER**

Porto Alegre

2014

MÁRCIA HELENA WAGNER

**AVALIAÇÃO ATRAVÉS DA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA  
E TRANSMISSÃO DA DENTINA BOVINA APÓS USO DE DIFERENTES  
PROTOCOLOS DE IRRIGAÇÃO**

Linha de pesquisa:  
Biomateriais e Técnicas Terapêuticas em Odontologia

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul,  
como requisito final para a obtenção do título de  
Doutor em Odontologia, área de concentração  
Clínica Odontológica, ênfase em Endodontia.

**Orientação:**  
**Prof. Dr. Marcus Vinícius Reis Só**

Porto Alegre  
2014

CIP - Catalogação na Publicação

Wagner, Márcia Helena  
AValiação ATRAVÉS DA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE  
VARREDURA E TRANSMISSÃO DA DENTINA BOVINA APÓS O USO  
DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE IRRIGAÇÃO / Márcia  
Helena Wagner. -- 2014.  
94 f.

Orientador: Marcus Vinícius Reis Só.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Faculdade de Odontologia, Programa de  
Pós-Graduação em Odontologia, Porto Alegre, BR-RS,  
2014.

1. Endodontia . 2. dentina. 3. hipoclorito de  
sódio. 4. clorexidina. 5. EDTA. I. Só, Marcus Vinícius  
Reis, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os  
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Dedico este trabalho,

**À Deus, o Senhor,**

Porque dEle e por Ele, e para Ele, são todas as coisas;  
glória, pois, a Ele eternamente. Amém.

Romanos 11:36

**Aos meus pais**

**Hildor e Ledy**, pelo exemplo de vida, apoio e amor incondicional.

**Aos meus filhos**

**Fahena e Isaac**, pelo amor, pelas experiências, alegrias e aprendizados que me proporcionam a cada dia. A quem impus minha ausência, esperando ser compreendida e servir de exemplo para suas vidas.

**À minha irmã**

**Marta** e sobrinhas **Indira e Helena**,  
pelo amor, cumplicidade, apoio e estímulo constantes.

## AGRADECIMENTOS

Ao amado **Prof. Dr. Marcus Vinícius Reis Só**, pelo carinho, dedicação, paciência e competência em me orientar. A fidelidade do Senhor mais uma vez se confirmou na minha vida quando me colocou como sua orientada.

Àquele a quem eu deveria chamar de coorientador, **Prof. Dr. José Poli de Figueiredo**, cujo apoio foi fundamental para a conclusão desta tese, pela disposição, competência, conhecimento e carinho dispensados a mim, especialmente na análise das imagens.

À equipe de professores de Endodontia da UFRGS, **Prof. Dr. Regis Burmeister dos Santos**, Prof. Dr. **João Ferlini Filho**, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. **Fabiana Soares Grecca**, Prof. Dr. **Augusto Bodanezi**, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. **Patrícia Kopper Móra**, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. **Simone Bonato Luisi**, Prof. Dr. **Francisco Montagner** e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. **Renata Graziotin**, pela carinhosa acolhida, ensinamentos e amistosa convivência.

Aos amados colegas de doutorado, em especial ao **Ricardo Abreu da Rosa**, pela sua disposição, coleguismo e pelos inúmeros auxílios a mim prestados, à **Manuela Favarin Santini**, à **Daiana Elisabeth Böttcher**, ao **Maximiliano Schunke Gomes** e às colegas do mestrado **Aline Martins Justo**, **Carolina Bender Hoppe**, **Eloísa Assmann**, **Ludmila C. Moraes**, **Alessandra T. L. Vaucher**, pela amizade e carinho. Aprendi muito com todos vocês!

À secretária da Endodontia da Faculdade de Odontologia da UFRGS **Andréia Dill**, pelo carinho, disposição e auxílios prestados.

À coordenação e funcionários do Centro de Microscopia de Eletrônica da UFRGS pelos serviços prestados em especial às funcionárias **Christiane de Queiroz Lopes** e **Raquel Wigg Cunha** e à, então funcionária, **Moema Queiroz**, pela competência e dedicação.

À Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (PROPESQ), pelo apoio financeiro para preparação das amostras para MET.

À coordenação e funcionários do Laboratório de Histologia e Patologia da UNISC, em especial ao **Joel Henrique Ellwanger**, pela dedicação e competência, na descalcificação das amostras para MET.

Aos alunos e colegas professores do Curso de Odontologia da UNISC, bem como do Departamento de Enfermagem e Odontologia em especial aos colegas da Disciplina de Endodontia, os amigos **Daniel Renner**, **Magda de Souza Reis** e **Ronise Ferreira Dotto**, pela consideração, pelo carinho, pela amizade, companheirismo e por fazer com que essa jornada se tornasse mais leve. E aos colegas dos Estágios Supervisionados, **Edilson Castelo** e **Simone Glesse**, por aceitarem trocar suas aulas comigo para que eu pudesse desenvolver atividades relativas ao doutorado.

Ao colega **Prof. Dr. Fernando Branco Barletta** pelo constante incentivo e estímulo à pesquisa.

À minha prima, colega de consultório e agora, colega de docência na UNISC, **Karine Wagner Butzke**, pela amizade, incentivo e apoio.

Às minhas amigas e funcionárias **Marisa Solani Schmidt Gass**, secretária no consultório à época do início do doutorado e à minha atual, **Cristine Andréia Schaefer**, pelo competente trabalho, apoio e carinho dispensados. À querida **Sílvia Patrícia Silva** que cuida da minha casa e dos meus, pelo carinho e apoio fundamentais para que eu pudesse me ausentar e desenvolver as atividades do doutorado.

A toda a minha grande família, em especial aos amados **Fahena** e **Isaac**, **Hildor** e **Ledy**, **Marta**, **Indira** e **Helena** pelos momentos de convívio sempre tão próximos, tão alegres, tão amorosos. Obrigada por sempre me estenderem a mão, mesmo quando não precisei. Sei que poderei sempre contar com vocês e a recíproca é verdadeira.

Acima de tudo, ao **Senhor**, meu Deus, pela graça a mim dispensada, cuidando de mim e dos meus, guiando meus passos, me fortalecendo e capacitando para alcançar vitórias. Obrigada pelas infinitas bênçãos!

A todos que direta, ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho,

Muito obrigada!

**“Aquele que habita no esconderijo do Altíssimo, à sombra do Onipotente  
descansará.**

**Direi do Senhor: Ele é o meu Deus, o meu refúgio, a minha fortaleza e  
nele confiarei.”**

*Salmo 91:1-2*

## SUMÁRIO

RESUMO .....	9
ABSTRACT .....	10
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS .....	11
1 INTRODUÇÃO .....	13
2 REVISÃO DA LITERATURA .....	16
2.1 Soluções irrigadoras .....	16
2.1.1 Hipoclorito de sódio .....	16
2.1.2 Clorexidina .....	18
2.1.3 EDTA .....	20
2.1.4 Interações das soluções irrigadoras .....	23
2.2 Ativação ultrassônica .....	27
2.3 Avaliação através da microscopia eletrônica .....	32
2.4 Dentina radicular humana e bovina: aspectos estruturais .....	35
3 OBJETIVOS .....	38
3.1 Geral .....	38
3.2 Específicos .....	38
4 ARTIGO CIENTÍFICO .....	39
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	58
6 CONCLUSÕES .....	69
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	70
8 FIGURAS .....	83
8.1 Quadro de imagens de MET .....	84
8.2 Quadro de imagens de MEV .....	88
9 APÊNDICE .....	89
9.1 Fluxograma .....	90
9.2 Protocolo básico de preparação de amostras para MET.....	91
10 ANEXOS .....	92
10.1 Aprovação do Comitê de Pesquisa .....	93
10.2 Declaração de doação de dentes bovinos .....	94

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi analisar, através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e transmissão (MET), a ultraestrutura dentinária após a utilização de diferentes protocolos de irrigação. Trinta e nove incisivos inferiores bovinos após ter suas coroas amputadas e polpas dentárias removidas, foram divididos aleatoriamente em 13 grupos (n=3). Nos grupos 2 ao 13 as paredes dos canais foram regularizadas com brocas Gates-Glidden e padronizado o diâmetro apical no tamanho correspondente a uma lima K #70. Todas as raízes foram clivadas longitudinalmente em duas metades. As seis hemirraízes pertencentes ao grupo controle foram imersas em água destilada, em cuba de ultrassom, acionada durante dois intervalos de 5 minutos. As demais foram imersas em EDTA 17%, ultrassonificadas por 5 minutos e em seguida, por mais 5 minutos, imersas em água destilada, para padronização das amostras. As hemirraízes, reunidas ao respectivo par, receberam o protocolo de irrigação específico para cada grupo: Grupo 1 (G1): água destilada (controle); G2: soro; G3: soro e EDTA 17%; G4: soro + AUP; G5: soro + AUP + EDTA; G6: NaOCl 2,5%; G7: NaOCl + EDTA; G8: NaOCl + AUP; G9: NaOCl + AUP + EDTA; G10: CHX 2%; G11: CHX + EDTA; G12: CHX + AUP; G13: CHX + AUP + EDTA. Uma hemirraiz de cada espécime foi preparada e avaliada através de MEV e, uma de cada grupo, através de MET. Os resultados da análise descritiva através da MET evidenciaram a degeneração na estrutura orgânica dentinária, caracterizada pelo afinamento das fitas de colágeno, causada pelo NaOCl, potencializado pelo EDTA e/ou AUP. A análise através da MEV mostrou que o NaOCl com AUP provocou erosão da dentina peritubular significativamente maior que todos os demais grupos ( $P < 0,05$ ), seguido do NaOCl com EDTA e NaOCl com EDTA e AUP, nesses três grupos também ocorreu erosão na dentina intertubular. O NaOCl 2,5% favoreceu melhor limpeza, causou erosão da dentina peri e intertubular e promoveu alterações ultraestruturais no colágeno dentinário, potencializado pelo EDTA e/ou AUP.

**Palavras-chave:** Endodontia, dentina, hipoclorito de sódio, clorexidina, EDTA, terapia por ultrassom.

## ABSTRACT

The aim of this study was to analyze, by scanning, and transmission electron microscopy the dentin ultrastructure after using different irrigation protocols. Thirty-nine bovine incisors after amputated their dental crowns and pulp removed, were randomly divided into 13 groups (n = 3). In groups 2-13 the root canal walls were regularized with Gates-Glidden drills and standardized apical diameter up to a size #70 K-file. All roots were split longitudinally into two halves. The six halves belonging to the control group were immersed in distilled water in the ultrasonic tank, actived during two intervals of 5 minutes. The others halves were immersed in 17% EDTA, actived for 5 minutes and then, for 5 minutes, immersed in distilled water for samples standardization. After the halves were reassembled, they received the irrigation protocol specific for each group: G1, distilled water (control); G2, 0.9% saline; G3, saline + 17% EDTA; G4, saline + PUI; G5, saline + PUI + EDTA; G6, 2.5% NaOCl; G7, NaOCl + EDTA; G8, NaOCl + PUI; G9, NaOCl + PUI + EDTA; G10, 2% CHX; G11, CHX + EDTA; G12, CHX + PUI; G13, CHX + EDTA + PUI. One half of each specimen was prepared and evaluated by SEM, and one of each group, by TEM. The results of the descriptive analysis by TEM showed changes in the dentin organic ultrastructure, characterized by thinning of the collagen fibrils, caused by 2,5% NaOCl, potentiated by 17% EDTA and/or PUI. The analysis by SEM showed that the PUI with NaOCl caused peritubular dentin erosion significantly higher than all other groups (P <0.05), followed by NaOCl with EDTA and by NaOCl with EDTA and PUI, in these three groups also occurred intertubular dentine erosion. The 2,5% NaOCl favored better cleaning, caused erosion of the peritubular and intertubular dentin and promoted ultrastructural alterations in the dentin collagen which were potentilaized by EDTA and/or PUI.

**Keywords:** endodontics, dentine, sodium hypochlorite, chlorhexidine, EDTA, ultrasound therapy.

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

% - porcentagem

**ANP** – apical negative pressure – pressão apical negativa

**ATMA** - ácido amino tris metileno fosfórico

**AUI** – ative ultrasonic irrigation, irrigação ultrassônica ativa

**AUP** – ativação ultrassônica passiva

°C – graus Celsius

**CA** – ácido cítrico

**CHX** – clorexidina

**cm** – centímetro

**CME** – Centro de Microscopia Eletrônica

**CTR** - Cetrimídio

**EDTA** – ácido etileno-diamino-tetracético

**EGTA** – ácido etileno-glico-acético

**EDTAC** – EDTA com Cetavlon

**H<sub>2</sub>O** – água

**HEBP** - 1-hidroxietileno-1 1-bifosfato, solução de etidronato

**IPI** – iodeto iodado de potássio

**IUNA** – aspiração com agulha de irrigação ultrassônica

**IUNI** – injeção com agulha de irrigação ultrassônica

**kV** – quilovolt

**M** – solução molar, relativo a mol

**mg** – miligrama

**ml** – microlitro

**mm** – milímetro

**MET** – microscopia eletrônica de transmissão

**MEV** – microscopia eletrônica de varredura

**MO** – microscopia óptica

**MLP** – microscopia de luz polarizada

**μm** – micrômetro

**MTDA** - Doxiciclina a 3%, ácido cítrico a 4,25% e detergente polissorbato 80 a 0,5%

**NaOCl** - hipoclorito de sódio

**nm** - nanômetro

**PCA** - paracloroanilina

**PCGH** - paraclorofenilguanidil-1, 6-diguanidil-hexane

**PCU** - paraclorofeniluréia

**pH** - Potencial de Hidrogênio, representação da escala na qual uma solução neutra é igual a 7.

**PROPESQ** - Pró-Reitoria de Pesquisa

**PUI** - passive ultrasonic irrigation

**QMIX** - bisbiguanida, ácido poliaminocarboxílico, soro fisiológico e agente surfactante

**RS** - Rio Grande do Sul

**SAF** - Self-Adjusting File – limas auto-ajustáveis

**SEM** - Scanning Electron Microscopy

**SORO** - solução fisiológica a 0,9%

**STP** - trifosfato de sódio

**TEM** - Transmission Electron Microscopy

**UFRGS** - Universidade Federal do Rio Grande do Sul

**UNISC** – Universidade de Santa Cruz do Sul

## 1 INTRODUÇÃO

A sanificação, modelagem e o selamento tridimensional do sistema de canais radiculares são essenciais para o sucesso do tratamento endodôntico. Dentro deste contexto, protocolos de irrigação exercem um papel fundamental.

Diversas substâncias tem sido utilizadas como soluções irrigadoras do sistema de canais radiculares com o intuito de remover tecido pulpar e *debris*, bem como, auxiliar na eliminação de microrganismos. Estas substâncias químicas devem possuir quatro propriedades principais: atividade antimicrobiana, dissolução de tecido orgânico, auxiliar no debridamento do sistema de canais e não ser tóxico aos tecidos periapicais para que possam desempenhar suas funções durante o preparo do sistema de canais radiculares (CHEUNG; STOCK, 1993).

Durante o preparo dos canais radiculares são formadas raspas de dentina pela ação dos instrumentos endodônticos que, associadas à matéria orgânica proveniente de remanescentes de tecido pulpar e microrganismos, se aderem à superfície dentinária, formando a lama dentinária (MELLO *et al.*, 2008; PRADO *et al.*, 2011). Estudos demonstraram que essa camada deve ser completamente removida da superfície radicular, pois serve de abrigo às bactérias, prejudicando a ação das substâncias irrigadoras e das medicações intracanaís de atuarem na desinfecção efetiva dos túbulos dentinários (CLARK-HOLKE *et al.*, 2003; WANG; SHEN; HAAPASALO, 2013); a sua remoção total favorece a adaptação dos materiais obturadores endodônticos (WU; WESSELINK, 2001; SHAHRAVAN *et al.*, 2007); aumenta a adesão de cimentos endodônticos resinosos com a dentina (SALEH *et al.*, 2002; BABB *et al.*, 2009; HASHEN *et al.*, 2009) e reduz microinfiltração apical e coronal (COBANKARA *et al.*, 2002; ECONOMIDES *et al.*, 2004).

Durante e após a instrumentação os irrigantes promovem a remoção de microrganismos, remanescentes teciduais e raspas de dentina dos canais radiculares através de um mecanismo de lavagem (*flushing*) (ZEHNDER, 2006; HAAPASALO *et al.*, 2010). As implicações clínicas e microbiológicas decorrentes da persistência de bactérias nos canais radiculares após o tratamento endodôntico têm sido relatadas e constituem um dos principais fatores que levam ao fracasso da endodontia (CLARK-HOLKE *et al.*, 2003; NAIR, 2006; SIQUEIRA JR; RÔÇAS, 2008). Estudos utilizando microtomografia computadorizada tem demonstrado que muitas áreas do canal radicular permanecem sem serem tocadas pelos

instrumentos, enfatizando a importância das substâncias químicas na limpeza e desinfecção do sistema de canais radiculares (PETERS; SCHÖNENBERGER; LAIB, 2001; PAQUÉ; RECHENBERG; ZEHNDER, 2012). As áreas não tocadas pelos instrumentos, durante o preparo dos canais radiculares, particularmente anastomoses entre canais, são frequentemente preenchidas por *debris* que contém uma considerável proporção de matéria orgânica (PAQUÉ *et al.*, 2009). A permanência desses *debris* pode prejudicar a ação de medicamentos que necessitam estar em contato direto com os patógenos. Além disso, impedem o preenchimento adequado de todos os espaços do canal radicular pelo material obturador, deixando áreas passíveis de sofrerem infiltração (LEE; WU; WESSELINK, 2004; ZMENER; PAMEIJER; BENEGAS, 2005; DE DEUS *et al.*, 2008).

O fluxo da solução irrigadora no interior do canal radicular tem o objetivo de tornar mais efetiva a sua limpeza (PETERS, 2004). Para Gregório *et al.* (2010), existem dois fatores diretamente relacionados com uma irrigação eficiente, a própria solução irrigadora e a maneira como ela é aplicada no interior do canal radicular. São muitos os protocolos de irrigação disponíveis atualmente para remoção da lama dentinária e *debris* e, conseqüentemente, promover a antissepsia dos canais. Entretanto, nenhum promove a limpeza completa dos canais (HAAPASALO *et al.*, 2010; MANCINI *et al.*, 2013).

Outro aspecto a ser considerado quando da escolha da solução irrigadora é a adesão à dentina que pode ser afetada por inúmeros fatores. Algumas pesquisas demonstram que a utilização de soluções irrigadoras e medicações durante o tratamento endodôntico podem ter um efeito deletério sobre a união de agentes adesivos às estruturas dentinárias da cavidade pulpar (MORRIS *et al.*, 2001; ARI; YAŞAR; BELLÍ, 2003; SANTOS *et al.*, 2006; MARENDING *et al.*, 2007a; ZHANG *et al.* 2010a, MAI *et al.*, 2010; RENOVATO *et al.*, 2013).

É sabido que nenhuma solução irrigadora, assim como nenhum sistema de irrigação intracanal, contempla todas as funções desejadas. Entretanto, as substâncias químicas que atualmente são mais utilizadas durante o tratamento endodôntico são o hipoclorito de sódio, a clorexidina e o EDTA. Além disso, a utilização da ativação ultrassônica como auxiliar na irrigação tem se difundido. Estudos tem demonstrado a eficácia da ativação ultrassônica passiva na limpeza dos canais radiculares, incentivando o seu uso para limpeza das zonas não tocadas pelos instrumentos, como istmos e reentrâncias, bem como para melhor irrigação da

zona apical (GUERISOLI *et al.*, 2002; KUAH *et al.*, 2009; JIANG *et al.*, 2010b; VAN DER SLUIS *et al.*, 2010; CAPAR *et al.*, 2014).

Assim, baseado nas informações supracitadas, e no fascínio que este tema gera na comunidade científica, uma série de questionamentos surgiram e conduziram este estudo sobre os efeitos de diferentes protocolos de irrigação sobre a ultraestrutura dentinária.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Soluções irrigadoras

#### 2.1.1 Hipoclorito de sódio

Dentre as soluções irrigadoras, destaca-se o hipoclorito de sódio, que tem sido utilizado por um longo período como substância química auxiliar do preparo do sistema de canais radiculares. Primeiramente, em 1936, sua utilização em Endodontia foi proposta por Walker e difundida por Grossmann a partir da década de 40 (GROSSMAN, 1943). Este composto halogenado é um sal que somente existe em solução aquosa e é utilizado em diferentes concentrações que variam de 0,5 a 5,25%. Sua utilização clínica é decorrente da capacidade em dissolver remanescentes orgânicos, necróticos ou não, de sua atividade antimicrobiana e da baixa toxicidade em pequenas concentrações (SPÅNGBERG; ENGSTRON; LANGELAND, 1973). O hipoclorito de sódio é mundialmente utilizado e considerado a mais importante solução irrigadora em Endodontia (ZEHNDER, 2006; GREGÓRIO *et al.*, 2010; RÔÇAS; SIQUEIRA JR, 2011).

O grande diferencial do hipoclorito em relação às outras soluções irrigadoras utilizadas atualmente é a sua capacidade de dissolução de tecido orgânico. Essa propriedade está diretamente relacionada com a sua concentração (ZEHNDER, 2006; HAAPASALO *et al.*, 2010; CLARKSON *et al.*, 2012; DUTTA; SAUNDERS, 2012).

Vários estudos tem demonstrado a ação antimicrobiana do hipoclorito de sódio (DORNELES-MORGENTAL *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2012; LIN; SHEN;/ HAAPASALO, 2013). Especialmente em altas concentrações, o hipoclorito de sódio é capaz de desinfetar os túbulos dentinários independente da técnica de preparo do canal utilizada (BERBER *et al.*, 2006). Também foi demonstrado que a técnica de preparo e o sistema de irrigação utilizado no tratamento endodôntico interferem na ação antimicrobiana do hipoclorito (VAN DER SLUIS *et al.*, 2007; PLOTINO *et al.*, 2007; ALVES *et al.*, 2011; BEUS, *et al.*, 2012). No estudo de Alves *et al.*, (2011) a utilização do sistema de limas autoajustáveis (SAF - *Self-Adjusting File* – ReDent-Nova, Ra'anana, Israel) com hipoclorito de sódio a 2,5% e 6% promoveu uma redução significativa na população de *Enterococcus faecalis* após dois minutos de ação dentro de canais, independente da concentração de hipoclorito, porém, resultados mais expressivos foram obtidos após seis minutos de operação.

Entretanto, o hipoclorito de sódio apresenta algumas desvantagens, como corrosão dos instrumentos endodônticos, ineficácia contra alguns microrganismos quando utilizado em baixas concentrações e toxicidade aos tecidos periapicais quando em altas concentrações (SELTZER; FARBER, 1994; FERRAZ *et al.*, 2001). Além disso, o hipoclorito não atua na porção inorgânica do magma dentinário (SPANGBERG; ENGSTROM; LANGELAND, 1973). Torna-se necessária a utilização de uma solução quelante para uma eficaz remoção de *debris* e lama dentinária (ZEHNDER, 2006; HAAPASALO *et al.*, 2010).

Importa ressaltar que, *in vivo*, a presença de matéria orgânica (exsudato inflamatório, remanescentes teciduais, biomassa microbiana) consome o hipoclorito, diminuindo o seu efeito. Por isso a irrigação contínua e o tempo são fatores importantes na efetividade deste composto (HAAPASALO *et al.*, 2010).

O hipoclorito de sódio tem ação deletéria sobre os componentes orgânicos da dentina, especialmente o colágeno. Isto pode influenciar na penetração de monômeros resinosos através da estrutura da dentina desmineralizada (ISHIZUKA *et al.*, 2001). Ele se dissocia em cloreto de sódio e oxigênio. O oxigênio nascente causa uma forte inibição da polimerização na interface dos materiais adesivos (NIKAIDO *et al.*, 1999). Canais radiculares irrigados com hipoclorito de sódio a 5% apresentaram menor resistência de união compósito-dentina em comparação com os dentes controle (MORRIS *et al.*, 2001; RENOVATO *et al.*, 2013). Existe uma correlação entre o período de exposição da dentina ao hipoclorito e a força de adesão, de maneira tal que essa força aumenta à medida que diminui o tempo de exposição (ARI; YAŞAR; BELLÍ, 2003; SANTOS *et al.*, 2006). Também tem sido demonstrado, através de estudos *in vitro*, que a exposição por longo tempo da dentina ao hipoclorito de sódio em altas concentrações pode ter efeito deletério na elasticidade da dentina e tensão flexural (MARENDING *et al.*, 2007a; JOHN; LÖST; EL AYOUTI, 2013) podendo resultar na fratura dos dentes tratados endodonticamente (ZHANG *et al.*, 2010a). Isso foi confirmado no estudo de Mai *et al.*, (2010) em que verificaram que feixes de dentina expostos por 60 minutos a 5,25% de NaOCl tiveram sua tensão flexural significativamente diminuída quando comparada aos feixes expostos por 10 minutos nessa mesma solução e concluíram que esse fato coloca o dente em risco de fratura. O efeito deletério envolvendo as propriedades mecânicas da dentina, atribuído ao uso do hipoclorito de sódio,

depende da concentração e do tempo e não está associado com a desmineralização causada pelo uso do EDTA como irrigação final (ZHANG *et al.*, 2010a).

Embora existam estudos demonstrando que o hipoclorito de sódio também pode ser utilizado na forma de gel (ZAND *et al.*, 2010), é na forma de solução que tem sido amplamente utilizado.

A penetração do hipoclorito de sódio a 2,5% associado ao EDTA a 17%, ácido cítrico a 1% e ácido peracético a 1%, foi avaliada e os resultados demonstraram que essas soluções ácidas não aumentam a profundidade de penetração do NaOCl no interior da dentina (KUGA *et al.*, 2011).

A adição de cloreto de benzalcônio ao hipoclorito de sódio aumentou a sua capacidade de molhamento sem afetar a quantidade de cloro livre, a citotoxicidade ou as propriedades antimicrobianas da mistura (BUKIET *et al.*, 2012). A adição de surfactante à solução de hipoclorito não melhorou a sua capacidade dissolvente (CLARKSON *et al.*, 2012). Isso foi confirmado recentemente, em uma revisão sobre os efeitos da diminuição da tensão superficial das soluções de hipoclorito de sódio, na qual os autores sugerem que agentes surfactantes melhoram a penetração do hipoclorito de sódio no canal principal. Porém consideraram os dados insuficientes para tecer considerações sobre lubrificação, capacidade antimicrobiana e remoção de *debris* e lama dentinária (ROSSI-FEDELE *et al.*, 2013).

### **2.1.2 Clorexidina**

Nos últimos anos, tem ganhado popularidade, como substância química auxiliar no preparo dos canais radiculares, o gluconato de clorexidina (CHX). Além de efetivo agente antimicrobiano oral, possui amplo espectro de ação antimicrobiana, substantividade e baixa toxicidade como propriedades (FERRAZ *et al.*, 2001; VIANNA *et al.*, 2004). A clorexidina é uma base catiônica forte que é mais estável na forma de solução de gluconato de clorexidina. A propriedade da substantividade é decorrente da sua capacidade de adsorção às superfícies, ligando-se à hidroxiapatita, sendo lentamente liberada à medida que a concentração no meio decresce, permitindo assim um tempo de ação prolongado (LOPES; SIQUEIRA JR; ELIAS, 2004).

O estudo de Zamany, Safavi e Spångberg (2003) demonstrou que uma irrigação adicional com clorexidina a 2% resultou em aumento da desinfecção do sistema de canais radiculares, e que a clorexidina não causa erosão dentinária como

o NaOCl após a irrigação final com EDTA. Os autores consideraram a Clorexidina 2% uma boa escolha para maximizar o efeito antibacteriano ao final do preparo químico-mecânico.

Vianna *et al.* (2004) ao compararem *in vitro* a atividade antimicrobiana da clorexidina gel e solução (0,2%, 1% e 2%) com o NaOCl (0,5%, 1%, 2,5%, 4% e 5,25%), verificaram que ambas as soluções eliminaram *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia* em 15 segundos. Não houve diferença entre o tempo necessário pelo NaOCl 5,25% e pela solução de CHX a 1% e 2% em eliminar os microrganismos. O NaOCl 5,25% apresentou a maior eficácia antimicrobiana, seguido da solução de CHX 0,2%, 1% e 2% no mesmo nível e do gel de CHX 2%. Os autores relacionaram a ação antimicrobiana com o tipo, concentração e forma de apresentação da substância química, bem como com a suscetibilidade microbiana.

A desvantagem desta substância é que ela não atua como solvente orgânico (DAMETTO *et al.*, 2005), e isto afeta negativamente a sua capacidade antimicrobiana. Esses mesmos autores comprovaram a permanência da ação antibacteriana da clorexidina após a conclusão do preparo do canal, onde observaram *in vitro* que a mesma, independente da sua apresentação, manteve-se ativa ao término do período experimental de 7 dias. A atividade da clorexidina, similar a outros desinfetantes endodônticos, depende do pH que é fortemente reduzido na presença de matéria orgânica. Se por um lado a presença de matéria orgânica residual pode afetar negativamente a qualidade do selamento pelo material obturador, por outro, a clorexidina não apresenta efeitos sobre a adesão dentinária (SANTOS *et al.*, 2006) e não causa erosão da dentina (HAAPASALO *et al.*, 2010).

A clorexidina tem sido utilizada em várias concentrações (0,12 a 2%), na forma de solução aquosa ou gel. Estudos relacionados observaram que o gel utilizado como substância química auxiliar apresentou ação antimicrobiana contra *Enterococcus faecalis* e, devido à sua viscosidade, proporcionou uma boa limpeza mecânica do sistema de canais radiculares (FERRAZ *et al.*, 2001). Foi demonstrado que a clorexidina a 2% tem eficácia antimicrobiana similar a do hipoclorito de sódio a 5,25%, por isso essa é a concentração de clorexidina mais comumente usada em endodontia (VIANNA *et al.*, 2004). Quando comparada à doxícilina, outro agente antimicrobiano que também apresenta substantividade, a clorexidina demonstrou ser mais estável na dentina radicular (RASIMICK *et al.*, 2010). Tanto o gel, quanto a

solução de clorexidina podem permanecer no canal radicular por mais de 90 dias (SOUZA *et al.*, 2012). A substantividade antimicrobiana da clorexidina a 2% parece ser maior que a do surfactante catiônico Cetrimide a 0,2% e essa propriedade está diretamente relacionada com a concentração (BACA *et al.*, 2012). Porém, a substantividade contra *Enterococcus faecalis* da clorexidina a 0,5% e a 2% foi menor quando comparada com a de um desinfetante similar, a Alexidina a 1% e 2% (BARRIOS, *et al.*, 2013).

Rôças e Siqueira Jr. (2011), usando microbiologia molecular, compararam a eficácia *in vivo* da ação antimicrobiana da clorexidina e do hipoclorito de sódio, usados como soluções irrigadoras intracanal. Verificaram que ambas promoveram uma significativa redução na taxa de bactérias nos canais infectados sem diferença significativa entre as duas soluções. Esse resultado também foi observado através de microscopia confocal e ainda demonstrado que as bactérias dos biofilmes jovens são mais facilmente eliminadas do que aquelas dos biofilmes já estabelecidos (WANG; SHEN; HAAPASALO, 2012).

Poucos trabalhos discorrem a respeito da influência do uso da clorexidina na forma gel sobre a estrutura da dentina e, conseqüentemente, sua relação com a força de adesão após o término do tratamento endodôntico. O gel de clorexidina foi considerado compatível com os procedimentos restauradores adesivos, pois não apresentou efeito adverso na adesão de um sistema adesivo autocondicionante (SANTOS *et al.*, 2006). O estudo de Oliveira *et al.* (2007) demonstrou que tanto o hipoclorito de sódio a 1% quanto a solução clorexidina a 2% reduziram significativamente a microdureza da dentina. A respeito da inter-relação entre a dentina tratada e os cimentos endodônticos, foi demonstrado que a remoção da lama dentinária e irrigação final com clorexidina favorecem a umectação da dentina pelos cimentos endodônticos AH Plus (Dentsply, Petrópolis, RJ, Brasil) e Real Seal SE (SybronEndo, Orange, CA). Nesse mesmo estudo os autores consideraram que a umectação da dentina por diferentes cimentos depende da solução utilizada e da remoção de lama dentinária (ASSIS *et al.*, 2011).

### **2.1.3 EDTA**

Em 1957, Ostby, indicou a solução salina de etilenodiamino tetracético dissódico (EDTA) para a instrumentação de canais atrésicos. Esse sal, derivado de um ácido fraco, é capaz de promover a quelação de íons cálcio da dentina em pH

alcalino (LOPES; SIQUEIRA JR; ELIAS, 2004). Esta solução quelante é mais comumente utilizada como uma solução neutralizada a 17% (EDTA dissódico, pH 7). O EDTA dissolve material inorgânico inclusive hidroxiapatita, dessa forma auxiliando à remoção do magma dentinário e preparando as paredes dos canais radiculares para uma melhor adaptação dos materiais obturadores. Para uma remoção efetiva dos componentes orgânicos e inorgânicos do magma dentinário, a associação do EDTA ao hipoclorito de sódio foi sugerida (ZEHNDER, 2006; HAAPASALO *et al.*, 2010). Muitos estudos demonstram que a remoção da lama dentinária melhora o selamento tridimensional do sistema de canais radiculares, independente da técnica de obturação ou cimento obturador (SHAHRAVAN *et al.*, 2007). A remoção incompleta da lama dentinária no terço apical do canal pode prejudicar a performance dos cimentos autoadesivos (BABB *et al.*, 2009; HASHEN *et al.*, 2009). A remoção da lama dentinária também é necessária para a desinfecção do sistema de canais radiculares (ZEHNDER *et al.*, 2005; WANG; SHEN; HAAPASALO, 2013).

Existe uma tendência de se encontrar as mesmas características de debridamento nas áreas apical, média e cervical do canal. Entretanto a anatomia do canal, a forma de liberação do irrigante, o tempo de irrigação e o seu volume interferem ativamente em se alcançar uma remoção completa em todo o canal (TEIXEIRA; FELIPPE; FELIPPE, 2005; SEDGLEY *et al.*, 2005; MELLO; COIL; ANTONIAZZI, 2009).

Foi demonstrado que o curto período de exposição da dentina ao EDTA, como é usado clinicamente não afeta suas propriedades mecânicas, independente da sequência de irrigação usada (MARENDING, *et al.*, 2007b). Outro estudo revelou, através de MEV, áreas de desmineralização na dentina bovina quando o EDTA a 17% foi usado sozinho ou associado a outras substâncias (MOREIRA *et al.*, 2009). Concentrações baixas de EDTA, como EDTA a 1%, apresentaram remoção eficaz da lama dentinária e foram recomendadas para uso clínico no sentido de evitar erosão excessiva da dentina radicular (ŞEM; ERTÜK; PIŞKIN, 2009). Já Spanó *et al.* (2009) utilizando espectrometria de absorção atômica e microscopia eletrônica de varredura para avaliar a concentração de íons cálcio e remoção de lama dentinária com vários quelantes usados nos canais radiculares, verificaram que o EDTA a 15% resultou na maior concentração de íons cálcio seguido de ácido cítrico a 10%. Esses dois quelantes foram os mais eficazes na remoção de lama dentinária.

Segundo Mello *et al.* (2008) a irrigação com 5ml de EDTA a 17% por 3 minutos foi capaz de remover eficientemente o magma dentinário de todas as áreas das paredes do canal radicular. Mais tarde um estudo semelhante indicou que essa irrigação deve ser contínua para uma remoção mais eficaz da lama dentinária das paredes do canal radicular (MELLO *et al.*, 2010). Recentemente outra pesquisa demonstrou que a agitação do EDTA a 15% por vinte segundos com laser diodo 808 nm foi eficaz na remoção da lama dentinária do terço apical dos canais radiculares (ARSLAN *et al.*, 2013). De acordo com as pesquisas é possível perceber que alguns fatores contribuem para a eficácia da ação quelante do EDTA, como a concentração, o fluxo, o tempo e o sistema de irrigação utilizado (MELLO *et al.*, 2010; ADIGÜZEL *et al.*, 2011; ARSLAN *et al.*, 2013).

Quando o EDTA foi comparado ao MTAD (Doxiciclina a 3%, ácido cítrico a 4,25% e detergente polissorbato 80 a 0,5%) na remoção de lama dentinária e *debris* usando limas autoajustáveis do sistema SAF, ambos foram eficazes em todos os terços dos canais radiculares (ADIGÜZEL *et al.*, 2011). Outro estudo *in vitro* comparou a capacidade de descalcificação de cinco soluções irrigadoras, EDTA a 17%, MTAD, Tetraclean (Ogna Laboratory Farmaceutici, Milano, Italy), Tubuliclean (Ogna Laboratory Farmaceutici, Muggiò, Italy) e Largal Ultra (Septodont, Saint-Maur-des-fossés, France). Os resultados mostraram que o Tetraclean, essa solução a base de ácido cítrico, teve significativamente maior capacidade de descalcificação e indicaram que pode ser aplicada para obter remoção mais eficaz de lama dentinária e facilitar a instrumentação biomecânica dos canais radiculares (POGGIO *et al.* 2012). Outro exemplo de solução irrigadora com atividade antimicrobiana e de remoção de lama dentinária, é o QMIX (Dentsply Tulsa Dental, Tulsa, OK), que consiste na mistura do agente antimicrobiano bisbiguanida, do quelante de cálcio, o ácido poliaminocarboxílico, de soro fisiológico e de um surfactante. Em condições laboratoriais para eliminar *E. faecalis*, o QMIX e o NaOCl foram superiores à clorexidina e MTAD. E a capacidade de remover lama dentinária do QMIX foi comparável à do EDTA a 17% (STOJICIC *et al.*, 2011). Outra pesquisa comparou NaOCl a 2% e 6%, clorexidina a 2%, EDTA a 17% e QMIX e combinações entre eles. Os resultados demonstraram que a lama dentinária reduz a eficácia dos agentes desinfetantes contra o *E. faecalis* e que soluções contendo hipoclorito de sódio a 6% e/ou QMIX tiveram maior atividade antimicrobiana (WANG; SHEN; HAAPASALO, 2013). Recentemente um estudo comparou através de microscopia

eletrônica de varredura a eficácia de outra solução à base de EDTA a 17% com um surfactante, o Smear Clear (Sybron Endo, Orange, CA) com e sem a utilização de uma escova rotatória de canal, Canal-Brush (Coltène Whaledent GmbH+ Co KG, Langenau, Germany) na remoção de lama dentinária e *debris* de canais radiculares instrumentados com WaveOne e ProTaper. Os resultados mostraram que a escova rotatória de canal, juntamente como sistema WaveOne promoveu paredes mais limpas (KAMEL; KATAIA, 2014).

#### **2.1.4 Interações das soluções irrigadoras**

As associações das soluções irrigadoras são necessárias, visto que nenhuma solução preenche todos os requisitos ideais de atuação no interior dos canais radiculares durante o seu preparo. Precisamos lançar mão de um agente antimicrobiano potente, um dissolvente orgânico e um dissolvente inorgânico.

O hipoclorito de sódio é considerado o irrigante endodôntico indispensável, pois é o único que dissolve tecido orgânico, necrótico ou não, é um antisséptico eficaz e é minimamente cáustico em baixas concentrações. Entretanto ele não tem ação sobre os componentes inorgânicos da lama dentinária, que pode bloquear a entrada dos túbulos dentinários e proteger os microrganismos da ação dos antissépticos (ZEHNDER *et al.*, 2005). Torna-se necessário associar agentes quelantes de íons cálcio como EDTA e ácido cítrico, que são usados alternadamente com o NaOCl para remover a lama dentinária (ZEHNDER *et al.*, 2005; SOARES *et al.*, 2010; HAAPASALO, *et al.*, 2010). Hipoclorito de sódio e EDTA são as soluções irrigadoras mais comumente utilizadas. Como eles apresentam características e atividades diferentes, tentativas foram feitas para utilizá-los como uma mistura (ZEHNDER *et al.*, 2005). Entretanto, é sabido que a mistura do EDTA com hipoclorito de sódio reduz instantaneamente o cloro disponível na solução, resultando na perda da atividade do hipoclorito contra microrganismos e tecido necrótico (ZENDER *et al.*, 2005; SÓ *et al.*, 2011; ROSSI-FEDELE *et al.*, 2012). Já a adição de detergentes, como o cetrímídio (CTR) a 0,1% nas soluções desinfetantes, como o NaOCl a 2%, CHX e solução de iodeto iodado de potássio (IPI) a 2/4% aumentou o efeito antibacteriano destas soluções, contra *E. faecalis* nos túbulos dentinários (WANG *et al.*, 2012). As bactérias que se encontram em biofilmes estabilizados isto, é, de mais de 3 semanas são mais dificilmente eliminadas pelos agentes desinfetantes do que as bactérias em biofilmes jovens, de um dia. Um

estudo comparando a eficácia de algumas soluções desinfetantes contra biofilmes jovens, de um dia, e antigos, de três semanas, de *E. faecalis*, utilizando microscopia eletrônica a laser confocal, demonstrou que nos biofilmes antigos o NaOCl a 6% foi o mais eficaz, seguido pelo QMIX na eliminação de bactérias. Contra os biofilmes jovens o NaOCl a 6% e o QMIX foram os mais eficazes. A eficácia da CHX a 2% foi comparável a do NaOCl a 2% (WANG; SHEN; HAAPASALO, 2012).

O regime de irrigação baseado no uso alternado de NaOCl e EDTA, foi sugerido porque promoveu a eliminação do biofilme de *E. faecalis* durante todo o período do experimento que compreendeu três avaliações: imediatamente, 5 dias e 14 dias após o preparo químico-cirúrgico dos canais de raízes contaminadas (SOARES *et al.*, 2010). A solução de etidronato a 18% (HEBP), ao contrário do EDTA, não diminui o efeito antimicrobiano do NaOCl, entretanto promoveu maior desvio apical que o EDTA (SILVA E SOUZA *et al.*, 2014).

Outro estudo avaliou a eficácia antibacteriana de soluções irrigadoras e suas combinações em canais contaminados com *E. faecalis*. Foram testados NaOCl a 2,5% isoladamente, misturado com ácido cítrico e com vinagre de maçã, vinagre de maçã isoladamente, clorexidina a 2% e ácido peracético. Os resultados mostraram que todas as soluções promoveram a redução na contagem de bactérias, porém o hipoclorito isoladamente, a clorexidina e o ácido peracético tiveram as contagens mais baixas. Os autores concluíram que as soluções irrigadoras podem apresentar atividade, mas não erradicar o *E. faecalis* no interior do sistema de canais radiculares (DORNELLES-MORGENTAL *et al.*, 2011).

Além disso, o EDTA pode, juntamente com o NaOCl, modificar a estrutura dentinária e, conseqüentemente, suas propriedades físicas e mecânicas, através da excessiva desmineralização da porção inorgânica (ÇALT; SERPER, 2002; ARI; ERDERMIR, 2005; GRANDE *et al.*, 2006). Foi demonstrado que a microdureza da dentina diminuiu e a rugosidade aumentou na presença de NaOCl a 2,5% e EDTA a 17% (ARI; ERDERMIR; BELLI, 2004). Uma vez que a estrutura dentinária radicular é o substrato para a obturação do canal, a necessidade de assegurar um selamento tridimensional do canal radicular tem direcionado pesquisas no sentido de preservar a estrutura dental (GRANDE *et al.*, 2006; MARENDING *et al.*, 2007 (a e b); BUI; BAUMGARTEN; MITCHEL, 2008; CECCHIN *et al.*, 2010; MAI *et al.*, 2010; ZHANG, *et al.*, 2010a). Foi demonstrado que uma curta exposição da dentina ao EDTA, como é recomendado clinicamente, não afeta o seu módulo de elasticidade e a tensão

flexural independentemente da sequência de irrigantes utilizada (MARENDING *et al.*, 2007b). O efeito do NaOCl sobre as propriedades mecânicas com a dissolução dos componentes orgânicos da dentina depende da sua concentração (MARENDING *et al.*, 2007a).

A força de microtração de um sistema auto-adesivo (XENO III – Dentsply DeTrey; Konstanz, Germany), foi maior quando foi usado apenas NaOCl a 1% do que quando associado ao EDTA a 17%. A combinação dessas duas soluções produziu força de união similar ao da dentina não tratada (CECCHIN *et al.*, 2010).

A tensão flexural de fragmentos de dentina expostos por 60 minutos ao NaOCl a 5,25% antes de dois minutos de exposição ao EDTA a 17% foi significativamente menor do que aquela dos fragmentos expostos por apenas dez minutos ao NaOCl a 5,25% antes do EDTA a 17%. Isso provou que a aparente agressividade do EDTA em causar erosão das paredes dentinárias, demonstrada através de microscopia eletrônica de transmissão, é atribuída ao prolongado uso do hipoclorito de sódio e que a ação sinérgica entre hipoclorito e EDTA pode resultar em dentes tratados mais suscetíveis a fratura vertical. Os autores advertiram que a aplicação de hipoclorito por um período de 60 minutos não deve ser visto como um uso de maior zelo do desinfetante (MAI *et al.*, 2010).

Outro estudo avaliou os efeitos de diferentes concentrações e períodos de contato de NaOCl na remoção da fase orgânica da dentina mineralizada, com e sem o uso coadjuvante de EDTA e o efeito das concentrações de hipoclorito na erosão das paredes dos canais após o uso do EDTA como irrigante final ativo. Os autores concluíram que o efeito destrutivo do NaOCl na dentina mineralizada é irreversível e está presente independentemente se o EDTA é empregado subsequentemente na irrigação final ativa. O EDTA remove a fase de hidroxiapatita depletada do colágeno para expor a camada subjacente, causa de destruição que é morfológicamente percebida como erosão das paredes do canal (ZHANG *et al.*, 2010a).

Com o objetivo de avaliar o efeito da clorexidina na ação de descalcificação do EDTA, foi misturado 1% de clorexidina ao EDTA a 17% e ao ácido cítrico a 10% e a 20%. Foi verificado que 1% de clorexidina não modificou a capacidade de desmineralização destas soluções e que o EDTA, nos primeiros três minutos removeu significativamente mais cálcio que as demais soluções (GONZÁLEZ-LOPEZ *et al.*, 2006). Ao invés de sofrer uma reação química, a clorexidina forma um sal com o EDTA (RASIMICK *et al.*, 2008). A mistura do EDTA com a clorexidina provoca a

formação de um precipitado branco leitoso cujas propriedades ainda não estão completamente esclarecidas, mas sabe-se que a capacidade de remoção do magma dentinário fica diminuída. Considerando que as principais soluções irrigadoras não podem ser misturadas, sem perda de sua atividade ou formação de produtos potencialmente tóxicos, o EDTA é indicado para irrigação final após o preparo com NaOCl (HAAPASALO *et al.*, 2010).

Como a clorexidina não dissolve matéria orgânica, mas possui a propriedade de substantividade que o hipoclorito não tem, esforços foram feitos para combinar clorexidina com hipoclorito de sódio, no entanto estas duas substâncias não são solúveis entre si, de maneira que um precipitado marrom-alaranjado é formado quando são misturadas (MARCHESAN *et al.*, 2007; BASRANI *et al.*, 2007; THOMAS; SEM, 2010; NOWICKI; SEM, 2011). Esse precipitado tende a ocluir os túbulos dentinários (BUI; BAUMGARTEN; MITCHELL, 2008) e interferir na estética do dente (MARCHESAN *et al.*, 2007). Além de interferir na limpeza da dentina, a presença da paracloroanilina (PCA), que tem potencial mutagênico, foi demonstrada nesse precipitado (BASRANI *et al.*, 2007 e 2010).

No entanto, estudos mais recentes, através de espectroscopia de ressonância magnética nuclear, demonstraram que o precipitado formado a partir da mistura do NaOCl com CHX não é paracloroanilina. Ele é composto de, ao menos, duas moléculas separadas, ambas menores em tamanho que a clorexidina e derivadas desta, que são paraclorofeniluréia (PCU) e a paraclorofenilguanidil-1, 6-diguanidilhexane (PCGH), sendo que nenhum destes é paracloroanilina, mas são relacionados, pois são compostos parasubstitutos de benzeno (THOMAS; SEM, 2010; NOWICKI; SEM, 2011). Estudos têm sido feitos no sentido de indicar um regime de irrigação que possa aproveitar ao máximo as propriedades das soluções sem comprometimento de outras (THOMAS; SEM, 2010; NOWICKI; SEM, 2011).

Rossi-Fedele *et al.* (2012) em uma extensa revisão de literatura, usando a base de dados Medline, indicaram estratégias preventivas a serem utilizadas durante a irrigação do sistema de canais radiculares. Para a utilização de NaOCl e EDTA, foi indicada a irrigação copiosa com NaOCl, certificando-se de que as trocas ocorram em todos os níveis do canal, para evitar a estratificação das soluções ao longo do canal, que poderia levar a diferentes misturas em diferentes níveis do canal. Indicaram, também, aspirar ou secar o canal antes da colocação do próximo irrigante. No caso de NaOCl e CHX, para prevenir a formação de precipitado, a

irrigação com soluções intermediárias, que pode ser soro, água, álcool, álcool isopropílico, ou uma solução desmineralizadora, como ácido cítrico ou EDTA, após o NaOCl foi sugerida. E, caso o floculado se forme, o ácido acético pode ser usado para dissolver o precipitado. Para a utilização de CHX e agentes quelantes, o ácido cítrico pode ser usado em associação com a CHX porque não ocorre interação. Alternativamente o ácido maleico pode ser usado porque não provoca formação de precipitado, apenas uma redução marginal da disponibilidade de CHX. Os autores concluíram que os agentes quelantes tem efeito dramático sobre o cloro livre disponível do NaOCl e, conseqüentemente, sobre sua capacidade de dissolução de tecido, enquanto o seu efeito antimicrobiano é reduzido apenas quando a concentração inicial de NaOCl é baixa. EDTA e CA não sofrem redução da capacidade de quelação quando misturados ao NaOCl.

O tratamento com EDTA mais NaOCl por um minuto, foi a melhor combinação tanto para a dentina radicular jovem, de pacientes com menos de 30 anos, quanto para a dentina idosa, de pacientes com mais de 60 anos, pois não alterou significativamente a estrutura química e ultramorfológica. Assim, foi considerado desnecessário estender o tempo de tratamento de EDTA e NaOCl além de um minuto, pois promove uma excessiva desmineralização e erosão e, por isso, deveria ser evitado (OZDEMIR *et al.*, 2012). Da mesma forma, foi demonstrado que o uso prolongado do EDTA a 17% aumenta o risco de fratura radicular. Então foi sugerido que a concentração do EDTA deveria ser mais baixa, em torno de 5%, quando o tempo de sua utilização fosse maior, isto é, por mais de 10 minutos (UZUNOGLU *et al.*, 2012). Também a utilização de surfactantes em concentração superior a 0,25% associado ao EDTA é questionável para uso clínico, pois reduz a microdureza das camadas mais superficiais da luz do canal radicular e pode comprometer o prognóstico do tratamento endodôntico. Portanto, quando for utilizada a associação de EDTA com surfactante, como o cetrimídio, este deve ter a concentração de até 0,25% (ACKAY; SEN, 2012).

## **2.2 Ativação ultrassônica**

Para a irrigação em Endodontia, atualmente dispomos do sistema manual e dos sistemas mecânicos. No sistema manual é utilizada uma seringa com agulha de pequeno calibre em que o líquido é liberado fazendo uma pressão positiva sobre as paredes do canal. É importante que concomitante com a irrigação seja feita a

aspiração na embocadura do canal para melhor movimentação da solução irrigadora, tornando a limpeza mais efetiva.

Nos sistemas mecânicos são empregados dispositivos de irrigação que usam pressão apical negativa (ANP), aparelhos sônicos e ultrassônicos que promovem a agitação mecânica da substância química no interior do canal, possibilitando maior limpeza.

Dentre os sistemas sônicos, o sistema Vibringe (Cavex Holland BV, Haarlem, The Netherlands) foi comparado à uma agulha de irrigação com abertura lateral para a remoção de *debris* no istmo da raiz méso-vestibular de molares superiores. Os resultados mostraram que não ocorreu diferença entre os dois sistemas (JOHNSON *et al.*, 2012).

A irrigação ultrassônica tem sido utilizada em Endodontia desde a década de 90 e resultados têm se mostrado promissores na limpeza dos canais radiculares (CHEUNG; STOCK, 1993).

Os aparelhos ultrassônicos apresentam movimentos oscilatórios e vibram em uma frequência acima de 25.000 ciclos. A energia ultrassônica provoca a formação de uma micro-corrente acústica que é a circulação da solução irrigadora em torno do instrumento endodôntico ativado no interior do canal radicular. Além disso, um maior volume de solução irrigadora é usado durante a irrigação-aspiração do canal radicular, resultando em limpeza mais eficaz (LOPES; SIQUEIRA JR; ELIAS, 2004).

A irrigação ultrassônica pode ser feita com ou sem a instrumentação ultrassônica simultânea. A chamada irrigação ultrassônica passiva é aquela em que o instrumento endodôntico com espiras ou liso de pequeno calibre (tamanho de #10 – 20) oscila livremente no canal sem promover desgaste nas paredes. Essa irrigação passiva promove maior limpeza do que aquela com instrumentação simultânea, assim como um instrumento liso é mais efetivo do que uma lima de corte. A conicidade e o diâmetro do canal influenciam na eficácia da remoção de *debris*, assim como, o tipo de solução irrigadora, sendo o hipoclorito de sódio mais efetivo do que a água carbonatada ou destilada. A irrigação ultrassônica passiva pode ser um importante auxiliar na irrigação do sistema de canais radiculares (VAN DER SLUIS *et al.*, 2007 e 2010). O fluxo de irrigação pode ser contínuo, em que a solução parte direto da peça de mão, ou intermitente, em que a solução é dispensada manualmente através de seringa. Esse último método permite um controle maior do volume e do fluxo de irrigante (GOEL; TEWARI, 2009). Entretanto ambos foram

igualmente eficazes em remover *debris* dentinários de sulcos artificiais preparados no terço apical de canais radiculares (VAN DER SLUIS *et al.*, 2006).

Com o intuito de avaliar a capacidade de remoção da lama dentinária por diferentes soluções irrigadoras, com ativação ultrassônica através de uma lima endodôntica número 15 levada contra as paredes dos canais com movimentos de pequena amplitude, Guerisoli *et al.* (2002) verificaram que o NaOCl 1% associado ao EDTAC a 15%, que consiste na mistura de EDTA com o surfactante catiônico brometo de cetil-trimetil amônio, o Cetavlon, removeu a lama dentinária, enquanto que a água destilada e o NaOCl 1%, isoladamente, não removeram.

Mayer, Peters e Barbakow (2002) avaliaram através de microscopia eletrônica de varredura os efeitos da instrumentação rotatória com os sistemas Profile.04 e Lightspeed e irrigação ultrassônica sobre os escores de *debris* e magma dentinário. Verificaram que os irrigantes NaOCl 5,25% e EDTA 17%, usados alternadamente e ativados ultrassonicamente, não tiveram redução nesses escores. Esses achados não foram influenciados pelo material tampouco pelo *design* do instrumento usado para transmitir a ativação ultrassônica.

Com o objetivo de comparar a capacidade da seringa de irrigação e a irrigação ultrassônica em remover *debris* dentinários artificialmente colocados em irregularidades simuladas de canais radiculares, Lee, Wu e Wesselink (2004) prepararam 20 caninos, dividiram em 2 metades e obtiveram imagens usando microscópio e câmera digital. Concluíram que a irrigação ultrassônica foi mais efetiva que a seringa de irrigação na remoção de *debris* colocados em extensões e irregularidades não instrumentadas simuladas em canais amplos e retos.

Para Plotino *et al.* (2007) a utilização do ultrassom na Endodontia tem melhorado a qualidade total do tratamento endodôntico e tem sido um importante auxiliar no tratamento de casos mais complexos, pois aumenta a ação das soluções irrigadoras no interior dos canais radiculares.

A ativação ultrassônica passiva por um minuto com EDTA 17% seguido de irrigação final com NaOCl removeu significativamente mais lama dentinária na região apical do canal do que sem essa ativação, entretanto a utilização do ultrassom é dificultada nos dois milímetros apicais dos canais curvos principalmente (LUI; KUAH; CHEN, 2007).

Comparando dois sistemas de ativação das soluções irrigadoras, Chopra, Murray e Namerow (2008) verificaram que o efeito da ativação ultrassônica pareceu

ser autolimitante pelo grande fluxo do irrigante e atribuíram à presença do EDTA a capacidade de remoção de magma dentinário. Quando da utilização de medicação a base de hidróxido de cálcio, o preparo do canal radicular e a remoção da lama dentinária com o ultrassom promoveu uma maior difusão de íons cálcio e hidroxila a partir da medicação intracanal (ZAMPRONIO *et al.*, 2008).

Kuah *et al.* (2009) avaliaram *in vitro* a eficácia do EDTA a 17% em remover lama dentinária e *debris* e verificaram que um minuto de aplicação do uso combinado de ultrassom e EDTA foi eficaz na região apical do canal radicular. E não encontraram diferença entre os grupos que o utilizaram por um ou três minutos de ativação ultrassônica seguidos por uma irrigação final de NaOCl 1%.

Outro estudo que utilizou microscopia eletrônica de varredura, comparou a capacidade de remoção de lama dentinária através do uso contínuo ou intermitente do ultrassom com uma seringa de irrigação com agulha 30-gauge acoplada colocada a 1mm do comprimento de trabalho e com uma seringa 30-gauge recoberta por uma escova (Navitip FX, Ultradent, South Jordan, UT). Os resultados mostraram que tanto a agulha de irrigação recoberta com escova como a ativação ultrassônica intermitente foi eficaz na remoção da lama dentinária do terço apical dos canais (GOEL; TEWARI, 2009).

Também Rödning *et al.* (2010), verificaram que a irrigação ultrassônica foi mais efetiva que a irrigação com seringa ou com o RinsEndo (Dürr Dental, Bietigheim, Germany), que consiste na irrigação combinada com sucção sob pressão hidrodinâmica, na remoção de *debris* do interior de canais artificiais. A irrigação ultrassônica passiva melhorou a penetração das soluções irrigadoras no terço apical dos canais radiculares inclusive de canais laterais (GREGÓRIO *et al.*, 2010) e secundários (RÖDING *et al.*, 2010). A ativação ultrassônica do hipoclorito de sódio combinada com o método de fluxo intermitente com três ativações/repouso de 20 segundos cada, promoveu maior limpeza dos canais radiculares (VAN DER SLUIS *et al.*, 2010). Um estudo semelhante demonstrou que a ativação ultrassônica passiva com uma pulsação padrão de 400 milisegundos ativada/ 400 milisegundos desativada e um ciclo de trabalho de 50% foi mais efetiva na remoção de *debris* dentinários de uma extensão oval apical simulada do que a ativação ultrassônica contínua (JIANG *et al.*, 2010b). Em canais laterais simulados em dentes extraídos, a irrigação ultrassônica contínua, utilizando a agulha ProUltra PiezoFlow (Dentsply, Tulsa Dental Specialities, Tulsa, OK) como irrigação final significativamente

melhorou a penetração da solução irrigadora no interior de canais laterais simulados quando comparada com a irrigação ultrassônica passiva (Irri-Safe, Satelec, Acteón Group, Merignac Cedex, France) (CASTELO-BAZ *et al.*, 2012).

Foi demonstrado que manter a patência apical com lima K #10 e então usar a ativação ultrassônica passiva aumentou o fornecimento da solução irrigadora no terço apical dos canais radiculares (VERA; ARIAS; ROMERO, 2011). O sistema de irrigação ultrassônica contínua VPro StreamClean System (Vista Dental Products, Racine, WI) testado por Curtis e Sedgley (2012), resultou no terço apical de canais radiculares significativamente mais livres de *debris* do que agulha de irrigação convencional. Jiang *et al.* (2012), demonstraram que a irrigação ultrassônica contínua foi mais eficaz na remoção de *debris* dentinários de irregularidades apicais do que a ativação manual dinâmica. A lima oscilante ultrassônica pode remover *debris* dentinários por mais de 3mm além de sua ponta, coincidindo com a extensão do fluxo observada. A curvatura do canal não influenciou no fluxo do irrigante (MALKI *et al.*, 2012). Da mesma forma as variações de conicidade do canal radicular não afetaram a capacidade da irrigação ultrassônica passiva em alcançar o comprimento de trabalho em canais curvos (MERINO *et al.*, 2013). Quando avaliadas eficácia e segurança de vários dispositivos de irrigação ativa, a irrigação ultrassônica passiva, o EndoVac e agulha de irrigação ultrassônica usada com o modo de injeção e no modo de aspiração, a aspiração através da agulha de irrigação ultrassônica foi o sistema que melhor conciliou eficácia e segurança (MALENTACCA *et al.*, 2012).

Alguns estudos demonstraram que a ativação ultrassônica passiva foi semelhante a outros sistemas de irrigação na limpeza dos canais radiculares (MUNHOZ; CAMACHO-QUADRA, 2012). As irrigações sônica e ultrassônica resultaram em melhor remoção de lama dentinária no terço apical de canais radiculares curvos do que a irrigação convencional (BLANK-GONÇALVES *et al.*, 2011).

O estudo de Saber e Hashem (2011) demonstrou que a ativação final da solução irrigadora com os métodos de pressão apical negativa, utilizando o EndoVac e agitação manual dinâmica resultaram em melhor remoção da lama dentinária que a irrigação ultrassônica passiva e irrigação passiva. Kanter *et al.* (2011) verificaram que a ativação sônica através do EndoActivator (Advanced Endodontics, Santa Barbara, CA) promoveu melhor obturação de canais laterais e acessórios e resultou

em melhor remoção de *debris* dos canais radiculares e mais túbulos dentinários abertos do que a ativação ultrassônica contínua, ambas por um minuto. Foi considerado que uma menor frequência de operação, como aquela dos aparelhos sônicos, produz menor cisalhamento, que causa menor modificação nas paredes dos canais. Também Mancini *et al.* (2013) encontraram melhores resultados na limpeza do canal e remoção de lama dentinária, com o uso do EndoActivator e com o EndoVac quando comparados à técnica de irrigação ultrassônica passiva.

Quanto ao efeito antimicrobiano da irrigação ultrassônica, estudos tem demonstrado que pode auxiliar, pelo fato de levar a solução mais profundamente na dentina e de limpar mais, porém nenhum método é totalmente eficaz na eliminação do biofilme bacteriano do sistema de canais radiculares (CASE *et al.*, 2012; PAIVA *et al.*, 2012; BEUS *et al.*, 2012; HALFORD *et al.*, 2012).

Recentemente um ensaio clínico randomizado foi realizado para comparar os resultados dos tratamentos endodônticos realizados em dentes com necrose e lesão periapical, com e sem a ativação ultrassônica da solução irrigadora. Foi concluído que a cura das lesões ocorreu independentemente se houve ou não ativação ultrassônica (LIANG *et al.*, 2013).

### **2.3 Avaliação da ultraestrutura dentinária através da microscopia eletrônica**

Estudos sobre a ultraestrutura dentinária foram inicialmente desenvolvidos na área da Dentística Restauradora, utilizando microscópio eletrônico de varredura (MEV) e de transmissão (MET). Thomas e Payne (1983) examinaram ultraestruturalmente, através de MET, diferentes regiões da dentina coronária de pré-molares humanos para determinar o conteúdo dos túbulos dentinários. Os autores verificaram que os processos odontoblásticos estavam limitados ao terço pulpar da dentina. Fibras e nervos não foram observados em nenhum túbulo examinado. Além disso, foi possível observar nitidamente a dentina intertubular e a peritubular.

Outro estudo comparou, através dos microscópios eletrônicos de varredura e de transmissão, os exames da ultraestrutura da zona de interdifusão dentina/resina. As eletromicrografias obtidas tanto ao microscópio eletrônico de varredura (MEV), quanto ao de transmissão (MET) forneceram informações visuais bem definidas sobre a ultraestrutura dentinária e ambos os exames confirmaram a existência da zona de interdifusão dentina/resina entre a dentina profunda inalterada e a

restauração de resina. Os autores consideraram que o condicionamento ácido prévio provavelmente causou a desnaturação das fibrilas de colágeno superficiais. (VAN MERBEEK *et al.*, 1993),

Moretto *et al.* (2011) avaliaram através de MEV e MET, os efeitos das alterações ultramorfológicas que ocorrem na adesão da dentina após o uso do laser. Verificaram através de MET, a presença de uma camada superficial das fibrilas colágenas desnaturadas. Através de MEV observaram a superfície dentinária apresentando um aspecto rugoso como efeito provocado pelo laser. Uma secção transversal dessa superfície hibridizada revelou um padrão de *tags* modificado, pois se apresentavam circundados por estruturas em forma de anel. Os autores concluíram, através deste estudo *in vitro*, que a irradiação por laser *erbium* interage com os tecidos duros resultando num padrão morfológico específico da dentina e fibrilas colágenas que afeta negativamente a força de adesão à resina composta.

Outro estudo utilizando MET comprovou a presença de uma camada intermediária de dentina levemente mineralizada, provando que no processo de mineralização da dentina, a pré-dentina não passa abruptamente para dentina mineralizada. Os dados desse estudo sugerem que a mineralização da dentina circumpulpar de incisivos de ratos se processa em etapas, de maneira transitória, iniciando pela deposição de cristais na matriz não colágena seguida pela massiva deposição mineral nas fibras colágenas no *front* de mineralização (AHMAD *et al.*, 2011).

Também na Endodontia os exames através de microscópio eletrônico de varredura e de transmissão são de grande valia para análise da ultraestrutura dentinária. Entretanto, a maioria dos estudos utiliza o microscópio de varredura, sendo escassos os estudos que se utilizam da microscopia eletrônica de transmissão em suas análises.

Quando ocorre uma modificação no padrão normal da tripla hélice característica dos feixes de colágeno, significa que está ocorrendo uma desorganização na sua estrutura macromolecular. Sabendo-se que esses feixes apresentam uma alta organização e orientação macromolecular (VIDAL; MELLO, 1987; VIDAL, 2003), torna-se interessante a observação dessas estruturas através do microscópio eletrônico de transmissão, como uma forma de avaliar e descrever possíveis alterações na matriz orgânica da dentina geradas pelo uso de substâncias químicas auxiliares. Essa técnica laboratorial traz informações sobre a ultraestrutura

e a organização molecular de células e tecidos (VIER-PELISSER *et al.*, 2007). A MET pode auxiliar na análise das alterações que ocorrem na matriz orgânica, ou seja, na estrutura do colágeno dentinário após o uso das substâncias químicas auxiliares do preparo do sistema de canais radiculares (MAI *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2010).

Já a microscopia eletrônica de varredura é um método que fornece informações bastante precisas para analisar a estrutura inorgânica da dentina e tem sido amplamente utilizado na Endodontia (VIER; FIGUEIREDO, 2002; ÇALT; SERPER, 2002; TEIXEIRA; FELIPPE; FELIPPE, 2005; ZEHNDER *et al.*, 2005; KUAH *et al.*, 2009; ŞEN; ERTÜRK; PIŞKIN, 2009; ZHANG *et al.*, 2010a). Através deste exame é possível verificar as condições da dentina antes e após a utilização das soluções irrigadoras.

Moreira *et al.* (2009) avaliaram o efeito de diferentes substâncias químicas auxiliares do tratamento endodôntico nas paredes dos canais radiculares de 60 dentes bovinos através de microscopia de luz polarizada (MLP) e de MEV. Concluíram que o hipoclorito de sódio a 5,25% associado ou não ao EDTA 17% causa alterações no colágeno dentinário. As imagens obtidas em MEV revelaram áreas de desmineralização nos grupos que usaram EDTA 17% individualmente ou associado a outras substâncias.

Hipoclorito a 0,5% foi a concentração recomendada para uso rotineiro durante o tratamento endodôntico para minimizar os danos causados pela desproteção da dentina. Os autores sugeriram aumentar o tempo de exposição da dentina ao NaOCl a 0,5% sem aumentar a sua concentração para obter um melhor efeito antimicrobiano, sem danificar a estrutura da dentina (HU *et al.*, 2010).

Qian, Shen e Haapasalo (2011) realizaram uma análise quantitativa através de MEV, do nível de erosão das paredes dentinárias dos canais radiculares, causado pela imersão em diferentes soluções irrigadoras em sequências alternativas. Blocos de dentina com 5 mm de porção média das raízes de oitenta e quatro dentes unirradiculares divididos em 5 grupos, foram tratados com NaOCl a 5%, EDTA a 17%, ácido etilenoglicoltetracético (EGTA) a 17% e ácido cítrico (CA) a 10% em sequências e tempos diversos. A análise mostrou erosão da dentina peri e intertubular quando o EDTA, EGTA e CA foram utilizados por um minuto seguidos de irrigação com NaOCl. A erosão foi severa quando o tempo dos agentes desmineralizantes e do hipoclorito foram aumentados. Em certas regiões túbulos

adjacentes se uniram e houve exposição de estruturas da superfície tubular, especialmente no grupo do CA e NaOCl. Não houve diferença significativa entre EDTA 17%, EGTA 17% e CA 10% por 5 minutos quando eles foram usados após o NaOCl. Entretanto, diferenças significativas entre eles foram medidas quando o NaOCl foi usado na irrigação final ( $P < 0.05$ ). Houve menor erosão no grupo do EGTA e NaOCl do que nos grupos EDTA NaOCl e CA NaOCl. Esse estudo demonstrou que a sequência de uso dos irrigantes endodônticos comuns constitui um fator determinante para o grau de erosão das paredes dentinárias dos canais radiculares.

Kuga *et al.* (2011) observaram através de microscopia eletrônica de varredura, que a utilização do sistema SAF com irrigação contínua e vibração foi efetivo na remoção da lama dentinária e causa mínima erosão dentinária se for usado hipoclorito de sódio e EDTA em baixas concentrações.

#### **2.4 Dentina radicular humana e bovina: aspectos estruturais**

A dentina é um tecido conjuntivo mineralizado permeado por um sistema de finos túbulos que atravessam toda a sua espessura, da polpa até a junção amelo-dentinária. A dentina circumpulpar constitui a maior parte da espessura total da dentina. Estruturalmente é constituída pela dentina peritubular e pela intertubular (DAI; TEM CATE; LIMEBACK, 1991).

A dentina peritubular constitui a parede dos túbulos dentinários, sendo hipermineralizada e pobre em colágeno quando comparada à intertubular. O mineral aparece na forma de pequenos cristais de hidroxiapatita deficientes em cálcio e ricos em carbonato que são muito cristalinos e cinco vezes mais duros que a dentina intertubular (PASHLEY, 1996). Devido a essa característica, a dentina peritubular, embora de fácil visualização pela MEV, não aparece nas preparações descalcificadas, dando a falsa impressão de uma maior espessura do espaço periodontoblástico e, conseqüentemente de um maior diâmetro dos túbulos dentinários. Por isso é difícil determinar a composição exata de sua matriz orgânica, havendo sido apenas observado que contém escassas fibrilas colágenas. Sua espessura é de aproximadamente 0,7  $\mu\text{m}$  junto ao limite amelodentinário, diminuindo em direção à polpa, alcançando 0,4  $\mu\text{m}$  próximo à pré-dentina. Sua formação ocorre durante toda a vida, podendo aumentar, por estímulos como a atrição, levando à

obliteração dos túbulos na extremidade mais externa (MARSHALL *et al.*, 1997; BERTASSONI; STANKOSKA; SWAIN, 2012).

A dentina intertubular constitui a maior parte do volume da dentina e possui a sua matriz orgânica constituída principalmente por fibras colágenas posicionadas perpendicularmente ao longo eixo dos túbulos dentinários, circundando-os ou dispostas irregularmente nas porções mais centrais (MARSHALL *et al.*, 1997; BERTASSONI; STANKOSKA; SWAIN, 2012).

As fibras colágenas são constituídas por agrupamentos filamentosos ou fibrilares da proteína colágeno, sendo as principais fibras do tecido conjuntivo. O colágeno é a proteína mais abundante da matriz extracelular. A molécula de colágeno é composta por três cadeias polipeptídicas, cadeias alfa, dispostas em tripla hélice. Existem cerca de 20 tipos diferentes de cadeias polipeptídicas de colágeno (cadeias  $\alpha$ ). O colágeno do tipo I representa 90% do total de colágeno presente no organismo e é o tipo encontrado na dentina e cimento. Essa fibra de colágeno tipo I é constituída por fibrilas que apresentam uma periodicidade de estriações de cerca de, 70 nm, densamente agrupadas em espessos feixes com 2 a 10  $\mu\text{m}$  de comprimento e birrefringentes com coloração amarela ou vermelha (MONTES; JUNQUEIRA, 1991). A molécula de colágeno tipo I é constituída por várias cadeias de tropocolágeno (com 280 nm de comprimento e 1,5 nm de diâmetro), que apresentam 2 cadeias alfa 1 (clara) idênticas entre si e uma cadeia alfa 2 (escura) (WALTIMO, 1996). Essa molécula constitui-se no arcabouço tridimensional para a deposição dos cristais de hidroxiapatita (JÁGR *et al.*, 2012).

Muitos estudos tem demonstrado que existem poucas diferenças entre dentes humanos e bovinos (SCHILKE *et al.*, 2000; SCHMALZ *et al.*, 2001; CAMARGO *et al.*, 2007). Stock *et al.* (2011) afirmaram que as características ultraestruturais da dentina humana e bovina são muito semelhantes de forma que o conhecimento sobre a ultraestrutura bovina fornece novos entendimentos para outros tecidos mineralizados.

Atualmente as políticas de saúde em Odontologia são orientadas para a prevenção e tratamento precoce da maioria das enfermidades, tais como cáries, doença periodontal e anomalias dentárias. Isso contribuiu para uma diminuição de dentes humanos extraídos livres de cáries. Em adição, os aspectos éticos que envolvem o uso de dentes humanos extraídos em trabalhos científicos têm limitado as pesquisas com esse tipo de amostra. Essa filosofia conservadora tem levado os

pesquisadores a poder contar cada vez menos com dentes humanos extraídos para suas pesquisas *in vitro* (CAMARGO *et al.*, 2007). Nesse contexto, uma alternativa para o problema, tem sido a utilização de dentes bovinos extraídos que são facilmente obtidos, apresentam um baixo índice de cárie e estão sendo utilizados em várias investigações (GONZÁLEZ-LÓPES *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2006; MOREIRA *et al.*, 2009; MOREIRA *et al.*, 2011; GRÜENDLING *et al.*, 2011; RENOVATO *et al.*, 2013).

Com base em uma pesquisa envolvendo dois ensaios clínicos randomizados utilizando um modelo de erosão dental que se aproxima da realidade clínica, os autores concluíram que o esmalte bovino é um substituto fidedigno do esmalte humano em modelos de erosão dental, enquanto que a dentina radicular bovina não parece ser uma alternativa viável ao tecido humano correspondente, pois a sua microdureza foi inferior a da dentina humana (TURSSI *et al.*, 2010).

Num outro estudo, em que foram utilizados seis fragmentos de 2mm do terço cervical para avaliar o efeito da Clorexidina sobre o efeito de descalcificação do ácido cítrico a 10% e a 20% e do EDTA a 17% a utilização de dentes bovinos foi vantajosa, pois o tamanho maior dos dentes bovinos em relação aos humanos facilitou a obtenção de fragmentos de mesmo tamanho e do mesmo terço radicular, evitando a ocorrência de variáveis. (GONZÁLEZ-LÓPES *et al.*, 2006). O fato de os dentes bovinos apresentarem maior tamanho e número de túbulos facilita a visualização de bactérias no seu interior, através de MEV, em cortes longitudinais (CAMARGO *et al.*, 2007).

Nessa sequência de ideias, Gründling *et al.* (2011) consideraram que é possível obter amostras de dentes bovinos com idade e características dentinárias similares, tornando possível distribuir os dentes de um mesmo animal em vários grupos experimentais, reduzindo as variáveis que ocorrem nas pesquisas clínicas.

## 3 OBJETIVOS

### 3.1 Geral

Avaliar, através de microscopia eletrônica de varredura e microscopia eletrônica de transmissão as alterações na ultraestrutura dentinária após o uso de diferentes protocolos de irrigação.

### 3.2 Específicos

- Realizar a análise descritiva através de microscopia eletrônica de transmissão, da matriz orgânica da dentina bovina, quanto à organização e estrutura do colágeno, após a ação do hipoclorito de sódio a 2,5%, solução de Clorexidina 2% e cloreto de sódio 0,9% como soluções irrigadoras, com e sem ativação pelo ultrassom, associados ou não ao EDTA.
- Avaliar *in vitro*, através da microscopia eletrônica de varredura a eficácia do hipoclorito de sódio a 2,5%, solução de Clorexidina 2% e cloreto de sódio 0,9% como soluções irrigadoras, com e sem ativação pelo ultrassom, associados ou não ao EDTA na remoção de *debris* e lama dentinária das paredes dos canais radiculares.
- Realizar a análise quantitativa e descritiva, através de microscopia eletrônica de varredura da dentina bovina peri e intertubular quanto às possíveis alterações na sua ultraestrutura, após a ação do hipoclorito de sódio a 2,5%, solução de Clorexidina 2% e cloreto de sódio 0,9% como soluções irrigadoras, com e sem ativação pelo ultrassom, associados ou não ao EDTA.

#### **4 SCIENTIFIC ARTICLE**

Wagner, M.H., Figueiredo, J.A.P., Duarte, M.A.H., Só, M.V.R. Final irrigation protocols may affect dentin ultrastructure. (Formatted according to the rules of the Journal of Endodontics).

## Final irrigation protocols may affect dentin ultrastructure.

Wagner, MHW <sup>\*†</sup>, Só MVR<sup>†</sup>, Figueiredo JAP<sup>†\*</sup>, Duarte MAH<sup>§</sup>

### Abstract

**Introduction:** The aim of this study was to evaluate, by scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM), the dentin ultrastructure after using different irrigation protocols. **Methods:** Thirty-nine lower bovine incisors were randomly divided into 13 groups (n = 3) and their roots were split longitudinally into two halves. After the halves were reassembled, they received the specific irrigation protocol for each group: G1, distilled water (control); G2, 0.9% saline; G3, saline+17% EDTA; G4, saline+PUI; G5, saline+PUI+EDTA; G6, 2.5% NaOCl; G7, NaOCl+EDTA; G8, NaOCl+PUI; G9, NaOCl+PUI+EDTA; G10, 2% CHX; G11, CHX+EDTA; G12, CHX+PUI; G13, CHX+EDTA+PUI. One half of each sample was prepared and evaluated by SEM, and one of each group, by TEM. **Results:** TEM descriptive analysis showed alteration in dentin organic ultrastructure, characterized by the thinning of the dentin collagen fibrils, caused by NaOCl, potentialized by EDTA and/or PUI. SEM analysis showed that NaOCl with PUI caused erosion of the peritubular dentin significantly larger than in all the other groups (P <0.05), followed by NaOCl+EDTA and NaOCl+EDTA+PUI. **Conclusions:** The 2,5% NaOCl favored better cleaning, caused erosion of the peritubular and intertubular dentin and promoted ultrastructural alterations in the dentin collagen which were potentilaized by EDTA and/or PUI.

**Keywords:** endodontics, dentine, sodium hypochlorite, chlorhexidine, EDTA, ultrasound therapy.

(<sup>†</sup>) School of Dentistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil;

(<sup>\*</sup>) School of Dentistry, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil;

(<sup>§</sup>) School of Dentistry, University of São Paulo, Bauru, São Paulo, Brazil.

(\*) Corresponding author, School of Dentistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil; R. Ramiro Barcelos, 2492, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil; CEP 90035. E-mail address: marciahwagner@gmail.com

## **Introdução**

Os protocolos de irrigação exercem um papel fundamental na sanificação, modelagem e selamento tridimensional do sistema de canais radiculares que são essenciais para o sucesso do tratamento endodôntico (1). Diversas substâncias tem sido utilizadas como soluções irrigadoras do sistema de canais radiculares com o intuito de remover tecido pulpar e *debris*, bem como, auxiliar na eliminação de microrganismos (2-5). Estudos tem demonstrado que muitas áreas do canal radicular permanecem sem serem tocadas pelos instrumentos, enfatizando a importância das substâncias químicas na limpeza e desinfecção do sistema de canais radiculares (6-8), assim como de mecanismos de liberação das soluções no terço apical e áreas inacessíveis (4, 9-18).

O hipoclorito de sódio e a clorexidina são substâncias largamente empregadas em Endodontia. Além disso, a utilização da ativação ultrassônica, como um importante meio físico para a propagação dessas substâncias no sistema de canais radiculares, tem se difundido na terapia endodôntica (11, 19-21). Um aspecto importante a ser considerado quando da escolha da solução irrigadora é o efeito que ela exerce sobre a matriz orgânica (22) e inorgânica (23-27) da dentina. Esse efeito pode levar a alterações no seu módulo de elasticidade (28) e resistência à fratura (29), bem como na adesão de cimentos obturadores e materiais restauradores (25, 26, 30-34). A concentração (24), o tempo (23, 25) e a sequência de utilização (27, 29, 35) das soluções irrigadoras exercem influência sobre os efeitos causados na estrutura mineral da dentina pelo NaOCl e/ou pelo EDTA. Entretanto pouco ainda tem sido estudado sobre a ação dessas substâncias químicas sobre o colágeno dentinário, bem como os efeitos associados ao uso da ativação ultrassônica passiva.

Baseado nas informações supracitadas o objetivo deste estudo foi avaliar, através da MEV e MET, as alterações que ocorrem na estrutura orgânica e inorgânica da dentina bovina, assim como a limpeza das paredes dentinárias frente a diferentes protocolos de irrigação.

## **Material e Método**

Este estudo, *in vitro*, controlado, com mascaramento para os examinadores, foi aprovado pelo comitê de ética da UFRGS, protocolado sob número 23051. Trinta e nove incisivos inferiores bovinos tiveram suas coroas removidas a 16mm do ápice e foram randomicamente separadas em 13 grupos (n=3).

Nas três raízes pertencentes ao grupo 1 (controle) foi realizada a irrigação/aspiração simultâneas de 10 ml de água destilada. Em seguida, dois sulcos longitudinais foram realizados com disco diamantado de dupla face, nas superfícies vestibular e lingual, sem atingir a luz do canal e posterior clivagem em duas metades. Estas hemirraízes foram colocadas em cuba de ultrassom (Cristófoli, Campo Mourão/PR, Brasil) contendo água destilada que foi duas vezes ultrassonificada por cinco minutos.

Nas demais 36 raízes, pertencentes aos grupos 2 a 13, as paredes dos canais foram regularizadas no sentido cérvico-apical, com brocas Gates-Glidden (Maillefer, Ballaigues/VD, Suíça) iniciando pela broca de nº 6, até concluir com a nº 2, no limite de trabalho de 15mm. Irrigação e aspiração com 2ml de soro fisiológico foi realizada a cada troca de broca, tendo os espécimes fixados a uma morsa. Em seguida, essas raízes foram clivadas em duas metades longitudinais, conforme descrito para o grupo 1. Estas hemirraízes foram colocadas em cuba ultrassônica acionada por cinco minutos, imersas em EDTA 17%, para remoção da lama dentinária e, por outros 5 minutos, imersas em água destilada, para remoção de resíduos do EDTA.

As 78 hemirraízes reunidas a seus respectivos pares tiveram a linha de união selada com cera utilidade (Wilson, Polidental Indústria e Comércio Ltda, Cotia/SP, Brasil) a partir da superfície externa, inclusive nos ápices radiculares e foram envoltas por adesivo termoplástico (Rendicolla Comércio, Exportação e Importação de Produtos Químicos Ltda, Palmeira/PR, Brasil) em forma de dois colares, um cervical e outro apical. Essas raízes foram reposicionadas à morsa onde receberam os protocolos de irrigação.

### **Procedimentos de irrigação**

Os protocolos de irrigação utilizados em cada grupo foram os seguintes:

**G1:** água destilada; **G2:** Soro fisiológico 0,9%; **G3:** Soro+EDTA 17%; **G4:** Soro+AUP (ativação ultrassônica passiva); **G5:** Soro+AUP+EDTA; **G6:** NaOCl (hipoclorito de sódio 2,5%); **G7:** NaOCl+EDTA; **G8:** NaOCl+AUP; **G9:** NaOCl+AUP+EDTA; **G10:** CHX (clorexidina 2%); **G11:** CHX+EDTA ; **G12:** CHX+AUP; **G13:** CHX+AUP+EDTA.

As raízes receberam 10ml da solução irrigadora correspondente, levada aos canais através de uma seringa descartável de 10ml (BD<sup>®</sup>, Curitiba/PR, Brasil) com

agulha 30-G (Navitip; Ultradent, South Jordan/UT, EUA) colocada a 2mm do comprimento de trabalho. Simultaneamente foi realizada a aspiração através de cânulas metálicas (Konnen, São Paulo/SP, Brasil) acopladas a uma bomba suctora. O mesmo protocolo foi utilizado para aplicação de 2ml de EDTA 17%, durante 3 minutos, nos grupos correspondentes, os quais tiveram a substância irrigadora totalmente aspirada antes do preenchimento do canal com EDTA.

Nos grupos que tiveram AUP, esta foi realizada através de três ciclos de 20 segundos, com o canal inundado com a respectiva solução irrigadora e renovada através da irrigação/aspiração de 1ml a cada intervalo. A AUP foi realizada através do MultiSonic S (Satelec System, Gnatus, Ribeirão Preto/SP, Brasil), na função endo, potência 5, com um inserto liso (E1 Irrisonic; Helse, Capelli e Fabris, São Paulo/SP Brasil), equivalente a uma lima K #20, posicionado 1mm aquém do comprimento de trabalho e centralizado no canal (21).

Ao final dos protocolos de irrigação os canais foram irrigados com 3ml de água destilada e secos com pontas de papel absorvente.

As hemirraízes foram separadas e colocadas individualmente em tubos plásticos (Eppendorf do Brasil Ltda, São Paulo/SP, Brasil) contendo glutaraldeído 2,5% para as hemirraízes destinadas à MEV e solução fixadora específica para aquelas destinadas à MET.

### **Microscopia Eletrônica de Transmissão**

Uma amostra representativa de cada grupo experimental foi preparada para avaliação através de MET a partir do fragmento central, correspondente ao terço médio da hemirraiz (25, 26). As amostras foram parcialmente descalcificadas e, em seguida, preparadas para ultramicrotomia, onde foram feitos cortes de 100 nm de espessura, no sentido do longo eixo dos túbulos dentinários. Esses cortes foram examinados ao microscópio eletrônico de transmissão modelo JEM 1200 EXII (JEOL, Tóquio, Japão) a 120kV, onde foram capturadas imagens com magnificações de 10000x, 100000x e 200000x.

### **Microscopia Eletrônica de Varredura**

As hemirraízes destinadas à avaliação por meio de MEV foram lavadas em água corrente, desidratadas, montadas em *stubs* e metalizadas com ouro-paládio (Bal-tec, SCD 050, Tóquio, Japão). Os espécimes foram analisados através do MEV

JSM 6060 (JEOL, Tóquio, Japão) em magnificações de 2000x e 7500x e as imagens, capturadas nas porções limítrofes entre terço apical e médio e entre terço médio e cervical.

### **Análise dos Dados**

A análise descritiva das eletromicrografias foi realizada por um avaliador experiente quanto ao aspecto da ultraestrutura da dentina, atentando para o aspecto do colágeno dentinário nas imagens da MET e para a possível erosão da dentina peri e intertubular, além da limpeza das paredes dentinárias, através da presença de *debris* e lama dentinária em imagens de MEV. Esses aspectos também foram avaliados quantitativamente através de uma escala numérica onde foram atribuídos 4 escores: 1, para 0% de *debris*, lama dentinária ou erosão da dentina peri e intertubular; 2, para menos de 50%; 3, para mais de 50% e 4, para 100% desses aspectos nas paredes dentinárias (11). A avaliação quantitativa foi realizada por dois examinadores calibrados e cegos para os grupos experimentais.

Para análise dos resultados foi empregado o teste de Kruskal-Wallis e *post hoc* de Dunn, com nível de significância estabelecido em 5%.

### **Resultados**

#### **Análise Qualitativa da MET**

A superfície dos túbulos apresentou-se lisa e o colágeno íntegro nos grupos G1(água destilada), G2(soro), G3(soro+EDTA), G4(soro+AUP) e G10(CHX); disperso, com características de descolamento da superfície, nos grupos G5(soro+AUP+EDTA), G11(CHX+EDTA), G12(CHX+AUP) e G13(CHX+AUP+EDTA) e alterado, demonstrando perda de substância e com as pontas das fitas de colágeno afiladas nos grupos G6(NaOCl) e G8(NaOCl+AUP) (Figura 1).

#### **Análise Qualitativa da MEV**

As paredes dentinárias apresentaram menos de 50% de *debris* nos grupos G1(água destilada), G2(soro), G3(soro+EDTA), G4(soro+AUP), G5(soro+AUP+EDTA), G10(CHX), G11(CHX+EDTA), G12(CHX+AUP), G13(CHX+AUP+EDTA) e 0% nos grupos G6(NaOCl), G7(NaOCl+EDTA)\*, G8(NaOCl+AUP) e G9(NaOCl+AUP+EDTA) (Figura 2).

Os túbulos dentinários apresentaram menos de 50% de lama dentinária nos grupos G1(água destilada), G2(soro), G4(soro+AUP), G6(NaOCl), G10(CHX), G11(CHX+EDTA), G12(CHX+AUP), G13(CHX+AUP+EDTA); mais de 50% nos grupos G3(soro+EDTA) e G5(soro+AUP+EDTA) e 0% nos grupos G7(NaOCl+EDTA), G8(NaOCl+AUP) e G9(NaOCl+AUP+EDTA) (Figura 2).

A dentina peritubular apresentou-se intacta (0% de erosão) nos grupos G1(água destilada), G2(soro), G3(soro+EDTA), G10(CHX), G11(CHX+EDTA), G12(CHX+AUP) e G13(CHX+AUP+EDTA); com menos de 50% nos grupos G4(soro+AUP), G5(soro+AUP+EDTA) e G6(NaOCl); com mais de 50% de erosão nos grupos G7(NaOCl+EDTA) e G9(NaOCl+AUP+EDTA) e com 100% de erosão no grupo G8(NaOCl+AUP) (Figura 2).

A ausência de erosão na dentina intertubular foi demonstrada nos grupos G1(água destilada), G2(soro), G3(soro+EDTA), G4(soro+AUP), G5(soro+AUP+EDTA), G6(NaOCl), G10(CHX), G11(CHX+EDTA), G12(CHX+AUP), G13(CHX+AUP+EDTA); menos de 50% de erosão nos grupos G7(NaOCl+EDTA) e G9(NaOCl+AUP+EDTA) e mais de 50% de erosão no grupo G8(NaOCl+AUP) (Figura 2).

### Análise Semiquantitativa da MEV

Os resultados da análise semiquantitativa estão expressos na tabela 1.

**Tabela 1.** Escores de *debris*, lama dentinária e erosão da dentina peri e intertubular da avaliação semiquantitativa através de MEV (média  $\pm$  desvio padrão).

Grupos	Protocolos de Irrigação	<i>Debris</i>	Lama Dentinária	Dentina Peritubular	Dentina Intertubular
G1	Água Destilada	2,0 <sup>cde</sup> $\pm$ 0,0	2,3 <sup>a</sup> $\pm$ 0,5	1,0 <sup>a</sup> $\pm$ 0,0	1,0 <sup>a</sup> $\pm$ 0,0
G2	Soro	1,7 <sup>abcde</sup> $\pm$ 0,5	2,5 <sup>a</sup> $\pm$ 0,5	1,0 <sup>a</sup> $\pm$ 0,0	1,0 <sup>a</sup> $\pm$ 0,0
G3	Soro+EDTA	1,8 <sup>de</sup> $\pm$ 0,4	3,0 <sup>a</sup> $\pm$ 0,0	1,0 <sup>a</sup> $\pm$ 0,0	1,0 <sup>a</sup> $\pm$ 0,0
G4	Soro+AUP	2,0 <sup>cde</sup> $\pm$ 0,0	2,2 <sup>a</sup> $\pm$ 0,7	1,3 <sup>a</sup> $\pm$ 0,5	1,0 <sup>a</sup> $\pm$ 0,0
G5	Soro +AUP+EDTA	2,2 <sup>e</sup> $\pm$ 0,4	2,5 <sup>a</sup> $\pm$ 0,8	2,0 <sup>b</sup> $\pm$ 0,0	1,0 <sup>a</sup> $\pm$ 0,0
G6	NaOCl	1,7 <sup>abcde</sup> $\pm$ 0,5	2,0 <sup>ac</sup> $\pm$ 0,6	2,2 <sup>b</sup> $\pm$ 0,4	1,0 <sup>a</sup> $\pm$ 0,0
G7	NaOCl+EDTA	1,0 <sup>ab</sup> $\pm$ 0,0	1,0 <sup>c</sup> $\pm$ 0,0	2,7 <sup>b</sup> $\pm$ 0,5	1,8 <sup>ab</sup> $\pm$ 0,7
G8	NaOCl+AUP	1,0 <sup>a</sup> $\pm$ 0,0	1,0 <sup>c</sup> $\pm$ 0,0	3,7 <sup>c</sup> $\pm$ 0,5	3,0 <sup>b</sup> $\pm$ 0,0
G9	NaOCl+AUP+EDTA	1,0 <sup>a</sup> $\pm$ 0,0	1,0 <sup>c</sup> $\pm$ 0,0	2,7 <sup>b</sup> $\pm$ 1,0	2,0 <sup>ab</sup> $\pm$ 0,6
G10	CHX	1,3 <sup>abc</sup> $\pm$ 0,5	2,3 <sup>a</sup> $\pm$ 0,5	1,0 <sup>a</sup> $\pm$ 0,0	1,0 <sup>a</sup> $\pm$ 0,0
G11	CHX+EDTA	1,3 <sup>bc</sup> $\pm$ 0,5	1,7 <sup>ac</sup> $\pm$ 0,5	1,0 <sup>a</sup> $\pm$ 0,0	1,0 <sup>a</sup> $\pm$ 0,0
G12	CHX+AUP	1,3 <sup>abc</sup> $\pm$ 0,5	2,3 <sup>a</sup> $\pm$ 1,0	1,0 <sup>a</sup> $\pm$ 0,0	1,0 <sup>a</sup> $\pm$ 0,0
G13	CHX+AUP+EDTA	2,2 <sup>e</sup> $\pm$ 0,4	2,2 <sup>a</sup> $\pm$ 0,4	1,0 <sup>a</sup> $\pm$ 0,0	1,0 <sup>a</sup> $\pm$ 0,0

Diferentes letras sobreescritas na mesma coluna indicam diferença estatisticamente significativa através dos testes de Kruskal-Wallis e *post-hoc* de Dunn ( $P < 0,05$ ).

A erosão da dentina peritubular em G8(NaOCl+AUP) foi significativamente maior que todos os grupos ( $P<0,05$ ). G7(NaOCl+EDTA) e G9(NaOCl+AUP+EDTA) apresentaram erosão de dentina peritubular, porém menos acentuada que G8 ( $P<0,05$ ).

G8(NaOCl+AUP) apresentou maior erosão da dentina intertubular, não diferindo de G9(NaOCl+AUP+EDTA) e G7(NaOCl+EDTA) ( $P>0,05$ ). Os demais grupos não apresentaram erosão da dentina intertubular.

### **Discussão**

O protocolo de irrigação final dos canais radiculares com o objetivo de promover a limpeza e desinfecção é fundamental para o sucesso do tratamento endodôntico (3, 4, 7, 36, 37). O NaOCl é a solução irrigadora mais amplamente utilizada, baseado na sua capacidade de dissolver tecido necrótico e em seu potencial antimicrobiano (38). Associado ao NaOCl, o uso de um agente quelante, capaz de dissolver o componente inorgânico, se faz necessário para a remoção da lama dentinária (39, 40). A CHX tem sido utilizada como solução irrigadora devido ao seu poder antimicrobiano, propriedade de substantividade e baixa toxicidade (41, 42), mas não atua como solvente orgânico (32, 43). O EDTA é um quelante específico para o cálcio e vem sendo utilizado para remoção da lama dentinária (44). Entretanto o efeito da utilização dessas soluções irrigadoras sobre a ultraestrutura dentinária, especialmente no que diz respeito à estrutura orgânica, ainda não está totalmente elucidado (22, 28).

As amostras destinadas à MET consistiram de fragmentos do terço médio das hemirraízes (25, 26). A visualização no terço apical foi evitada devido ao efeito de bloqueio de vapor (13, 45, 46), essa região poderia não receber a mesma quantidade de solução irrigadora que os demais terços (26). As zonas centrais dos canais tendem a ter as paredes dentinárias mais regularizadas e alisadas (27, 44). Os mesmos aspectos foram considerados para captura das imagens em MEV.

Os resultados das análises quantitativa e qualitativa da MEV foram semelhantes e tiveram relação com os achados da MET. Esse fato demonstra a importância da análise quantitativa em MEV que reforça os achados qualitativos, confirmando as evidências deste estudo. Nas três análises, foi evidenciada a alteração na ultraestrutura dentinária no grupo do NaOCl+AUP (G8) com deslocamento do colágeno da superfície e afilamento das fitas e extensa erosão da

dentina peri e intertubular. Essa degeneração do colágeno também foi evidenciada quando o NaOCl foi usado isoladamente (G6). Isso confirma o poder de dissolução orgânica do NaOCl (3, 4, 5, 12, 47, 48). Não foram encontrados outros estudos que mostrassem essa degeneração do colágeno através de MET, frente a uso de soluções irrigadoras. Entretanto, alterações no colágeno dentinário foram demonstradas através de avaliação imunohistoquímica, e constatado que o NaOCl 5% induz importantes alterações no colágeno intertubular desmineralizado e nos glicosaminoglicanos intratubulares (22). Este estudo também demonstrou o papel protetor da hidroxiapatita sobre a estabilidade da matriz orgânica.

Na análise descritiva através da MET, o fato da estrutura de colágeno se apresentar íntegra nos grupos do soro, da CHX e da água destilada, já era esperado, uma vez que essas substâncias não são capazes de dissolver matéria orgânica. Estudos anteriores demonstraram que a água é menos efetiva que o NaOCl durante a AUP na remoção de matéria inorgânica dos canais radiculares (49). Apenas nas amostras em que foi utilizado o soro+AUP+EDTA e a CHX+AUP e/ou EDTA, o colágeno apresentou-se disperso, porém sem degradação. Isso provavelmente ocorreu devido ao fluxo da solução irrigadora que foi impulsionada contra as paredes dentinárias pela transmissão acústica ultrassônica, que gerou a onda de choque e fez com que as fitas de colágeno cortadas pela ação das brocas de Gates-Glidden fossem parcialmente deslocadas da parede dentinária.

A relevância clínica deste estudo é demonstrada no fato de alertar o profissional que irá restaurar o dente tratado endodonticamente, sobre as alterações que ocorrem na ultraestrutura dentinária frente aos diferentes protocolos de irrigação, que podem interferir tanto na sua resistência mecânica, quanto na adesão ao material restaurador. Quando o colágeno dentinário é dissolvido pelo NaOCl ocorre a liberação de oxigênio que pode interferir na polimerização das resinas e cimentos resinosos (30, 31, 50, 51). A correta integração entre os profissionais envolvidos no tratamento endodôntico e restaurador permitirá adequar os protocolos de irrigação de acordo com o procedimento restaurador a ser adotado.

Os quatro escores estabelecidos para avaliar a remoção de *debris*, lama dentinária e erosão foram baseados em critérios quantitativos (<50% ou >50%) de acordo com van der Sluis *et al.* (2010)(11). Foi evitado o uso de critérios subjetivos (20) que poderiam contribuir para diminuir a concordância intra e inter observadores.

A análise quantitativa revelou que os grupos do NaOCl+EDTA, NaOCl+AUP e NaOCl+AUP+EDTA foram os que apresentaram as paredes mais limpas, isto é, sem *debris* e com túbulos dentinários abertos. Diferentemente dos resultados encontrados em estudos anteriores (18, 20, 52, 53, 54), a utilização de EDTA e AUP não diminuiu a quantidade de *debris*, tampouco de lama dentinária, quando associados ao soro e à CHX. Porém, nos grupos do NaOCl, o EDTA e/ou AUP diminuíram a presença da lama dentinária. Isso demonstrou que o EDTA e a AUP sem a dissolução de matéria orgânica realizada pelo NaOCl, não removeram a lama dentinária de maneira eficaz. Esse efeito químico do NaOCl já havia sido sugerido por van der Sluis *et al.* (2010) (11).

O grupo do NaOCl+AUP apresentou significativamente maior erosão peritubular que todos os demais ( $P < 0,05$ ); seguido dos grupos do NaOCl+EDTA e NaOCl+AUP+EDTA que apresentaram erosão menos acentuada da dentina peritubular que o grupo do NaOCl+AUP ( $P < 0,05$ ), porém maior que o grupo do NaOCl isolado. Logo é possível admitir que o ultrassom potencializou o efeito de erosão do NaOCl. Resultados semelhantes após uso de NaOCl e EDTA, foram encontrados em outros estudos (23, 24, 40).

O mesmo ocorreu em relação à erosão da dentina intertubular, onde NaOCl+AUP apresentou maior erosão, porém não diferiu significativamente do NaOCl+AUP+EDTA e do NaOCl+EDTA ( $P > 0,05$ ). Esse fato confirma outros estudos que evidenciaram que o EDTA como irrigante final causa erosão das paredes dentinárias apenas quando o NaOCl é usado previamente (25, 26).

Quando o EDTA isoladamente é usado ele remove os íons cálcio do tecido mineral, sendo a matéria orgânica o fator limitante para a continuação da dissolução inorgânica (22). A aplicação subsequente de NaOCl remove a matéria orgânica e facilita a exposição da matriz inorgânica aumentando o efeito de desmineralização (55-57). Pode-se considerar que o EDTA apressa a ação destrutiva do NaOCl (33). A suposta agressividade do EDTA em causar erosão das paredes do canal radicular é atribuída ao uso associado e prolongado do NaOCl. Curiosamente, essas irregularidades ocorreram ainda mais acentuadamente, no grupo que foi utilizado NaOCl+AUP(G8), demonstrando que, mesmo sem a presença do EDTA, ocorreu uma erosão ainda mais severa da dentina peri e intertubular.

A hipótese de nulidade foi rejeitada porque os protocolos de irrigação que utilizaram NaOCl 2,5% provocaram alterações estruturais e ultraestruturais na dentina.

Os resultados obtidos nessa pesquisa sugerem que a AUP potencializa a ação do NaOCl pelo efeito de cavitação acústica (11). Entretanto, a ação do NaOCl também foi potencializada pelo EDTA e isso provocou grande impacto no grau de erosão da parede dentinária. Esses resultados apontam para a importância da irrigação cuidadosa, seja ela, ativada ou convencional e induzem à reflexão sobre concentração e tempo de uso do NaOCl. Alguns autores tem sugerido o uso de baixas concentrações tanto de NaOCl (58, 59), quanto de EDTA (24) e curtos períodos de exposição da dentina ao EDTA (23, 29, 60), bem como atenção à sequência de irrigação utilizada (27, 35).

Baseado nos resultados dessa pesquisa e considerando que a AUP representa um importante auxiliar na irrigação dos canais radiculares, novos questionamentos são inevitáveis. Sendo assim, estudos futuros são necessários para determinar a profundidade da erosão que ocorre nas paredes dentinárias quando da utilização da associação de NaOCl com AUP e/ou EDTA e o quanto essa erosão afeta estruturalmente o dente e a sua longevidade. Por outro lado, é necessário delinear protocolos de irrigação, com tempo, concentração e sequência de soluções irrigadoras definidas, que promovam limpeza e desinfecção da dentina com mínimo de efeitos indesejáveis ao dente.

Diante das condições experimentais e dos resultados obtidos no presente estudo, é lícito concluir que o NaOCl promoveu maior limpeza das paredes dos canais radiculares, mas também provocou alteração na ultraestrutura do colágeno e erosão da dentina peri e intertubular. A AUP e/ou EDTA através de ação sinérgica, potencializaram os efeitos do NaOCl sobre a estrutura dentinária.

#### **Reconhecimentos:**

Os autores agradecem a PROPESQ-UFRGS, pelo apoio financeiro e ao CME-UFRGS, pela preparação das amostras para MET e disponibilização dos Microscópios Eletrônicos.

Os autores negam qualquer conflito de interesses relacionado a este estudo.

#### **Referências**

1. Nair PNR. On the causes of persistent apical periodontitis: a review. *Int Endod J* 2006;39:249–81.
2. Cheung GSP, Stock CJR. In vitro cleaning ability of root canal irrigants with and without Endosonics. *Int Endod J* 1993;26:334-43.
3. Zehnder M. Root Canal Irrigants. *J Endod* 2006;32:389–98.
4. Haapasalo M, Shen Y, Qian W, Gao Y. Irrigation in Endodontics. *Dent Clin N Am* 2010;54:291–312.
5. Rôças IN, Siqueira JF. Comparison of the In Vivo Antimicrobial Effectiveness of Sodium Hypochlorite and Chlorhexidine Used as Root Canal Irrigants: A Molecular Microbiology Study. *J Endod* 2011;37:143–50.
6. Peters OA, Schonenberger K, Laib A. Effects of four Ni-Ti preparation techniques on root canal geometry assessed by micro computed tomography. *Int Endod J* 2001;34:221-30.
7. Clark-Holke D, Drake D, Walton R, Rivera E, Guthmiller JM. Bacterial penetration through canals of endodontically treated teeth in the presence or absence of the smear layer. *J Dent* 2003;31:275–81.
8. Paqué F, Rechenberg DK, Zehnder M. Reduction of Hard-tissue Debris Accumulation during Rotary Root Canal Instrumentation by Etidronic Acid in a Sodium Hypochlorite Irrigant. *J Endod* 2012;38:692–5.
9. van der Sluis LWM, Gambarini G, Wu MK, Wesselink PR. The influence of volume, type of irrigant and flushing method on removing artificially placed dentine debris from the apical root canal during passive ultrasonic irrigation. *Int Endod J* 2006;39:472-6.
10. van der Sluis LWM, Versluis M, Wu MK, Wesselink PR. Passive ultrasonic irrigation of the root canal: a review of the literature. *Int Endod J* 2007;40:415–26.
11. van der Sluis LWM, Vogels MPMJ, Verhaagen B, Macedo R, Wesselink PR. Study on influence of refreshment/activation cycles and irrigants on mechanical cleaning efficiency during ultrasonic activation of the irrigant. *J Endod* 2010;36:737-40.
12. Gregorio C, Estevez R, Cisneros R, Paranjpe A, Cohenca N. Efficacy of Different Irrigation and Activation Systems on the Penetration of Sodium Hypochlorite into Simulated Lateral Canals and up to Working Length: An In Vitro Study. *J Endod* 2010;36:1216-21.

13. Vera J, Arias A, Romero M. Effect of maintaining apical patency on irrigant penetration into the apical third of root canals when using passive ultrasonic irrigation. *J Endod* 2011;37:1276-8.
14. Merino A, Estevez R, Gregorio C, Cohenca N. The effect of different taper preparations on the ability of sonic and passive ultrasonic irrigation to reach the working length in curved canals. *Int Endod J* 2013;46:427–33.
15. Miranda RG, Santos EB, Souto RM, Gusman H, Colombo APV. Ex vivo antimicrobial efficacy of the EndoVac® system plus photodynamic therapy associated with calcium hydroxide against intracanal *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J* 2013;46:499–505.
16. Gregorio C, Arias A, Navarrete N, del Rio V, Oltra E, Cohenca N. Effect of Apical Size and Taper on Volume of Irrigant Delivered at Working Length with Apical Negative Pressure at Different Root Curvatures. *J Endod* 2013;39:119–24.
17. Mancini M, Cerroni L, Iorio L, Armellin E, Conte G, Cianconi L. Smear Layer Removal and Canal Cleanliness Using Different Irrigation Systems (EndoActivator, EndoVac, and Passive Ultrasonic Irrigation): Field Emission Scanning Electron Microscopic Evaluation in an In Vitro Study. *J Endod* 2013;39:1456–1460.
18. Capar ID, Ozcan E, Arslan H, Ertas H, Aydinbelge HA. Effect of Different Final Irrigation Methods on the Removal of Calcium Hydroxide from an Artificial Standardized Groove in the Apical Third of Root Canals. *J Endod* 2014;40:451–454.
19. Guerisoli DMZ, Marchesan MA, Walmsley AD, Lumley PJ, Pecora JD. Evaluation of smear layer removal by EDTAC and sodium hypochlorite with ultrasonic agitation. *Int Endod J* 2002;35:418–421.
20. Kuah HG, Lui JN, Tseng PSK, Chen NN. The Effect of EDTA with and without Ultrasonics on Removal of the Smear Layer. *J Endod* 2009;35:393–6.
21. Jiang LM, Verhaagen B, Versluis M, Zangrillo C, Cuckovic D, van der Sluis LWM. An Evaluation of the Effect of Pulsed Ultrasound on the Cleaning Efficacy of Passive Ultrasonic Irrigation. *J Endod* 2010;36:1887–91.
22. Oyarzún A, Cordero AM, Whittle M. Immunohistochemical Evaluation of the Effects of Sodium Hypochlorite on Dentin Collagen and Glycosaminoglycans. *J Endod* 2002;28:152-6.
23. Çalt S, Serper A. Time-dependent effects of EDTA on dentin structures. *J Endod* 2002;28:17–9.

24. Şen BH, Ertürk O, Pişkin B. The effect of different concentrations of EDTA on instrumented root canals walls. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009;108:622-7.
25. Mai S, Kim Yk, Arola Dd, Gu L, Kim Jr, Pashley Dh, Tay Fr. Differential aggressiveness of ethylenediamine tetraacetic acid in causing canal wall erosion in the presence of sodium hypochlorite. *J Dent* 2010;38:201–6.
26. Zhang K, Tay Fr, Kim Yk, Mitchell Jk, Kim Jr, Carrilho M, Pashley Dh, Ling J. The effect of initial irrigation with two different sodium hypochlorite concentrations on the erosion of instrumented radicular dentin. *Dent Mater* 2010;26:514–23.
27. Qian W, Shen Y, Haapasalo M. Quantitative Analysis of the Effect of Irrigant Solution Sequences on Dentin Erosion. *J Endod* 2011;37:1437–41.
28. John C, Löst C, ElAyouti A. Ultrasonic monitoring of the effect of sodium hypochlorite on the elasticity of dentine. *Int Endod J* 2013;46:477–82.
29. Uzunoglu E, Aktemur S, Uyanik MO, Durmaz V, Nagas E. Effect of Ethylenediaminetetraacetic Acid on Root Fracture with Respect to Concentration at Different Time Exposures. *J Endod* 2012;38:1110–3.
30. Morris MD, Lee KW, Agee KA, Bouillaguet S, Pashley DH. Effects of Sodium Hypochlorite and RC-Prep on Bond Strengths of Resin Cement to Endodontic Surfaces. *J Endod* 2001;27:753-7.
31. Ari H, Yaşar E, Bellí S. Effects of NaOCl on bond strengths of resin cements to root canal dentin. *J Endod* 2003;29:248-51.
32. Santos JN, Carrilho MRO, De Goes MF, Zaia AA, Gomes BPFA, Souza-Filho FJ, Ferraz CCR. Effect of Chemical Irrigants on the Bond Strength of a Self-Etching Adhesive to Pulp Chamber Dentin. *J Endod* 2006;32:1088–90.
33. Marending M, Luder HU, Brunner TJ, Knecht S, Stark WJ, Zehnder M. Effects of sodium hypochlorite on human root dentine-mechanical, chemical and structural evaluation. *Int Endod J* 2007;40:786–93.
34. Renovato SR, Santana FR, Ferreira JM, Souza JB, Soares CJ, Estrela C. Effect of calcium hydroxide and endodontic irrigants on fibre post bond strength to root canal dentine. *Int Endod Journal*, 46, 738–746, 2013.
35. Marending M, Paqué F, Fischer J, Zehnder, M. Impact of Irrigant Sequence on Mechanical Properties of Human Root Dentin. *J Endod* 2007;33:1325–8.

36. Beus C, Safavi K, Stratton J, Kaufman B. Comparison of the Effect of Two Endodontic Irrigation Protocols on the Elimination of Bacteria from Root Canal System: A Prospective, Randomized Clinical Trial. *J Endod* 2012;38:1479–83.
37. Wang Z, Shen Y, Haapasalo M. Effect of Smear Layer against Disinfection Protocols on *Enterococcus faecalis*-infected Dentin. *J Endod* 2013;39:1395–400.
38. Torabinejad M, Cho Y, Khademi AA, Bakland LK, Shahabang S. The Effect of Various Concentrations of Sodium Hypochlorite on the Ability of MTAD to Remove the Smear Layer. *J Endod* 2003;29:233-9.
39. Mello I, Coil J, Antoniazzi JH. Does a final rinse to remove smear layer interfere on dentin permeability of root canals? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009;107:e47–51.
40. Arslan H, Ayranci LB, Karatas E, Topçuoğlu HS, Yavuz MS, Kesim B. Effect of Agitation of EDTA with 808-Nanometer Diode Laser on Removal of Smear Layer. *J Endod* 2013;39:1589–92.
41. Ferraz CCR, Gomes BPFA, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. In vitro assessment of the antimicrobial action and the mechanical ability of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant. *J Endod* 2001;27:452-5.
42. Vianna ME, Gomes BPFA, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CCR, DDS, Souza-Filho FJ. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004;97:79-84.
43. Dametto FR, Ferraz CCR, Gomes BPFA *et al.* In vitro assessment of the immediate and prolonged antimicrobial action of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant against *Enterococcus faecalis*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005;99:768-72.
44. Baumgartner JC, Mader CL. A scanning electron microscopic evaluation of four root canal irrigation regimens. *J Endod* 1987;13:147-56.
45. Gu LS, Kim JR, Ling J, Choi KK, Pashley DH, Tay FR. Review of contemporary irrigant agitation techniques and devices. *J Endod* 2009;35:791–804.
46. Vera J, Hernández EM, Romero M, Arias A, van der Sluis LWM. Effect of maintaining apical patency on irrigant penetration into the apical two millimeters of large root canals: an in vivo study. *J Endod* 2012;38:1340-1343.
47. Clarkson RM, Kidd B, Evans GE, Moule AJ. The effect of surfactant on the dissolution of porcine pulpal tissue by sodium hypochlorite solutions. *J Endod* 2012;38:1257-60.

48. Dutta A, Saunders WP. Comparative evolution of calcium hypochlorite and sodium hypochlorite on soft-tissue dissolution. *J Endod* 2012;38:1395-8.

49. van der Sluis LWM, Wu MK, Wesselink PR. The evaluation of removal of calcium hydroxide paste from an artificial standardized groove in the apical root canal using different irrigation methodologies. *Int Endod J*, 2007;40:52–7.

50. Ishizuka T, Kataoka H, Yshioka T, Suda H, Iwasaki N, Takahashi I *et al.* Effect of NaOCl treatment on bonding to root canal dentin using a new evaluation method. *Dent Mater J* 2001;20:24-33.

51. Sasafuchi Y, Nikaido T, Tagami J. Effect of chemical irrigants and medicaments for endodontic treatment on dentin bonding. *Int Chin J Dent* 2003;3:7-12.

52. Lee SJ, Wu MK, Wesselink PR. The effectiveness of syringe irrigation and ultrasonics to remove debris from simulated irregularities within prepared root canal walls. *Int Endod J* 2004;37:672-8.

53. van der Sluis LW, Wu MK, Wesselink PR. A comparison between a smooth wire and a K-file in removing artificially placed dentine debris from root canals in resin blocks during ultrasonic irrigation. *Int Endod J* 2005;38:593-6.

54. Lui JN, Kuah HG, Chen NN. Effect of EDTA with and without surfactants or ultrasonics on removal of smear layer. *J Endod* 2007;33:472-5.

55. Perdigão J, Eiriksson S, Rosa BT, Lopes M, Gomes G. Effect of calcium removal on dentin bond strengths. *Quintessence Int* 2001;32:142-146.

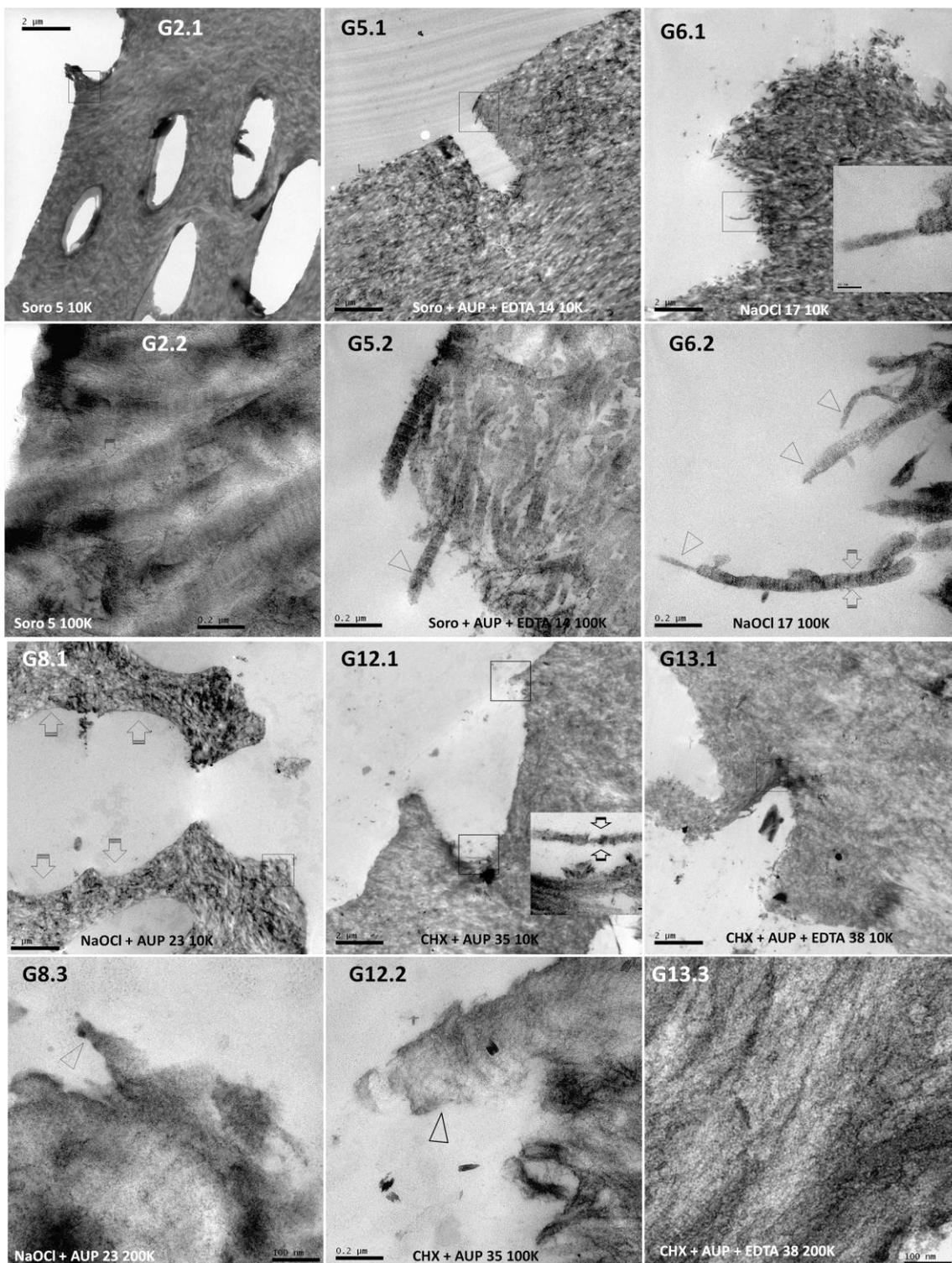
56. Doğan H, Çalt S. Effects of Chelating Agents and Sodium Hypochlorite on Mineral Content of Root Dentin. *J Endod* 2001;27:578-80.

57. Sayin TC, Serper A, Cehreli ZC, Kalayci S. Calcium loss from root canal dentin following EDTA, EGTA, EDTAC, and Tetracycline-HCl treatment with or without subsequent NaOCl irrigation. *J Endod* 2007;33:581–584.

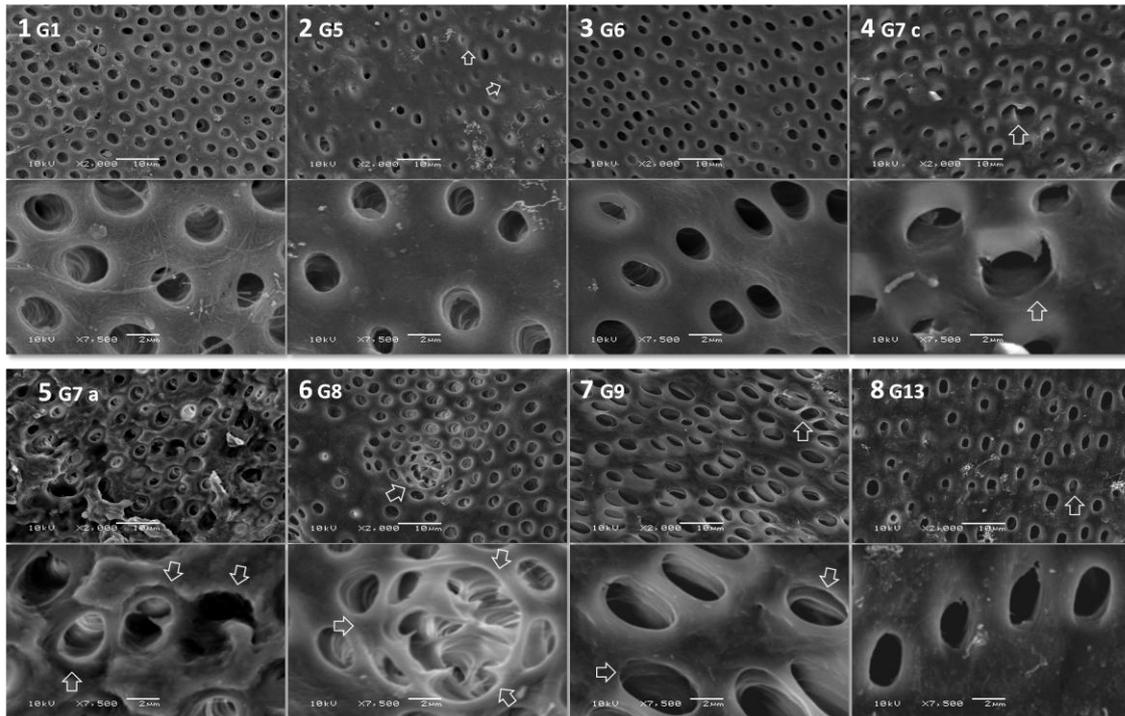
58. Hu X, Peng Y, Sum C, Ling J. Effects of concentrations and exposure times of sodium hypochlorite on dentin deproteinization: attenuated total reflection fourier transform infrared spectroscopy study. *J Endod* 2010;36:2008–11.

59. Kaya S, Yiğit-Özer S, Adigüzel Ö. Evaluation of radicular dentin erosion and smear layer removal capacity of Self-Adjusting File using different concentrations of sodium hypochlorite as an initial irrigant. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2011;112:524-30.

60.Slutzky-Goldberg I, Maree M, Liberman R, Heling I. Effect of sodium hypochlorite on dentin microhardness J Endod 2004;30:880-2.



**Figura 1** – Eletromicrografias de MET. **G** representa o grupo e **.1**, **.2** e **.3** representa a ampliação de 10000, 100000 e 200000X, respectivamente. Quadrados indicam as áreas que foram ampliadas. **G2.1 e .2**: superfície lisa e estrutura do colágeno íntegra. Fibras colágenas longas e íntegras (entre as setas e nas pontas de setas). **G5.1 e .2**: superfície com colágeno disperso; estrutura do colágeno sem alterações, fibra colágena (ponta da seta). **G6.1 e .2**: Superfície com colágeno disperso (entre setas); estrutura do colágeno com a ponta parcialmente dissolvida. Note-se a perda de substância afinando a ponta do colágeno (pontas de setas e no detalhe), aparece inclusive no fundo do túbulo. **G8.1 e .3**: Superfície com colágeno disperso; estrutura do colágeno com a ponta parcialmente dissolvida (ponta de seta). Alargamentos globulares nos túbulos (setas abertas). **G12.1, .2, .3**: Superfície ligeiramente aberta e estrutura do colágeno íntegra. Fibras colágenas (entre as setas). **G12.2**: porção de dentina na entrada do túbulo, com fibras colágenas íntegras (ponta de seta). No detalhe: fibra colágena (entre setas). **G13.1, .2 e .3**: Superfície ligeiramente aberta e estrutura do colágeno íntegra, fibra colágena íntegra (entre setas).



**Figura 2** - Eletromicrografias de MEV, com magnificações originais de 2000 X (superior) e 7500X (inferior). **1 G1**, Grupo 1 (água destilada): Parede dentinária com menos de 50% de *debris*, túbulos dentinários com menos de 50% de lama dentinária, 0% de erosão na dentina peri e intertubular. **2 G5**, Grupo 5 (Soro + AUP + EDTA): Parede dentinária com menos de 50% de *debris*, mais de 50% de lama dentinária obliterando os túbulos dentinários (setas), menos de 50% de erosão da dentina peritubular e 0% de erosão da dentina intertubular. **3 G6**, Grupo 6 (NaOCl): menos de 50% de *debris*, 0% de lama dentinária, menos de 50% de erosão da dentina peritubular, 0% de erosão na dentina intertubular. **4 G7c**, Grupo 7 (NaOCl + EDTA) cervical: 0% de *debris* e lama dentinária, mais de 50% de erosão da dentina peritubular, menos de 50% de erosão da dentina intertubular (setas). **5 G7a**, Grupo 7 apical: 0% de *debris* e lama dentinária, mais de 50% de erosão da dentina peri e intertubular (setas). **6 G8**, Grupo 8 (NaOCl + AUP) : 0% de *debris* e lama dentinária, mais de 50% de erosão da dentina peritubular, menos de 50% de erosão da dentina intertubular(setas). **7 G9**, Grupo 9 (NaOCl + AUP + EDTA): 0% de *debris* e lama dentinária, mais de 50% de erosão da dentina peritubular e menos de 50% de erosão da dentina intertubular (setas). **8 G13**, Grupo 13 (CHX + AUP + EDTA): menos de 50% de *debris* e lama dentinária, presença de smear plugs em poucas áreas (seta), 0% de erosão da dentina peri e intertubular.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O tratamento endodôntico deve prevenir ou promover a cura de lesões periapicais. Na tentativa de atingir esse objetivo, o preparo químico-mecânico dos canais radiculares, representa um dos passos essenciais para determinar a eficácia de todos os procedimentos subsequentes, tais como, o emprego de uma medicação intracanal e a adequada obturação do sistema de canais radiculares (PETERS, 2004). Entretanto a instrumentação dos canais é associada a algumas desvantagens, entre elas a produção de lama dentinária e *debris* (MELLO *et al.*, 2008; PRADO *et al.*, 2011), que interferem na limpeza, desinfecção e no selamento adequado do sistema de canais radiculares, podendo comprometer o sucesso do tratamento (CLARK-HOLKE *et al.*, 2003; NAIR, 2006; SIQUEIRA JR; RÔÇAS, 2008).

Vários estudos tem demonstrado a importância da irrigação final dos canais radiculares com o objetivo de promover a limpeza e desinfecção (CLARK-HOLKE *et al.*, 2003; ZEHNDER, 2006; HAAPASALO *et al.*, 2010, BEUS *et al.*, 2012; WANG; SHEN; HAAPASALO, 2013). O NaOCl é a solução irrigadora mais amplamente utilizada, baseado na sua capacidade de dissolver tecido necrótico e em seu potencial antimicrobiano (TORABINEJAD *et al.*, 2009). Associado ao NaOCl, o uso de um agente quelante, capaz de dissolver o componente inorgânico, se faz necessário para a remoção da lama dentinária do sistema de canais radiculares (MELLO *et al.*, 2009; ARSLAN *et al.*, 2013). O EDTA é um quelante específico para o cálcio e amplamente empregado em Endodontia (BAUMGARTNER; MADER, 1987). Entretanto o efeito da utilização dessas soluções irrigadoras sobre a ultraestrutura dentinária, especialmente no que diz respeito à estrutura orgânica, ainda não está totalmente elucidado (OYARZÚN; CORDERO; WHITTLE, 2002; JOHN; LÖST; ELAYOUTI, 2013).

Com o objetivo de avaliar as alterações que ocorrem na ultraestrutura dentinária, frente aos protocolos de irrigação mais comumente utilizados, trinta e nove dentes bovinos, os quais apresentam características semelhantes aos dentes humanos (SCHILKE *et al.*, 2000; SCHMALZ *et al.*, 2001; GONZÁLEZ-LÓPEZ *et al.*, 2006; CAMARGO *et al.*, 2007) foram utilizados, para que essas informações pudessem ser extrapoladas para a prática clínica que ainda carece de informações a esse respeito. Entendemos que as alterações que ocorreram na dentina bovina frente à utilização dos diferentes protocolos de irrigação podem ser verificadas

também na dentina humana. Concordamos com Gründling *et al.* (2011) que ressalta a existência de uma grande dificuldade em se conseguir dentes humanos frescos, com características estruturais semelhantes, sem alterações na dentina causadas por tratamentos prévios ou por procedimentos de estocagem em bancos de dentes. Esses fatores podem interferir nas condições da ultraestrutura dentinária e representar variáveis não controladas ao estudo. No presente estudo os dentes bovinos foram todos extraídos no mesmo dia, congelados, limpos, estocados e manipulados de forma padronizada.

Durante a parte experimental foi simulada uma situação clínica, onde foram usados 10ml da solução analisada, como protocolo final de irrigação em cada grupo (ÇALT; SERPER, 2002; MOREIRA *et al.*, 2009; UZUNOGLU *et al.*, 2012). Nos grupos com EDTA, foram utilizados, além dos 10ml, 2ml de EDTA por três minutos (KOKKAS *et al.*, 2004; MARENDING *et al.*, 2007b; HAAPASALO, 2010; GREGORIO *et al.*, 2010; QUIAN; SHEN; HAPASALO, 2011). A ativação ultrassônica passiva foi realizada conforme recomendado por Van Der Sluis *et al.* (2010), no tempo de um minuto fracionado em três ativações de 20 segundos, com irrigação de 1ml de solução irrigadora a cada intervalo entre uma ativação e outra. Pequenos períodos de ativação e irrigação a cada intervalo têm efeito cumulativo na remoção de *debris* (VAN DER SLUIS, *et al.*, 2010) bem como, facilita a manutenção da ponta ultrassônica centralizada do canal (SABINS; JOHNSON; HELLSTEI, 2003). Conforme preconizado por Jiang *et al.*, (2010), o inserto liso acionado não deve tocar nas paredes dos canais para não provocar formação de lama dentinária.

O tamanho correspondente a uma lima K #70 do batente apical foi padronizado para que um volume igual de solução irrigadora atingisse o limite apical em todas as amostras e não houvesse interferência nos resultados, pois Gregório *et al.* (2013) ressaltaram que o volume do irrigante diminui no comprimento de trabalho para um dado tamanho e conicidade. Contrapondo essa informação, Merino *et al.*, (2013) consideraram que esse fator não interfere quando a AUP é utilizada em canais com conicidade maior do que 0.04.

Para a avaliação através da Microscopia Eletrônica de Transmissão os cortes foram realizados no sentido longitudinal dos túbulos dentinários, de forma que fosse visualizada a luz do canal radicular, a abertura dos túbulos e a continuação do túbulo para o interior da parede dentinária do canal radicular. Utilizou-se ampliações de 10.000, 100.000 e 200.000 vezes de forma a obter uma barra de referência de 2µm,

0,2µm e 100nm (ZHANG *et al.*, 2010a). A distribuição espacial do colágeno foi observada para que fosse avaliada a condição do mesmo na superfície da dentina, e verificada a disposição das fitas de tripla-hélice, se estavam fechadas ou abertas e se existia uma degradação do mesmo, categorizando o colágeno colabado.

Zhang *et al.* (2010a) avaliaram através de MEV e MET a erosão na dentina causada por diferentes concentrações de NaOCl na presença de EDTA. No estudo de Mai *et al.* (2010) também foi utilizada MET para verificar a erosão da dentina causada pelo EDTA na presença de NaOCl. Diferentemente daquelas pesquisas, para a avaliação através de MET, no presente estudo, a superfície da luz do canal foi deixada vazia, isto é, não foi preenchida com nenhum tipo de cimento endodôntico previamente à descalcificação parcial e preparo das amostras para análise ao MET. Na pesquisa de May *et al.* (2010) foram utilizados dois cimentos endodônticos à base de metacrilato, RealSeal e RealSeal SE (Sybron-Endo, Orange, CA, EUA) e na de Zhang *et al.* (2010a) foi utilizado apenas o cimento RealSeal SE no espaço do canal radicular, com o intuito de formar uma interface contínua cimento-dentina e evitar que houvesse separação durante a ultramicrotomia. Entretanto, segundo Babb *et al.* (2009) a capacidade do EDTA é mais confiável que a destes adesivos para manter a união da resina com a dentina e garantir a integridade da amostra. Por isso, no presente estudo, não foi colocado nenhum cimento endodôntico sobre a luz do canal, apenas a resina Epon (EMS, EMBED 812, Hatfield, PA, EUA) foi utilizada para embebição da amostra que penetrou os túbulos dentinários a partir da luz do canal radicular. Isso permitiu a visualização pioneira da estrutura das fitas de colágeno na parede dentinária e no interior dos túbulos dentinários frente a diferentes protocolos de irrigação. Outra diferença daqueles estudos para este é a avaliação de diferentes protocolos de irrigação com três soluções irrigadoras associadas ou não ao EDTA, com e sem AUP.

As amostras destinadas à MET consistiram de fragmentos do terço médio das hemirraízes conforme as pesquisas de Mai *et al.* (2010) e Zhang *et al.* (2010a). A visualização no terço apical foi evitada devido ao efeito de bloqueio de vapor (GU *et al.*, 2009; VERA *et al.*, 2012) que poderia ocorrer, pois, uma vez que o ápice estava selado para simular uma situação clínica e não era possível usar uma lima de trespasse (VERA; ARIAS; ROMERO, 2012), essa região poderia não receber a mesma quantidade de solução irrigadora que os demais terços (ZHANG *et al.*,

2010a). Os mesmos aspectos foram considerados para a escolha das regiões para captura das imagens, na avaliação através de MEV, em que as imagens foram capturadas nas regiões limítrofes entre o terço cervical e médio e entre o terço médio e apical. Essas zonas tendem a ter as paredes dentinárias mais regularizadas e alisadas, onde as brocas de Gates-Glidden instrumentaram de forma mais homogênea do que na porção cervical e apical (BAUMGARTNER; MADER, 1987).

Na análise descritiva através da MET, o fato da estrutura de colágeno se apresentar íntegra nos grupos do soro e da CHX, assim como no grupo controle (água destilada), era esperado, uma vez que essas substâncias não são capazes de dissolver matéria orgânica. Isso confirma os resultados obtidos em estudos anteriores de que a água é menos efetiva que o NaOCl durante a AUP na remoção de matéria inorgânica dos canais radiculares (VAN DER SLUIS; WU; WESSELINK, 2007). Apenas nas amostras em que foi utilizado o soro com AUP e EDTA e a CHX com AUP e/ou EDTA, o colágeno apresentou-se disperso, porém sem degradação. Isso provavelmente ocorreu devido ao fluxo da solução irrigadora que foi jogada contra as paredes dentinárias pela transmissão acústica ultrassônica, que gerou a onda de choque e fez com que as fitas de colágeno cortadas pela ação das brocas de Gates-Glidden fossem parcialmente deslocadas da parede dentinária.

Nos grupos do NaOCl isoladamente e com AUP, a superfície interna do túbulo dentinário apresentou-se com o colágeno disperso, mostrando perda de substância, de forma que a fita de colágeno estava afilada. Esta evidência foi observada inclusive, profundamente no túbulo dentinário. Não foi encontrado na literatura outro estudo que tenha demonstrado tal alteração na ultraestrutura dentinária frente à utilização de NaOCl.

Na análise através da MEV foi dada preferência para a observação do túbulo dentinário no sentido transversal. Procurou-se observar a estrutura dentinária no fundo da meia cana do canal radicular de cada hemirraiz, isto é, no local onde se obteve uma vista da entrada dos túbulos dentinários de forma circular. Isto facilitou a visualização da dentina peri e intertubular (QUIAN; SHEN; HAAPASALO, 2011).

Nas amostras da MEV foi realizada tanto a análise qualitativa, quanto quantitativa da presença de *debris* e lama dentinária nas paredes dos canais e a erosão na dentina peri e intertubular. Os resultados obtidos nas análises qualitativa da MET e da MEV e quantitativa da MEV foram semelhantes em todos os grupos e, nas três análises, foi evidenciada a extensa erosão tanto da dentina peri como da

intertubular no grupo do NaOCl com AUP (G8). Esse fato demonstra a importância da análise qualitativa como um dado que reforça os achados quantitativos, confirmando as evidências desse estudo.

Os quatro escores estabelecidos para avaliar a remoção de *debris* e lama dentinária e erosão dentinária foram baseados em critérios quantitativos (<50% ou >50%) de acordo com van der Sluis *et al.* (2010). Foi evitado o uso de critérios subjetivos (KUAH *et al.*, 2009) que poderiam contribuir para diminuir a concordância intra e inter observadores. Como os dados não tiveram uma distribuição normal, para a análise estatística foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para a comparação entre os grupos e *post hoc* de Dunn para mostrar onde estavam as diferenças entre os grupos.

A análise quantitativa revelou que o grupo controle, os grupos do soro e da CHX apresentaram paredes moderadamente limpas. Os grupos do NaOCl e EDTA, NaOCl com AUP e NaOCl com AUP e EDTA foram os que apresentaram as paredes mais limpas, isto é, sem *debris* e com túbulos dentinários abertos. Diferentemente dos resultados encontrados em estudos anteriores (LEE; WU; WESSELINK, 2004; VAN DER SLUIS; WU; WESSELINK, 2005; LUI; KUAH; CHEN, 2007; KUAH *et al.*, 2009; CAPAR *et al.*, 2014), a utilização de EDTA e AUP não diminuiu a quantidade de *debris* quando associados ao soro e à CHX. Este fato também foi observado para a lama dentinária, isto é, a utilização de EDTA e/ou AUP não diminuiu a presença de lama dentinária, nos grupos do soro e da CHX, porém, nos grupos do NaOCl, o EDTA e/ou AUP diminuíram a presença da lama dentinária. Isso demonstrou que o EDTA e a AUP sem a dissolução de matéria orgânica realizada pelo NaOCl, não removeram a lama dentinária de maneira eficaz. Esse efeito químico do NaOCl já havia sido sugerido por van der Sluis (2010).

Quanto à erosão da dentina peritubular avaliada através da MEV, na maioria dos grupos essa estrutura se apresentou intacta, com exceção dos quatro grupos do NaOCl e do grupo do soro com AUP e EDTA. Neste último grupo, a dentina peritubular apresentou-se apenas ligeiramente modificada pela erosão. O grupo do NaOCl com AUP apresentou significativamente maior erosão que todos os demais ( $P < 0,05$ ); seguido dos grupos do NaOCl e EDTA e NaOCl com AUP e EDTA que apresentaram erosão menos acentuada da dentina peritubular que o grupo do NaOCl com AUP ( $P < 0,05$ ), porém maior que o grupo do NaOCl isolado. Resultados

semelhantes após uso de NaOCl e EDTA, foram encontrados em outros estudos (ÇALT; SERPER, 2002; ŞEM; ERTRÜK; PIŞKIN, 2009; ARSLAN et al., 2013).

O mesmo ocorreu em relação à erosão da dentina intertubular, onde o grupo do NaOCl com AUP apresentou maior erosão, porém não diferiu significativamente do NaOCl com AUP e EDTA e do NaOCl e EDTA ( $P > 0,05$ ). Os demais grupos não apresentaram erosão da dentina intertubular. Esse fato confirma os estudos de Mai *et al.* (2010) e Zhang *et al.* (2010) que evidenciaram que o EDTA como irrigante final causa erosão das paredes do canal radicular apenas quando o NaOCl é usado previamente.

Quando o EDTA isoladamente é usado ele remove os íons cálcio do tecido mineral, sendo a matéria orgânica o fator limitante para a continuação da dissolução inorgânica (OYARZÚN; CORDERO; WHITTLE, 2002). A aplicação subsequente de NaOCl remove a matéria orgânica e facilita a exposição da matriz inorgânica aumentando o efeito de desmineralização (PERDIGÃO *et al.*, 2001; DOGAN; ÇALT; 2001; SAYING *et al.*, 2007). Pode-se considerar que o EDTA apressa a ação destrutiva do NaOCl, pois ele remove a fase mineral da dentina que tem efeito protetor sobre o colágeno (MARENDING *et al.*, 2007a). A suposta agressividade do EDTA em causar erosão das paredes do canal radicular é atribuída ao uso associado e prolongado do NaOCl. Esse fenômeno foi confirmado nos grupos em que o EDTA foi utilizado com Soro ou com CHX, com ou sem AUP, e não ocorreu erosão. Şem, Ertrük e Pişkin (2009) verificaram que quanto maior a concentração de EDTA, maior foi o grau de erosão da dentina, de forma que a irrigação com EDTA 15% após NaOCl 2,5%, provocou severa erosão da dentina e indicaram o uso de EDTA a 1%. Mai *et al.*, (2010) postularam que quando o NaOCl é usado alternadamente com o EDTA ocorre um ciclo vicioso onde o colágeno exposto é dissolvido, em seguida o EDTA desmineraliza a fase apatita, expondo novamente o colágeno que será dissolvido por nova irrigação com NaOCl e assim sucessivamente. Através da desproteção, realizada pelo NaOCl e desmineralização, realizada pelo EDTA, a dentina é transformada em uma estrutura porosa com múltiplas irregularidades na dentina peri e intertubular (MAI *et al.*, 2010). No presente experimento, após o uso do EDTA, não foi utilizado NaOCl nos canais radiculares, pois a sequência de uso das soluções irrigadoras é um fator importante na determinação do grau de erosão. Mesmo assim, a área da superfície do túbulo aumentou e passou a ter uma forma tridimensional afunilada conforme descrito

anteriormente por Quian, Shen e Haapaslo (2011). Isso também foi evidenciado neste estudo, através da MEV nos grupos que utilizaram NaOCl e EDTA (G7), NaOCl com AUP(G8) e NaOCl com AUP e EDTA (G9) confirmando o que foi descrito anteriormente, pois o NaOCl dissolveu a porção orgânica da dentina, permitindo que o EDTA dissolvesse a porção inorgânica. Curiosamente, essas irregularidades ocorreram ainda mais acentuadamente, no grupo que foi utilizado NaOCl com AUP(G8), demonstrando que, mesmo sem a presença do EDTA, ocorreu uma erosão ainda mais severa da dentina peri e intertubular. Esse fato sugere uma ação sinérgica do NaOCl também com a AUP. No grupo onde foi utilizado o NaOCl isoladamente, a dentina peritubular apresentou-se ligeiramente aumentada e a dentina intertubular, intacta. Isso demonstra que a ação de dissolução orgânica foi limitada pela presença da hidroxiapatita.

As fitas afiladas de colágeno demonstradas neste estudo através da MET nas amostras representativas dos grupos 6 (NaOCl) e 8 (NaOCl + AUP), denunciam a dissolução orgânica ocorrida às custas do NaOCl. Na amostra em que foi utilizado apenas o NaOCl não foi evidenciada erosão da dentina, mas as fitas de colágeno apresentaram-se dispersas e com evidente dissolução, caracterizada pelo afilamento de suas extremidades. Alterações no colágeno dentinário também foram demonstradas através de avaliação imunohistoquímica, onde Oyzarzún, Cordero e Whittle (2003) verificaram que o NaOCl a 5% induz importantes alterações no colágeno intertubular desmineralizado e nos glicosaminoglicanos intratubulares, bem como o estudo mostrou o papel protetor da hidroxiapatita sobre a estabilidade da matriz orgânica.

Na amostra em que foi utilizado NaOCl com AUP, além do colágeno degradado, apareceram alargamentos globulares nos túbulos dentinários, sugerindo que o NaOCl fora lançado, pela transmissão acústica, para o interior dos mesmos, provocando dissolução do colágeno e erosão da dentina. A erosão na camada superficial e subsuperficial da dentina, causada por NaOCl e EDTA foi demonstrada por Zhang *et al.*, (2010) e por Mai *et al.*, (2010) que utilizaram MET com ampliações a partir de 7500X, onde foi possível observar a extensiva perda da dentina peri e intertubular, evidenciando um aspecto de túnel com túbulos alargados e intercomunicantes, estendendo-se para o interior da dentina, sob a interface resina-dentina. Essas alterações estenderam-se por até 25-30 µm, quando o NaOCl 5,25% foi utilizado por 60 minutos, seguidos de 2 minutos de EDTA 17% (MAI *et al.*,

2010). No presente estudo esse aspecto intercomunicante não foi evidenciado, pois na avaliação através da MET foram utilizadas ampliações maiores que naquele, isto é, de 10000, 100000 e 200000X, com o objetivo de observar o aspecto da ultraestrutura do colágeno.

Os resultados obtidos nessa pesquisa sugerem que o ultrassom potencializa a ação do NaOCl pelo efeito de cavitação acústica, através do qual são criadas novas bolhas ou pela expansão, contração e/ou distorção de bolhas preexistentes na solução irrigadora. Quando o NaOCl é ativado pelo ultrassom, a coalescência de bolhas conhecida por nucleação, é inibida e resulta em um maior número de pequenas bolhas (VAN DER SLUIS *et al.* 2010). Aparentemente os efeitos químicos do NaOCl são potencializados pela AUP. Isso poderia, em parte, ser explicado pelo aquecimento, que a solução sofre, quando ativada pelo ultrassom, pois, segundo Al-Jadaa *et al.*, (2009) a temperatura da solução, ativada por 30 segundos pelo ultrassom, aumentou para mais de 50°C. Entretanto Van Der Sluis *et al.* (2010), não concordam com a argumentação supracitada.

Na avaliação através da MEV, o grupo do NaOCl com AUP e EDTA (G9) apresentou extensa erosão da dentina peri e intertubular, porém significativamente menor do que o grupo que utilizou NaOCl com AUP (G8). Talvez isso tenha ocorrido devido à ação autolimitante do NaOCl que, mesmo com a presença de dois fatores de potencialização, a ativação ultrassônica e, em seguida, agente desmineralizante, não foi capaz de dissolver maior quantidade de matéria orgânica. Seguindo esse pensamento, o EDTA, após a AUP, encontraria menos hidroxiapatita para ser desmineralizada, de forma que não aumentaria a erosão.

Dentro dos limites deste estudo, a hipótese nula de que o NaOCl 2,5% empregado como solução irrigadora no preparo dos canais radiculares não provoca alterações estruturais e ultraestruturais na dentina foi rejeitada, semelhantemente ao estudo de Zhang *et al.* (2010a).

Os resultados parecem indicar que a ação do NaOCl foi potencializada tanto pela AUP, quanto pelo EDTA, e isso provocou grande impacto no grau de erosão da parede dentinária do canal radicular irrigado com essas soluções.

Como consequência desse efeito, tempo e concentração-dependente, do NaOCl sobre a porção orgânica da dentina, propriedades como dissolução de tecido e efeito antibacteriano, que são desejáveis no tratamento dos canais radiculares, parecem estar mutuamente interligados com efeitos indesejáveis (MARENDING *et*

*al.*, 2007a). Durante o período de um tratamento endodôntico, soluções concentradas de NaOCl podem causar efeitos nocivos na biomecânica da dentina, pois a microdureza da dentina diminuiu significativamente após irrigação com NaOCl 6% quando comparada à irrigação com NaOCl 2,5% por mais de 10 minutos (SLUTZKI-GOLDBERG *et al.*, 2004). É sabido que o componente mineral dos tecidos conjuntivos duros é responsável pela força e módulo de elasticidade, enquanto o colágeno é responsável pela resistência (ÇALT; SERPER, 2002; MARENDING *et al.*, 2007a e b). Alterações nessas estruturas podem repercutir clinicamente de forma negativa no dente tratado endodonticamente.

Embora não esteja totalmente compreendido o efeito da erosão sobre a tensão flexural e força de adesão da dentina, tem sido sugerido que uma extensiva erosão da dentina torna a raiz mais suscetível à fratura vertical além de colocar em risco as paredes da câmara pulpar, pois sua dentina permanece imersa no NaOCl por longos períodos durante a instrumentação dos canais (MAI *et al.*, 2010). Além disso, devido à utilização crescente de cimentos obturadores à base de resina e de cimentos resinosos utilizados para a cimentação de retentores intrarradiculares, a adesão dentinária, cresce em importância, uma vez que esta pode ser prejudicada pelas alterações que ocorrem na ultraestrutura dentinária decorrente do uso das soluções irrigadoras. Quando o colágeno dentinário é dissolvido pelo NaOCl ocorre a liberação de oxigênio que pode interferir na polimerização das resinas e cimentos resinosos. A força de adesão da resina com uma dentina tratada com NaOCl, previamente ao condicionamento ácido, fica diminuída. Portanto, o NaOCl residual pode interferir na polimerização e adesão da resina devido à liberação de oxigênio (MORRIS *et al.* 2001; ARI; YAŞAR; BELLÍ, 2003). Ishizuka *et al.* (2001) demonstraram que o NaOCl interfere na capacidade de adesão dos adesivos autocondicionantes, mas não interfere nos sistemas de adesão úmidos. Outro estudo mostrou que NaOCl e o RC-Prep reduziram significativamente a força de adesão resina-dentina. Entretanto, a aplicação de ácido ascórbico 10%, ou ascorbato sódico 10%, ou da solução de tiosulfato de sódio 10% removem o NaOCl residual através de uma reação de oxidação-redução (MORRIS *et al.*, 2001). A força de adesão dos cimentos resinosos à dentina é adversamente influenciada pelo NaOCl (SASAFUCHI; NIKAIDO; TAGAMI, 2003). Existe uma correlação entre o período de tratamento com NaOCl e a força de adesão, que aumenta à medida que diminui o tempo de exposição. Foi demonstrado que os cimentos adesivos

autopolimerizáveis apresentaram maior força de adesão do que os cimentos resinosos de polimerização *dual* e, por isso, deve ser dada preferência aos cimentos adesivos autopolimerizáveis para a cimentação de pinos intracanais (ARI; YAŞAR; BELLÍ, 2003). A adesão à dentina depende da presença do cálcio. A remoção do cálcio da dentina pode ser mais prejudicial à adesão dos sistemas adesivos baseados no condicionamento da dentina do que dos adesivos baseados em *primers* autocondicionantes (PERDIGÃO *et al.*, 2001). A resistência adesiva, avaliada através de teste de cisalhamento, depende do sistema adesivo, do substrato e da interação adesivo/profundidade (BAWA; HEDGE, 2012). Sengun, Orucoglu e Ülker (2013) verificaram que a força de adesão de um adesivo autocondicionante à dentina previamente tratada com NaOCl foi semelhante ao grupo controle que utilizou água destilada, apenas quando foi usado H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> com NaOCl que a resistência de união diminuiu significativamente, devido à presença do oxigênio. Esses fatores desempenham um potencial clínico relevante e devem ser considerados no momento da escolha do protocolo de irrigação a ser utilizado.

Considerando-se que, com o uso da AUP, a solução irrigadora penetra mais profundamente na dentina, a ação antimicrobiana é potencializada com o seu uso. Dessa forma, poder-se-ia considerar que em canais onde é realizada a AUP da solução irrigadora, seja ela NaOCl ou CHX teriam uma desinfecção aumentada (HALFORD *et al.*, 2012). Por outro lado, alguns autores não encontraram diferenças na desinfecção dos canais quando a AUP foi comparada à irrigação final com CHX (BEUS *et al.*, 2012; PAIVA *et al.*, 2012; CASE *et al.*, 2012). Nessa ordem de considerações Liang *et al.* (2013) em um ensaio clínico randomizado controlado, não encontraram diferenças na cura de lesões periapicais de dentes anteriores em que foi utilizada AUP comparado com os dentes em que foi utilizada apenas irrigação com seringa de NaOCl 5,25%. Outro ensaio semelhante, em dentes anteriores, comparou a eficácia do sistema de irrigação através de pressão apical negativa com a irrigação convencional com agulha, demonstrando que não ocorreram diferenças entre os grupos (PAWAR *et al.*, 2012). Entretanto, nos dois ensaios clínicos, foram utilizados dentes unirradulares onde mesmo a irrigação com seringa é eficaz, pois permite uma melhor distribuição do soluto irrigador no terço apical do canal radicular, favorecendo a limpeza e desinfecção. Um ensaio clínico randomizado, realizado em dentes posteriores comparou a irrigação final simples não ativada, utilizando apenas NaOCl 1%, com a multi-irrigação ultrassônica passiva, do NaOCl 1%, EDTA 17% e

CHX 2%, e não demonstrou diferença significativa, quanto à frequência de culturas negativas entre os métodos de irrigação. Ambos apresentaram alta frequência de culturas negativas na luz do canal principal (BEUS; SAFAVI *et al.*, 2012). Os autores atribuíram esses resultados ao alto volume de irrigante e à profundidade da agulha de irrigação.

Os resultados dos estudos apontam para a importância da irrigação cuidadosa, seja ela com pressão negativa, ativada ou convencional e induzem à reflexão sobre concentração e tempo de uso do NaOCl. Foi sugerido o uso de NaOCl em baixas concentrações como a 1% (KAYA; YIĞIT-ÖZER; ADIGÜZEL, 2011) e a 0,5% no uso rotineiro durante o tratamento endodôntico para minimizar qualquer efeito de desproteínação dentinária induzida pelo NaOCl (HU *et al.*, 2010). Além disso, alguns estudos ressaltam o uso de baixas concentrações de EDTA, como a 1% (ŞEN; ERTRÜK; PIŞKIN, 2009;) e curtos períodos de exposição da dentina ao EDTA (ÇALT; SERPER, 2002; MARENDING *et al.*, 2007b; UZUNUOĞLU *et al.*, 2012), bem como o cuidado com a sequência de irrigação utilizada (QUIAN; SHEN; HAAPASALO, 2011).

A relevância clínica deste estudo é demonstrada no fato de alertar o profissional que irá restaurar o dente tratado endodonticamente, sobre as alterações que ocorrem na ultraestrutura dentinária frente aos diferentes protocolos de irrigação, que podem interferir tanto na sua resistência mecânica, quanto na adesão ao material restaurador. A correta integração entre os profissionais envolvidos no tratamento endodôntico e restaurador permitirá adequar os protocolos de irrigação empregados à escolha do material restaurador, principalmente quando a adesão em Odontologia está envolvida.

Baseado na presente pesquisa e considerando que a AUP pode representar um importante auxílio na irrigação dos canais radiculares, novos questionamentos são inevitáveis. Sendo assim, estudos futuros são necessários para determinar a profundidade da erosão que ocorre nas paredes dentinárias quando da utilização da associação de NaOCl com AUP e/ou EDTA e o quanto essa erosão afeta estruturalmente o dente e a sua longevidade. Por outro lado, é necessário delinear protocolos de irrigação, com tempo, concentração e sequência de soluções irrigadoras definidas, que promovam a limpeza e a desinfecção da dentina produzindo o mínimo de efeitos indesejáveis ao dente.

## 6 CONCLUSÕES

Diante das condições experimentais e dos resultados obtidos no presente estudo, é lícito concluir que:

- o NaOCl 2,5% promoveu alteração na ultraestrutura do colágeno das paredes dos canais radiculares;
- o NaOCl 2,5% promoveu maior limpeza, mas também erosão da dentina peri e intertubular;
- a AUP potencializou a ação erosiva do NaOCl 2,5% sobre as paredes dentinárias;
- a AUP associada ao soro ou à CHX 2% não causou alteração na ultraestrutura da dentina;
- a ação sinérgica entre NaOCl 2,5% com AUP e/ou EDTA 17% promoveu maior limpeza, porém provocou maior erosão nas paredes dentinárias;
- a água destilada, o soro e a clorexidina 2% não provocaram alteração na ultraestrutura dentinária.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACKAY, I., SEN, B.H. The Effect of Surfactant Addition to EDTA on Microhardness of Root Dentin. **J Endod**, v. 38, n. 5, p. 704–7, May. 2012.

ADIGÜZEL, Ö., *et al*. Effectiveness of ethylenediaminetetracetic acid (EDTA) and MTAD on debris and smear layer removal using a self-adjusting file. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**. v. 112, n. 6, p. 803-8, Dec. 2011.

AHMAD, M., *et al*. Ultrastructural and histochemical evaluation of appositional mineralization of circumpulpal dentin at the crown- and root-analog portions of rat incisors. **J Electr Microscopy**. v. 60, n. 1, p. 79–87, Jan. 2011.

AL-JADAA, A., *et al*. Necrotic pulp tissue dissolution by passive ultrasonic irrigation in simulated accessory canals: impact of canal location and angulation. **Int Endod J**. v. 42, n. 1, p. 59-65, Jan. 2009.

ALVES, F.R.E., *et al*. Time-dependent antibacterial effects of the Self-Adjusting File used with two sodium hypochlorite concentrations. **J Endod**. v. 37, n. 10, p. 1451-5, Oct. 2011.

ARI, H., ERDEMIR, A. Effects of Endodontic Irrigation Solutions on Mineral Content of Root Canal Dentin Using ICP-AES Technique. **J Endod**. v. 31, n. 3, p. 187-9, Mar. 2005.

ARI, H., ERDEMIR, A., BELLI, S. Evaluation of the Effect of Endodontic Irrigation Solutions on the Microhardness and the Roughness of Root Canal Dentin. **J Endod**. v. 30, n. 11, p. 792-5, Nov. 2004.

ARI, H., YAŞAR, E., BELLÍ S. Effects of NaOCl on bond strengths of resin cements to root canal dentin. **J Endod**. v. 29, n. 4, p. 248-51, Apr. 2003.

ARSLAN, H., *et al*. Effect of Agitation of EDTA with 808-Nanometer Diode Laser on Removal of Smear Layer. **J Endod**. v. 39, n. 12, p. 1589–92, Dec. 2013.

ASSIS, D.F., PRADO, M., SIMÃO, R.A. Evaluation of the Interaction between Endodontic Sealers and Dentin Treated with Different Irrigant Solutions. **J Endod**. v. 37, n. 11, p. 1550-2, Nov. 2011.

BABB, B.R., *et al*. Bonding of Self-adhesive (Self-etching) Root Canal Sealers to Radicular Dentin. **J Endod**. v. 35, n. 4, p. 578-82, Apr. 2009.

BACA, P., *et al*. Antimicrobial Substantivity over Time of Chlorhexidine and Cetrimide. **J Endod**. v. 38, n. 7, p. 927–30, Jul. 2012.

BARRIOS, R., *et al*. Antimicrobial Substantivity of Alexidine e Chlorexidine in Dentin. **J Endod**. v. 39, n. 11, p. 1413-5, Nov. 2013.

BASRANI, B.R., *et al.* Determination of 4-chloroaniline and its derivatives formed in the interaction of sodium hypochlorite and chlorhexidine by using gas chromatography. **J Endod.** v. 36, n. 2, p. 312-4, Feb. 2010.

BASRANI, B.R., *et al.* Interaction between sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate. **J Endod.** v. 33, n. 8, p. 966-9, Aug. 2007.

BAUMGARTNER, J. C., MADER, C.L. A Scanning Electron Microscopic Evaluation of Four Root Canal Irrigation Regimens. **J Endod.** v. 13, n. 4, p. 147-56, Apr. 1987.

BAWA, S., HEDGE, M.N. Comparative evaluation of the shear bond strength of a total etch adhesive with a self-etching primer on an endodontically treated teeth. **World J Dent.** v. 3, n. 3, p. 247-49, Mar. 2012.

BERBER, V.B., *et al.*, Efficacy of various concentrations of NaOCl and instrumentation techniques in reducing *Enterococcus faecalis* within root canals and dentinal tubules. **Int Endod J.** v. 39, n. 1, p. 10-7, Jan. 2006.

BERTASSONI, L. E., STANKOSKA, K., SWAIN, M.V. Insights into the structure and composition of the peritubular dentin organic matrix and the lamina limitans. **Micron.** v. 43 p. 229–236, 2012.

BEUS, C., *et al.* Comparison of the Effect of Two Endodontic Irrigation Protocols on the Elimination of Bacteria from Root Canal System: A Prospective, Randomized Clinical Trial. **J Endod.** v. 38, n. 11, p. 1479–83, Nov. 2012.

BLANK-GONÇALVES, L.M., *et al.* Qualitative Analysis of the Removal of the Smear Layer in the Apical Third of Curved Roots: Conventional Irrigation versus Activation Systems. **J Endod.** v. 37, n. 9, p. 1268–71. Sep. 2011.

BUI, T.B., BAUMGARTNER, J.C., MITCHELL, J.C. Evaluation of the Interaction between Sodium Hypochlorite and Chlorhexidine Gluconate and its Effect on Root Dentin. **J Endod.** v. 34, n. 2, p. 181–15, Feb. 2008.

BUKIET, F., *et al.* Wetting properties and critical micellar concentration of benzalkonium chloride mixed in sodium hypochlorite. **J Endod.** v. 38, n. 11, p. 1525-9, Nov. 2012.

ÇALT, S., A. SERPER. Time-dependent effects of EDTA on dentin structures. **J Endod.** v. 28, n. 1, p. 17–9, Jan. 2002.

CAMARGO, C.H.R., *et al.* Topographical, diametral, and quantitative analysis of dentin tubules in the root canals of human and bovine teeth. **J Endod.** v. 33, n. 4, p. 422-6, Apr. 2007.

CAPAR, I.D., *et al.* Effect of Different Final Irrigation Methods on the Removal of Calcium Hydroxide from an Artificial Standardized Groove in the Apical Third of Root Canals. **J Endod.** v. 40, n. 3, p. 451–4, Mar. 2014.

CASE, P.D., *et al* . Treatment of Root Canal Biofilms of *Enterococcus faecalis* with Ozone Gas and Passive Ultrasound Activation. **J Endod.** v. 38, n. 4, p. 523–6, Apr. 2012.

CASTELO-BAZ, P., *et al* . In Vitro Comparison of Passive and Continuous Ultrasonic Irrigation in Simulated Lateral Canals of Extracted Teeth. **J Endod.** v. 38, n. 5, p. 688–691, May. 2012.

CECCHIN, D., *et al* . Influence of Sodium Hypochlorite and EDTA on the Microtensile bond strength of a self-etching adhesive system. **J Appl Oral Sci.** v. 18, n. 4, p. 385–9, Apr. 2010.

CHEUNG, G.S., STOCK, C. J. In vitro cleaning ability of root canal irrigants with and without endosonics. **Int Endod J.** v. 26, n. 6, p. 334-43, Jul. 1993.

CHOPRA, S., MURRAY, P.E., NAMEROW, K.N. A Scanning Electron Microscopic Evaluation of the Effectiveness of the F-file versus Ultrasonic Activation of a K-file to Remove Smear Layer. **J Endod.** v. 34, n. 10, p. 1243–5, Oct. 2008.

CLARK-HOLKE, D., *et al* . Bacterial penetration through canals of endodontically treated teeth in the presence or absence of the smear layer. **J Dent.** v. 31, n. 4, p. 275-81, Apr. 2003.

CLARKSON, R.M., *et al* . The effect of surfactant on the dissolution of porcine pulpal tissue by sodium hypochlorite solutions. **J Endod.** v. 38, n. 9, p. 1257-60, Sep. 2012.

ÇOBANKARA, F.K., *et al.*, A quantitative evaluation of apical leakage of four root-canal sealers. **Int Endod J.** v. 35, n. 12, p. 979-84, Dec. 2002.

CURTIS, T.O., SEDGLEY, C.M. Comparison of a Continuous Ultrasonic Irrigation Device and Conventional Needle Irrigation in the Removal of Root Canal Debris. **J Endod.** v. 38, n. 9, p. 1261–4, Sep. 2012.

DAI, X.F., TEN CATE, A.R., LIMEBACK, H. The extent and distribution of intratubular collagen fibrils in human dentine. **Arch Oral Biol.** v. 36, n. 10, p. 775-8, Oct. 1991.

DAMETTO, F.R., *et al* . In vitro assessment of the immediate and prolonged antimicrobial action of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant against *Enterococcus faecalis*. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** v. 99, n. 6, p. 768-72, Jun. 2005.

DE DEUS G., *et al* . Longitudinal and quantitative evaluation of dentin demineralization when subject to EDTA, EDTAC and citric acid: a co-site digital optical microscopy study. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** v. 105, n. 3, p. 391-7, Mar. 2008.

DOĞAN H., ÇALT S. Effects of Chelating Agents and Sodium Hypochlorite on Mineral Content of Root Dentin. **J Endod.** v. 27, n. 9, p. 578-80, Sep. 2001.

- DORNELLES-MORGENTAL, R., *et al.* Antibacterial efficacy of endodontic irrigating solutions and their combinations in root canals contaminated with *Enterococcus faecalis*. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** v. 112, n. 3, p. 396-400, Mar. 2011.
- DUTTA, A., SAUNDERS, W. P. Comparative evolution of calcium hypochlorite and sodium hypochlorite on soft-tissue dissolution. **J Endod.** v. 38, n. 10, p. 1395-8, Oct. 2012.
- ECONOMIDES, N., *et al.*, Comparative study of apical sealing ability of a new resin-based root canal sealer. **J Endod.** v. 30, n. 6, p. 403-5, Jun. 2004.
- FERRAZ, C.C.R., *et al.* In vitro assessment of the antimicrobial action and the mechanical ability of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant. **J Endod.** v. 27, n. 7, p. 452-5, Jul. 2001.
- GOEL, S., TEWARI, S. Smear layer removal with passive ultrasonic irrigation and the NaviTip FX: a scanning electron microscopic study. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** v. 108, n. 3, p. 465-70. 2009.
- GONZÁLEZ-LÓPEZ, S., *et al.* Effect of CHX on the Decalcifying Effect of 10% Citric Acid, 20% Citric Acid, or 17% EDTA. **J Endod.** v. 32, n. 8, p. 781–4. 2006.
- GRANDE, N.M., *et al.* Interaction between EDTA and Sodium Hypochlorite: A Nuclear Magnetic Resonance Analysis. **J Endod.** v. 32, n. 5, p. 460-4, May. 2006.
- GREGORIO, C., *et al.* Efficacy of different irrigation and activation systems on the penetration of sodium hypochlorite into simulated lateral canals and up to working length: an in vivo study. **J Endod.** v. 36, n. 7, p. 1216-21, Jul. 2010.
- GROSSMAN, L.I. Irrigation of root canals. **J Amer Dent Assoc.** v. 30, n. 12, p. 1915-7, Dec. 1943.
- GRÜNDLING, G.L., *et al.* Effect of Ultrasonics on *Enterococcus faecalis* Biofilm in a Bovine Tooth Model. **J Endod.** v. 37, n. 8, p. 1128–33, Aug. 2011.
- GU, L.S., *et al.* Review of contemporary irrigant agitation techniques and devices. **J Endod.** v. 35, n. 6, p. 791–804, Jun. 2009.
- GUERISOLI, D.M.Z., *et al.* Evaluation of smear layer removal by EDTAC and sodium hypochlorite with ultrasonic agitation. **Int Endod J.** v. 35, n.5. p. 418–21. May. 2002.
- HAAPASALO, M., *et al.* Irrigation in Endodontics. **Dent Clin N Am.** v. 54, n.2, p. 291–312. 2010.
- HALFORD, A., *et al.* Synergistic Effect of Microbubble Emulsion and Sonic or Ultrasonic Agitation on Endodontic Biofilm in Vitro. **J Endod.** v. 38, n. 11, p. 1530–4, Nov. 2012.

HASHEM, A.A.R., *et al.* The Effect of Different Irrigating Solutions on Bond Strength of Two Root Canal-filling Systems. **J Endod.** v. 35, n. 4, p. 537-40. 2009.

HU, X., *et al.* Effects of Concentrations and Exposure Times of Sodium Hypochlorite on Dentin Deproteinization: Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared Spectroscopy Study. **J Endod.** v. 36, n. 12, p. 2008–11, Dec. 2010.

ISHIZUKA, T., *et al.* Effect of NaOCl treatment on bonding to root canal dentin using a new evaluation method. **Dent Mater J.** v. 20, n. 1, p. 24-33, Jan. 2001.

JÁGR, M., *et al.* Comprehensive proteomic analysis of human dentin. **Eur J Oral Sci.** v. 120, n. 4, p. 259–68, Apr. 2012.

JIANG, L.M., *et al.* Influence of the oscillation direction of an ultrasonic file on the cleaning efficacy of passive ultrasonic irrigation. **J Endod.** v. 36, n. 8, p. 1372-6, Aug. 2010. (a)

JIANG, L.M., *et al.* An evaluation of the effect of pulsed ultrasound on the cleaning efficacy of passive ultrasonic irrigation. **J Endod.** v. 36, n. 11, p. 1887-91, Nov. 2010. (b)

JIANG, L.M., *et al.* Comparison of the Cleaning Efficacy of Different Final Irrigation Techniques. **J Endod.** v. 38, n. 6, p. 838–41, Jun. 2012.

JOHN C., LÖST C., ELAYOUTI A. Ultrasonic monitoring of the effect of sodium hypochlorite on the elasticity of dentine. **Int Endod J.** v. 46, n. 5, p. 477–82, May. 2013.

JOHNSON, M., *et al.* Canal and Isthmus Debridement Efficacy Using a Sonic Irrigation Technique in a Closed-canal System. **J Endod.** v. 38, n. 9, p. 1265–8, Sep. 2012.

KAMEL, W.H., KATAIA, E.M. Comparison of the Efficacy of Smear Clear with and without a Canal Brush in Smear Layer and Debris Removal from Instrumented Root Canal Using WaveOne versus ProTaper: A Scanning Electron Microscopic Study. **J Endod.** v. 40, n. 3, p. 446–50, Mar. 2014.

KANTER, V., *et al.* A quantitative and qualitative analysis of ultrasonic versus sonic endodontic systems on canal cleanliness and obturation. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** v. 112, n. 12, p. 809-13, Dec. 2011.

KAYA, S., YIĞIT-ÖZER, S., ADIGÜZEL, Ö. Evaluation of radicular dentin erosion and smear layer removal capacity of Self-Adjusting File using different concentrations of sodium hypochlorite as an initial irrigant. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** v. 112, n. 4, p. 524-30, Oct. 2011.

KOKKAS, A.B., *et al.* The influence of smear layer on dentinal tubule penetration depth by three root canal sealers: an in vitro study. **J Endod.** v. 30, n. 2, p. 100-2, Feb. 2004.

KUAH, H.G., *et al.* The effect of EDTA with and without ultrasonics on removal of smear layer. **J Endod.** v. 35, n. 3, p. 393-6, Mar. 2009.

KUGA, M.C., *et al.* Penetration into dentin of sodium hypochlorite associated with acid solutions. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** v. 112, n. 12, p. 155-9, Dec. 2011.

LEE, S.J., WU, M.K., WESSELINK, P.R. The effectiveness of syringe irrigation and ultrasonics to remove debris from simulated irregularities within prepared root canal walls. **Int Endod J.** v. 37, n. 10, p. 672-8, Oct. 2004.

LIANG, Y.H., *et al.* Radiographic Healing after a Root Canal Treatment Performed in Single-rooted Teeth with and without Ultrasonic Activation of the Irrigant: A Randomized Controlled Trial. **J Endod.** v. 39, n. 10, p. 1218–25, Oct. 2013.

LIN, J., SHEN, Y., HAAPASALO, M.A. Comparative Study of Biofilm Removal with Hand, Rotary Nickel-Titanium, and Self-Adjusting File Instrumentation Using a Novel In Vitro Biofilm Model. **J Endod.** v. 39, n. 5, p. 658–63, May. 2013.

LOPES, H.P., SIQUEIRA JR, J.F., ELIAS, C.N. Substâncias químicas empregadas no preparo dos canais radiculares. In: Lopes, H.P., J.F. Siqueira Jr. **Endodontia: Biologia e Técnica.** 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A. 2004. p. 535-79. cap 18.

LOTFI, M., *et al.* Effect of MTAD as a Final Rinse on Removal of Smear Layer in Ten-minute Preparation Time. **J Endod.** v. 38, n. 10, p. 1391-4, Oct. 2012.

LUI, J.N., KUAH, H.G., CHEN, N.N. Effect of EDTA with and without surfactants or ultrasonics on removal of smear layer. **J Endod.** v. 33, n. 4, p. 472-5, Apr. 2007.

MAI, S., *et al.* Differential aggressiveness of ethylenediamine tetraacetic acid in causing canal wall erosion in the presence of sodium hypochlorite. **J Dentistry.** v. 38, n. 3, p. 201–6, Mar. 2010.

MALENTACCA, A., *et al.* Efficacy and Safety of Various Active Irrigation Devices When Used with Either Positive or Negative Pressure: An In Vitro Study. **J Endod.** v.38, n. 12, p. 1622–6, Dec. 2012.

MALKI, M., *et al.* Irrigant Flow beyond the Insertion Depth of an Ultrasonically Oscillating File in Straight and Curved Root Canals: Visualization and Cleaning Efficacy. **J Endod.** v. 38, n. 5, p. 657–61, May. 2012.

MANCINI, M., *et al.* Smear Layer Removal and Canal Cleanliness Using Different Irrigation Systems (EndoActivator, EndoVac, and Passive Ultrasonic Irrigation): Field Emission Scanning Electron Microscopic Evaluation in an In Vitro Study. **J Endod.** v. 39, n. 11, p. 1456–60, Nov. 2013.

MARCHESAN, M.A., *et al.* Chemical analysis of the flocculate formed by the association of sodium hypochlorite and chlorhexidine. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** v. 103, n. 5, p. e103-e105, May. 2007.

MARENDING, M., *et al* . Effects of sodium hypochlorite on human root dentine-mechanical, chemical and structural evaluation. **Int Endod J**. v. 40, n. 10, p. 786–93, Oct. 2007. (a)

MARENDING, M., *et al* . Impact of irrigant sequence on mechanical properties of human root dentin. **J Endod**. v. 33, n. 11, p. 1325–8, Nov. 2007. (b)

MARSHALL JR, G.W., *et al* . The dentin substrate: structure and properties related to bonding. **J Dent**. v. 25, n. 6, p. 441-58, Jun. 1997.

MAYER, B.E., PETERS, O.A., BARBAKOW, F. Effects of rotary instruments and ultrasonic irrigation on debris and smear layer scores: a scanning electron microscopic study. **Int Endod J**. v. 35, n. 7, p. 582–9. Jul. 2002.

MELLO, I., COIL, J., ANTONIAZZI, J.H. Does a final rinse to remove smear layer interfere on dentin permeability of root canals? **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**. v. 107, n. 4, p. e47–e51, Apr. 2009.

MELLO, I., *et al*. Influence of Final Rinse Technique on Ability of Ethylenediaminetetracetic Acid of Removing Smear Layer. **J Endod**. v. 36, n. 3, p. 512-4, Mar. 2010.

MELLO, I., *et al*. Influence of different volumes of EDTA for final rinse on smear layer removal. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**. v. 106, n. 5, p. e40–e43, Nov. 2008.

MERINO, A., *et al*. The effect of different taper preparations on the ability of sonic and passive ultrasonic irrigation to reach the working length in curved canals. **Int Endod J**. v. 46, n. 5, p. 427–33, May. 2013.

MONTES, G.S., JUNQUEIRA, L.C.U. The use of picrosírius-polarization method for the study of the biopathology of collagen. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 86, p. 1-11, supl. III. 1991.

MOREIRA, D.M., *et al*. Structural analysis of bovine root dentin after use of different endodontics auxiliary chemical substances. **J Endod**. v. 35, n. 7, p. 1023–7, Jul. 2009.

MOREIRA, D.M., *et al* . Effects of Reducing Agents on Birefringence Dentin Collagen after Use of Different Endodontic Auxiliary Chemical Substances. **J Endod**. v. 37, n. 10, p. 1406–11, Oct. 2011.

MORETTO, S.G., *et al*. Effects of Ultramorphological Changes on Adhesion to Lased Dentin-Scanning Electron Microscopy and Transmission Electron Microscopy Analysis. **Micr Res Techn**. v. 74, n. 8, p. 720–6, Aug. 2011.

MORRIS, M.D., *et al*. Effects of sodium hypochlorite and RC-Prep on bond strengths of resin cement to endodontic surfaces. **J Endod**. v. 27, n. 7, p. 753-7, Jul. 2001.

MUNOZ, H.R., CAMACHO-CUADRA, K. In Vivo Efficacy of Three Different Endodontic Irrigation Systems for Irrigant Delivery to Working Length of Mesial Canals of Mandibular Molars. **J Endod.** v. 38, n. 4, p. 445–8, Apr. 2012.

NAIR, P.N.R. On the causes of persistent apical periodontitis: a review. **Int Endod J.** v. 39, n. 4, p. 249–81, Apr. 2006.

NIKAIDO, T., *et al.* Bond strengths to endodontically-treated teeth. **Am J Dent.** v. 12, n. O, p. 177-80, O. 1999.

NOWICKI, J.B., SEM, D.S. An In Vitro Spectroscopic Analysis to Determine the Chemical Composition of the Precipitate Formed by Mixing Sodium Hypochlorite and Chlorhexidine. **J Endod.** v. 37, n. 7, p. 983–8, Jul. 2011.

OLIVEIRA, L.D., *et al.* Effects of chlorexidine and sodium hypochlorite on the microhardness of root dentin. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** v. 104, n. 10, p. e125-e128, Oct. 2007.

OYARZÚN, A., CORDERO, A.M., WHITTLE, M. Immunohistochemical Evaluation of the Effects of Sodium Hypochlorite on Dentin Collagen and Glycosaminoglycans. **J Endod.** v. 28, n. 3, p. 152-6, Mar. 2002.

OZDEMIR, H.O., *et al.* Chemical and Ultramorphologic Effects of Ethylenediaminetetraacetic Acid and Sodium Hypochlorite in Young and Old Root Canal Dentin **J Endod.** v. 38, n. 2, p. 204–8, Feb. 2012.

PAIVA, S.S.M., *et al.* Supplementing the Antimicrobial Effects of Chemomechanical Debridement with Either Passive Ultrasonic Irrigation or a Final Rinse with Chlorhexidine: A Clinical Study. **J Endod.** v. 38, n. 9, p. 1202-6, Sep. 2012.

PAQUÉ, F., *et al.* Hard-Tissue Debris Accumulation Analysis by High-Resolution Computed Tomography Scans. **J Endod.** v. 35, n. 7, p. 1044–7, Jul. 2009.

PAQUÉ, F., RECHENBER, D.C., ZEHNDER, M. Reduction of hard-tissue debris accumulation during rotary root canal instrumentation by etidronic acid in a sodium hypochlorite irrigation. **J Endod.** v. 38, n. 5, p. 692-5, May. 2012.

PASHLEY, D.H. Dynamics of the pulpo-dentin complex. **Crit Rev Oral Biol Med.** v. 7, n. 2, p. 104-33, Feb. 1996.

PAWAR, R., *et al.* Influence of an Apical Negative Pressure Irrigation System on Bacterial Elimination during Endodontic Therapy: A Prospective Randomized Clinical Study. **J Endod.** v. 38, n. 9, p. 1177–81, Sep. 2012.

PERDIGÃO, J., *et al.* Effect of calcium removal on dentin bond strengths. **Quintessence Int.** v. 32, n. 2, p. 142-6, Feb. 2001.

PETERS, O.A. Current challenges and concepts in the preparation of root canal systems: a review. **J Endod.** v. 30, n. 8, p. 559-67, Aug. 2004.

PETERS, O.A., SCHONENBERGER, K., LAIB, A. Effects of four Ni-Ti preparation techniques on root canal geometry assessed by micro computed tomography. **Int Endod J.** v. 34, n. 3, p. 221-30, Mar. 2001.

PLOTINO, G., *et al.* Ultrasonics in endodontics: a review of the literature. **J Endod.** v. 33, n. 2, p. 81-95, Feb. 2007.

POGGIO, C., *et al.* Decalcifying Effect of Different Ethylenediaminetetraacetic Acid Irrigating Solutions and Tetraclean on Root Canal Dentin. **J Endod.** v. 38, n. 9, p. 1239-43, Sep. 2012.

PRADO, M., *et al.* Scanning electron microscopic investigation of the effectiveness of phosphoric acid in smear layer removal when compared with EDTA and citric acid. **J Endod.** v. 37, n. 2, p. 255-8, Feb. 2011.

QIAN, W., SHEN, Y., HAAPASALO, M. Quantitative Analysis of the Effect of Irrigant Solution Sequences on Dentin Erosion. **J Endod.** v. 37, n. 10, p. 1437–41, Sep. 2011.

RASIMICK, B.J., *et al.* Interaction between Chlorhexidine Digluconate and EDTA. **J Endod.** v. 34, n. 12, p. 1521-3, Dec. 2008.

RASIMICK, B.J., *et al.* Stability of Doxycycline and Chlorhexidine Absorbed on Root Canal Dentin. **J Endod.** v. 36, n. 3, p. 489-92, Mar. 2010.

RENOVATO, S.R., *et al.* Effect of calcium hydroxide and endodontic irrigants on fibre post bond strength to root canal dentine. **Int Endod J.** v. 46, n. 8, p. 738–46. 2013.

RÔÇAS, I.N., SIQUEIRA JR, F. Comparison of the In Vivo Antimicrobial Effectiveness of Sodium Hypochlorite and Chlorhexidine Used as Root Canal Irrigants: A Molecular Microbiology Study. **J Endod.** v. 37, n. 2, p. 143–50, Feb. 2011.

RÖDING, T., *et al.* Efficacy of syringe irrigation, RinsEndo® and passive ultrasonic irrigation in removing debris from irregularities in root canals with different apical sizes. **Int Endod J.** v. 43, n.7, p. 581–9. Jul. 2010.

ROSSI-FEDELE, G., *et al.* Antagonistic Interactions between Sodium Hypochlorite, Chlorhexidine, EDTA, and Citric Acid. **J Endod.** v. 38, n. 4, p. 426–31, Apr. 2012.

ROSSI-FEDELE, G., *et al.* The effect of surface tension reduction on the clinical performance of sodium hypochlorite in endodontics. **Int Endod J.** v. 46, n. 6, p. 492-8, Jun. 2013.

SABER, S.E.D., HASHEM, A.A.R. Efficacy of Different Final Irrigation Activation Techniques on Smear Layer Removal. **J Endod.** v. 37, n. 9, p. 1272–5. 2011.

SABINS, R.A., JOHNSON, J.D., HELLSTEIN, J.W. A comparison of the cleaning efficacy of short-term sonic and ultrasonic passive irrigation after hand instrumentation in molar root canals. **J Endod.** v. 29, n. 10, p. 674-8, Oct. 2013.

SALEH, I.M., *et al.* The effects of dentine pretreatment on the adhesion of root-canal sealers. **Int Endod J.** v. 35, n. 10, p. 859-866, Oct. 2002.

SANTOS, J.N., *et al.* Effect of chemical irrigants on the bond strength of a self-etching adhesive to pulp chamber dentin. **J Endod.** v. 32, n. 11, p. 1088-90, Nov. 2006.

SASAFUCHI, Y., NIKAIDO, T., TAGAMI, J. Effect of chemical irrigants and medicaments for endodontic treatment on dentin bonding. **Int Chin J Dent.** v. 3, n. 1, p. 7-12, Jan. 2003.

SAYIN, T.C., *et al.* Calcium Loss From Root Canal Dentin Following EDTA, EGTA, EDTAC, and Tetracycline-HCl Treatment With or Without Subsequent NaOCl Irrigation. **J Endod.** v. 33, n. 5, p. 581-4, May. 2007.

SCHILKE, R., *et al.* Comparison of the number and diameter of dentinal tubules in human and bovine dentine by scanning electron microscopic investigation. **Archives of Oral Biology.** v. 45, n. 12, p. 55-61, Dec. 2000.

SCHMALZ, G., *et al.* Permeability characteristics of bovine and human dentin under different pretreatment conditions. **J Endod.** v. 27, n. 1, p. 23-30, Jan. 2001.

SEDGLEY, C.M., *et al.* Influence of irrigant needle depth in removing bioluminescent bacteria inoculated into instrumented root canals using real-time imaging in vitro. **Int Endod J.** v. 38, n. 10, p. 97-104, Oct. 2005.

SELTZER, S., FARBER, P.A. Microbiologic factors in endodontology. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.** v. 78, n. 5, p. 634-45, May. 1994.

ŞEN, B.H., ERTÜRK, O., PIŞKIN, B. The effect of different concentrations of EDTA on instrumented root canals walls. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** v. 108, n. 4, p. 622-7, Apr. 2009.

SENGUN, A., ORUCOGLU, H., ÜLKER, H.E. Effect of endodontic irrigants on microtensile bond strength of a self-etching adhesive system. **J Rest Dent.** v. 1, n. 3, p. 86-9, Mar. 2013.

SHAHRAVAN, A., *et al.* Effect of Smear Layer on Sealing Ability of Canal Obturation: A Systematic Review and Meta-Analysis. **J Endod.** v. 33, n. 2, p. 96-105, Feb. 2007.

SILVA E SOUZA, P.A.R., *et al.* Effects of sodium hypochlorite associated with EDTA and etidronate on apical root transportation. **Int Endod J.** v. 47, n. 1, p. 20-5, Jan. 2014.

SIQUEIRA JR, J.F., RÔÇAS, I.N. Clinical Implications and Microbiology of Bacterial Persistence after Treatment Procedures. **J Endod.** v. 34, n. 11, p. 1291–301, Nov. 2008.

SLUTZKY-GOLDBERG, I., *et al.* Effect of Sodium Hypochlorite on Dentin Microhardness. **J Endod.** v. 30, n. 12, p. 880-2, Dec. 2004.

SÓ, M.V.R., *et al.* Pulp tissue dissolution when the use of sodium hypochlorite and EDTA alone or associated. **Rev Odonto Cienc.** v. 26, n. 2, p. 156-60, Feb. 2011.

SOARES, J.A., *et al.* Effectiveness of Chemomechanical Preparation With Alternating Use of Sodium Hypochlorite and EDTA in Eliminating Intracanal *Enterococcus faecalis* Biofilm. **J Endod.** v. 36, n. 5, p. 894-8, May. 2010.

SOUZA M., *et al.* Evaluation of Chlorhexidine Substantivity on Human Dentin: A Chemical Analysis. **J Endod.** v. 38, n. 9, p. 1249-52, Sep. 2012.

SPÅNGBERG, L., ENGSTRÖM, B., LANGELAND, K. Biologic effects of dental materials. 3. Toxicity and antimicrobial effect of endodontic antiseptics in vitro. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.** v. 36, n. 6, p. 856 –71, Dec. 1973.

SPANÓ, J.C.E., *et al.* Atomic absorption spectrometry and scanning electron microscopy evaluation of concentration of calcium ions and smear layer removal with root canal chelators. **J Endod.** v. 35, n. 5, p. 727-30, May. 2009.

STOJICIC, S., *et al.* Antibacterial and smear layer removal of a novel irrigant, QMIX. **Int Endod J.** v. 45, n. 4, p. 363-71, Apr. 2012.

TEIXEIRA, C.S., FELIPPE, M.C., FELIPPE, W.T. The effect of application time of EDTA and NaOCl on intracanal smear layer removal: an SEM analysis. **Int Endod J.** v. 38, n. 5, p. 285–90. May. 2005.

THOMAS, H.F., PAYNE, R.C. The Ultrastructure of Dentinal Tubules from Erupted Human Premolar Teeth. **J Dent Res.** v. 62, n. 5, p. 532-6, May. 1983.

THOMAS, J.E., SEM, D.S. An in vitro spectroscopic analysis to determine whether para-chloroaniline is produced from mixing sodium hypochlorite and chlorhexidine. **J Endod.** v. 36, n. 2, p. 315–7, Feb. 2010.

TORABINEJAD, M., *et al.* A New Solution for the Removal of the Smear Layer. **J Endod.** v. 29, n. 3, p. 170-5, Mar. 2003.

TURSSI, C.P., *et al.* Viability of Using Enamel and Dentin from Bovine Origin as a Substitute for Human Counterparts in an Intraoral Erosion Model. **Braz Dent J.** v. 21, n. 4, p. 332-6, Apr. 2010.

UZUNOGLU, E., *et al.* Effect of Ethylenediaminetetraacetic Acid on Root Fracture with Respect to Concentration at Different Time Exposures. **J Endod.** v. 38, n. 8, p. 1110–3, Aug. 2012.

VAN DER SLUIS, L.W.M., *et al.* The influence of volume, type of irrigant and flushing method on removing artificially placed dentine debris from the apical root canal during passive ultrasonic irrigation. **Int Endod J.** v. 39, n. 6, p. 472-6, Jun. 2006.

VAN DER SLUIS, L.W.M., *et al.* Passive ultrasonic irrigation of the root canal: a review of literature. **Int Endod J.** v. 40, n. 6, p. 415-26, Jun. 2007.

VAN DER SLUIS, L.W.M., *et al.* Study on influence of refreshment/activation cycles and irrigants on mechanical cleaning efficiency during ultrasonic activation of the irrigant. **J Endod.** v. 36, n. 4, p. 737-40, Apr. 2010.

VAN DER SLUIS, L.W.M., WU, M.K., WESSELINK, P.R. The efficacy of ultrasonic irrigation to remove artificially placed dentine debris from human root canals prepared using instruments of varying taper. **Int Endod J.** v. 38, n. 10, p. 764–8, Oct. 2005.

VAN DER SLUIS, L.W.M., WU, M.K., WESSELINK, P.R. A comparison between a smooth wire and a K-file in removing artificially placed dentine debris from root canals in resin blocks during ultrasonic irrigation. **Int Endod J.** v. 38, n. 9, p. 593-6, Sep. 2005.

VAN DER SLUIS, L.W.M., WU, M.K., WESSELINK, P.R. The evaluation of removal of calcium hydroxide paste from an artificial standardized groove in the apical root canal using different irrigation methodologies. **Int Endod J.** v. 40, n. 6, p. 52–7, Jun. 2007.

VAN MEERBEEK, B., *et al.* Comparative SEM and TEM Examination of the Ultrastructure of the Resin-Dentin Interdiffusion Zone. **J Dent Res.** v. 72, n. 2, p. 495-501, Feb. 1993.

VERA, J., ARIAS, A., ROMERO, M. Effect of maintaining apical patency on irrigant penetration into the apical third of root canals when using passive ultrasonic irrigation. **J Endod.** v. 37, n. 9, p. 1276-8, Sep. 2011.

VIANNA, M.E., *et al.* In vitro evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** v. 97, n. 1, p. 79-84, Jan. 2004.

VIDAL, B.C. Image analysis of tendon helical superstructure using interference and polarized light microscopy. **Micron.** v. 34, p. 423-32. 2003.

VIDAL, B.C., MELLO, M.L.S. **Biologia Celular.** Rio de Janeiro: Livraria Atheneu, 1987.

VIER-PELISSER, F.V., *et al.* The effect of head-fractionated teletherapy on pulp tissue. **Int Endod J.** v. 40, n. 11, p. 859–65, Nov. 2007.

VIER, F.V., FIGUEIREDO, J.A.P. Prevalence of different periapical lesions associated with human teeth and their correlation with the presence and extension of apical external root resorption. **Int Endod J.** v. 35, n. 2, p. 710-9, Feb. 2002.

WALTIMO, J. Unusual forms of collagen in human dentin. **Matrix Biology**. v.15, p. 53-6. 1996.

WANG, Z., *et al*. The Effect of Detergents on the Antibacterial Activity of Disinfecting Solutions in Dentin. **J Endod**. v. 38, n. 7, p. 948–53, Jul. 2012.

WANG, Z., SHEN, Y., HAAPASALO, M. Effectiveness of Endodontic Disinfecting Solutions against Young and Old *Enterococcus faecalis* Biofilms in Dentin Canals. **J Endod**. v. 38, n. 10, p. 1376-9, Oct. 2012.

WANG, Z., SHEN, Y., HAAPASALO, M. Effect of Smear Layer against Disinfection Protocols on *Enterococcus faecalis* – infected Dentin. **J Endod**. v. 39, n. 11, p. 1395-400, Oct. 2013.

WU, M.K., WESSELINK, P.R. A primary observation on the preparation and obturation of oval canals. **Int Endod J**. v. 34, n. 2, p. 137-41, Feb. 2001.

ZAMANY, A., SAFAVI, K., SPÅNGBERG, L.S. The effect of chlorhexidine as an endodontic disinfectant. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**. v. 96, n. 11, p. 578–81, Nov. 2003.

ZAMPRONIO, C.F., *et al*. pH changes after manual or ultrasonic instrumentation and smear layer removal with EDTA or ultrasonic **Dent Traumatol**. v. 24, n.5, p. 542–5. Oct. 2008.

ZAND, V., *et al*. A comparative Scanning electron microscopic investigation of the smear layer after the use of sodium hypochlorite gel and solution forms as root canal irrigants. **J Endod**. v. 36, n. 7, p. 1234-7, Jul. 2010.

ZEHNDER, M. Root canal irrigants. **J Endod**. v. 32, n. 5, p. 389–98, May. 2006.

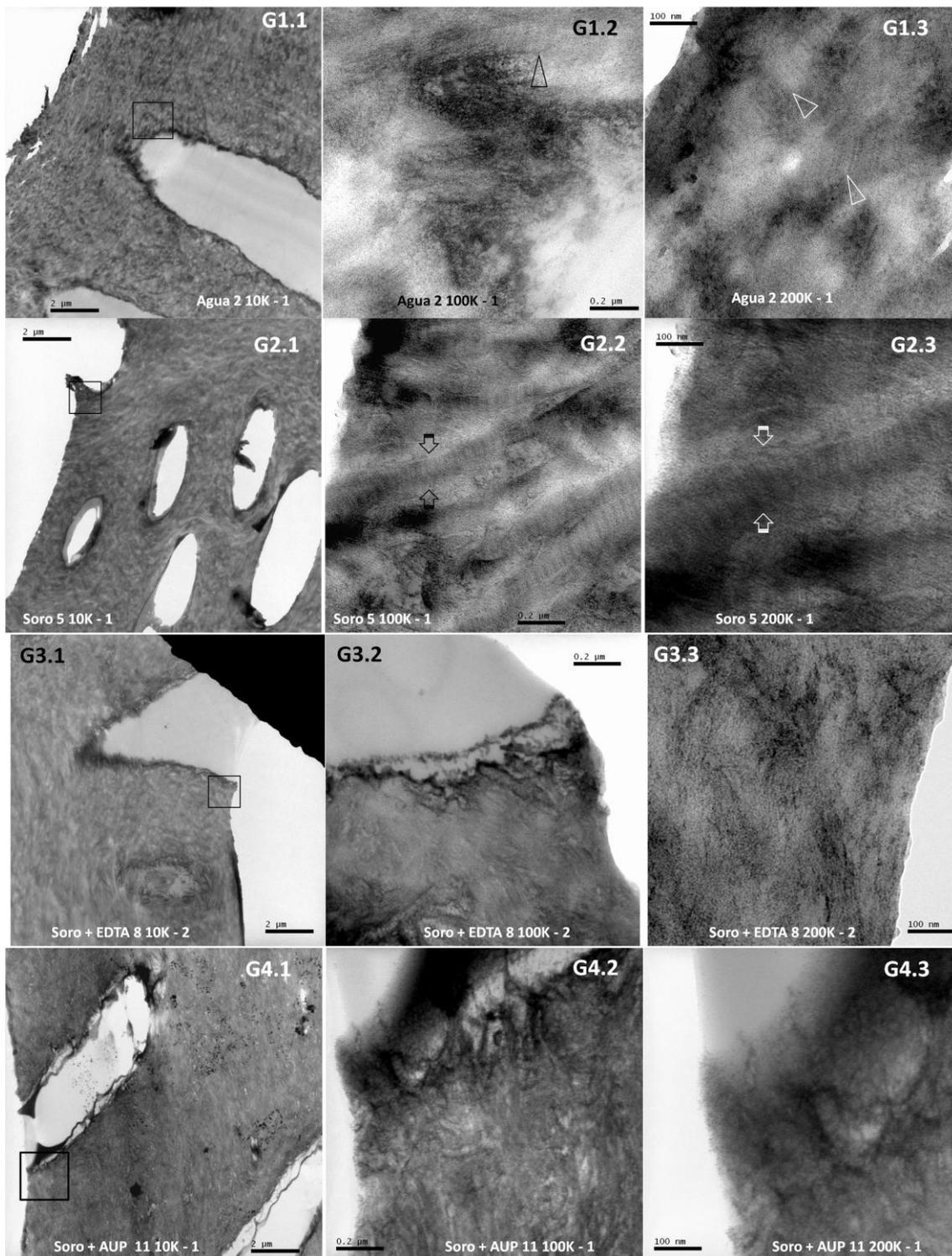
ZEHNDER, M., *et al*. Chelation in root canal therapy reconsidered. **J Endod**. v. 31, n.11, p. 817–20, Nov. 2005.

ZHANG, K., *et al*. The effect of initial irrigation with two different sodium hypochlorite concentrations on the erosion of instrumented radicular dentin. **Dent Mater**. v. 26, n. 1, p. 514–23, Jan. 2010. (a)

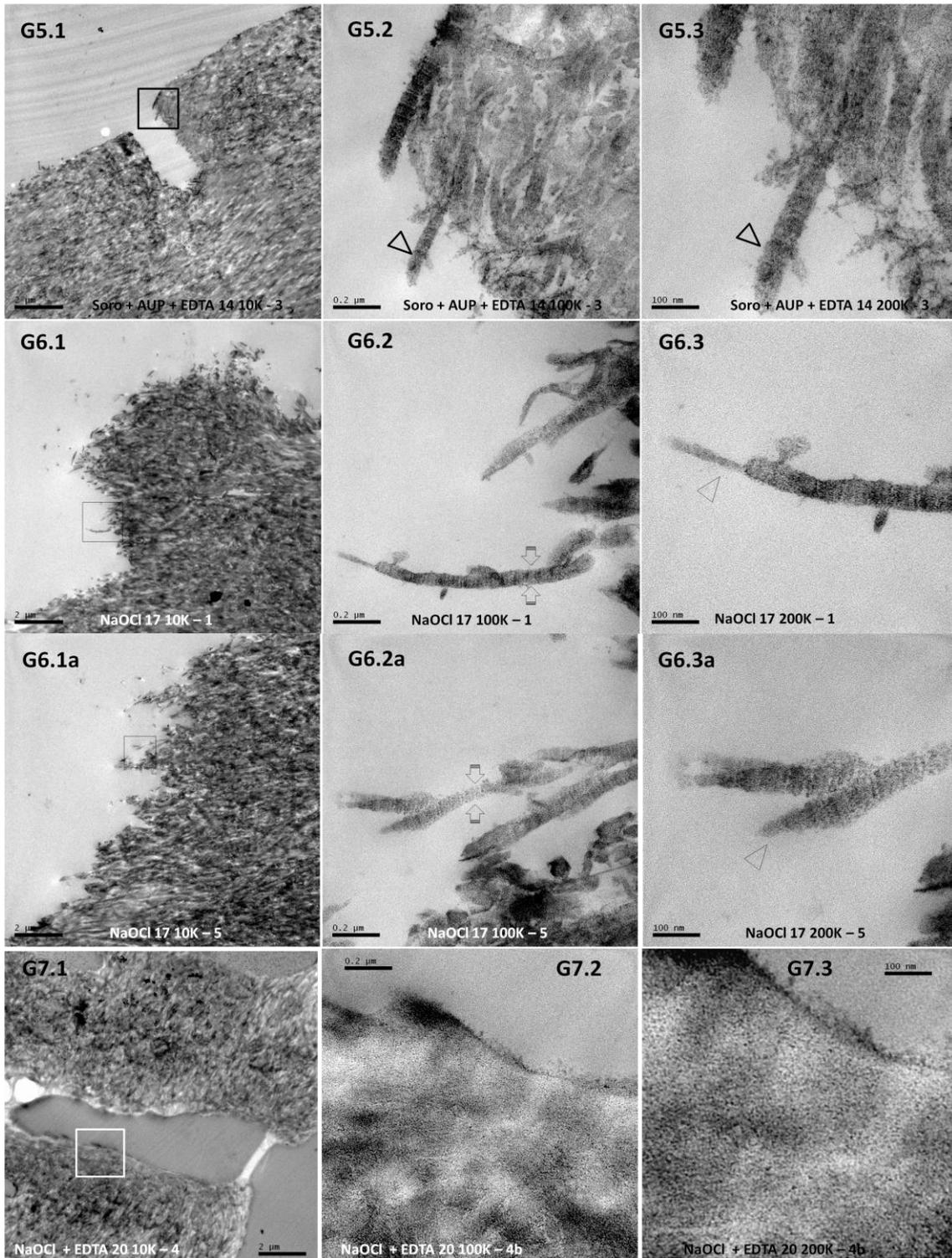
ZHANG, K., *et al*. Effects of different exposure times and concentrations of sodium hypochlorite/ethylenediaminetetraacetic acid on the structural integrity of mineralized dentin. **J Endod**. v. 36, n. 1, p. 105–9, Jan. 2010. (b)

ZMENER, O., PAMEIJER, C.H., BANEGAS, G. Effectiveness in cleaning oval-shaped root canals using anatomic endodontic technology, profile and manual instrumentation: a scanning electron microscopic study. **Int Endod J**. v. 38, n. 6, p. 356–63, Jun. 2005.

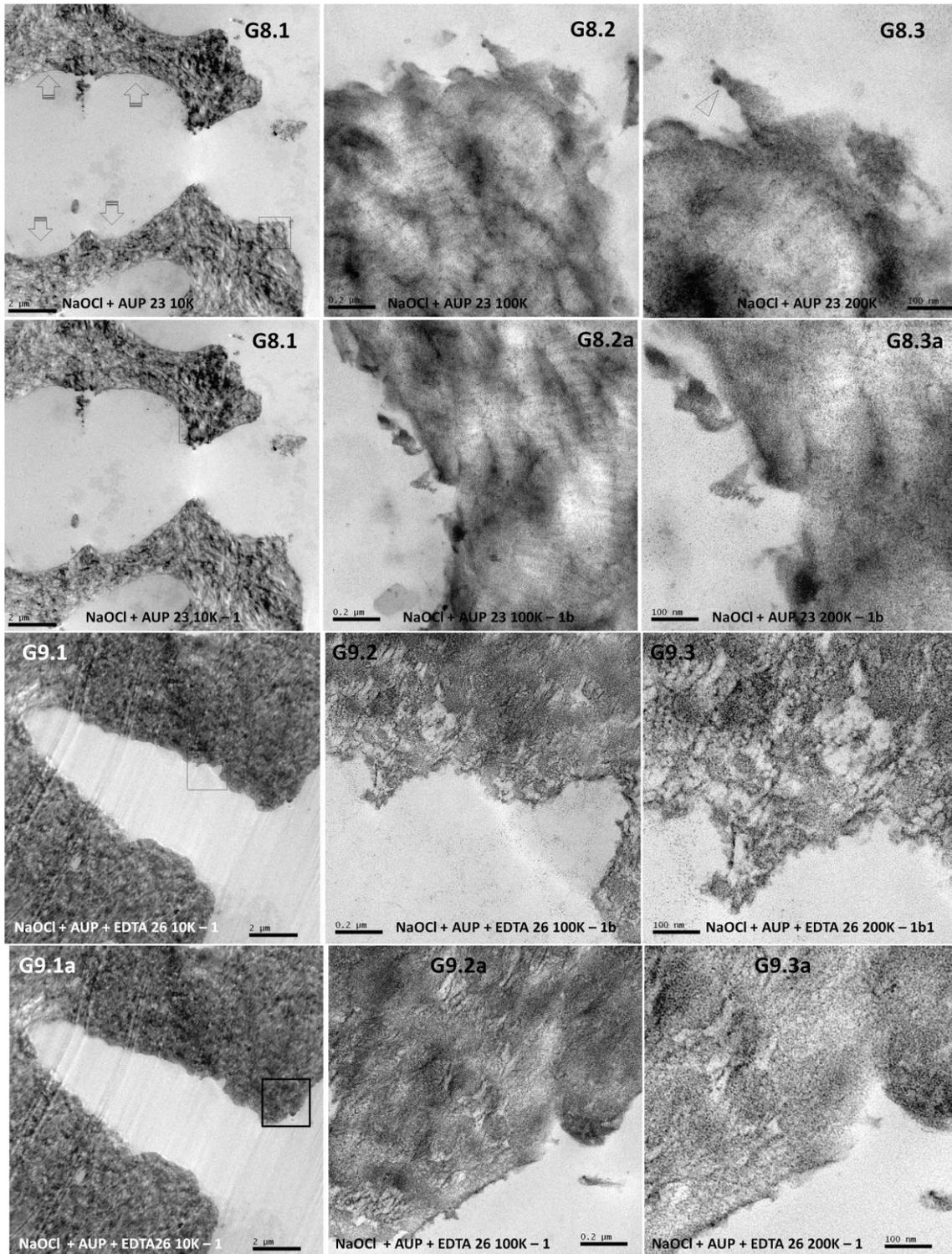
## 8 FIGURAS



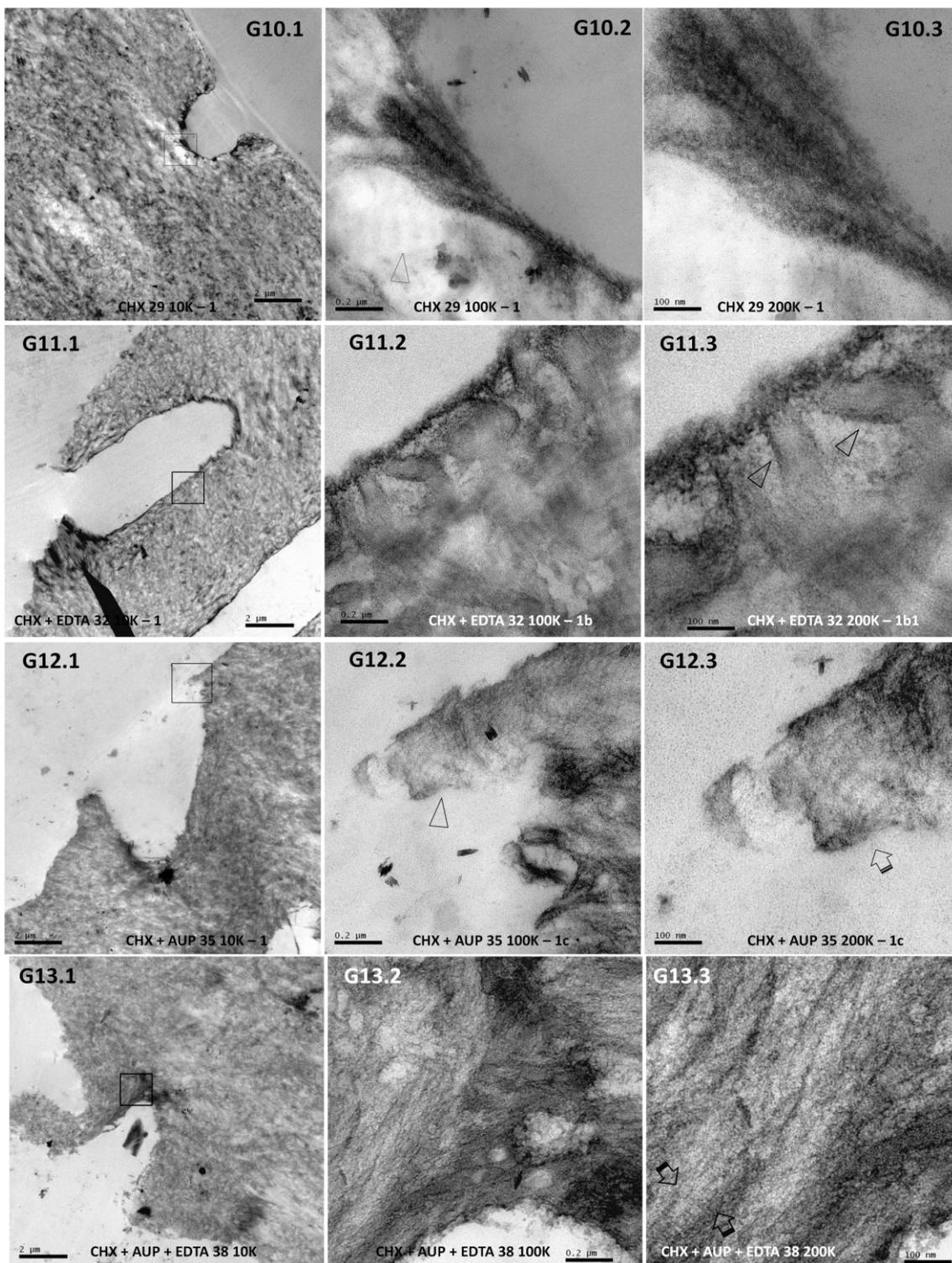
**Figura 1:** G representa o grupo e os números .1, .2 e .3 representam a ampliação de 10000, 100000 e 200000X, respectivamente. Quadrados indicam as áreas que foram ampliada. **G1.1 a G4.3:** superfície lisa e estrutura do colágeno íntegra. Fibras colágenas longas e íntegras (entre as setas e nas pontas de setas).



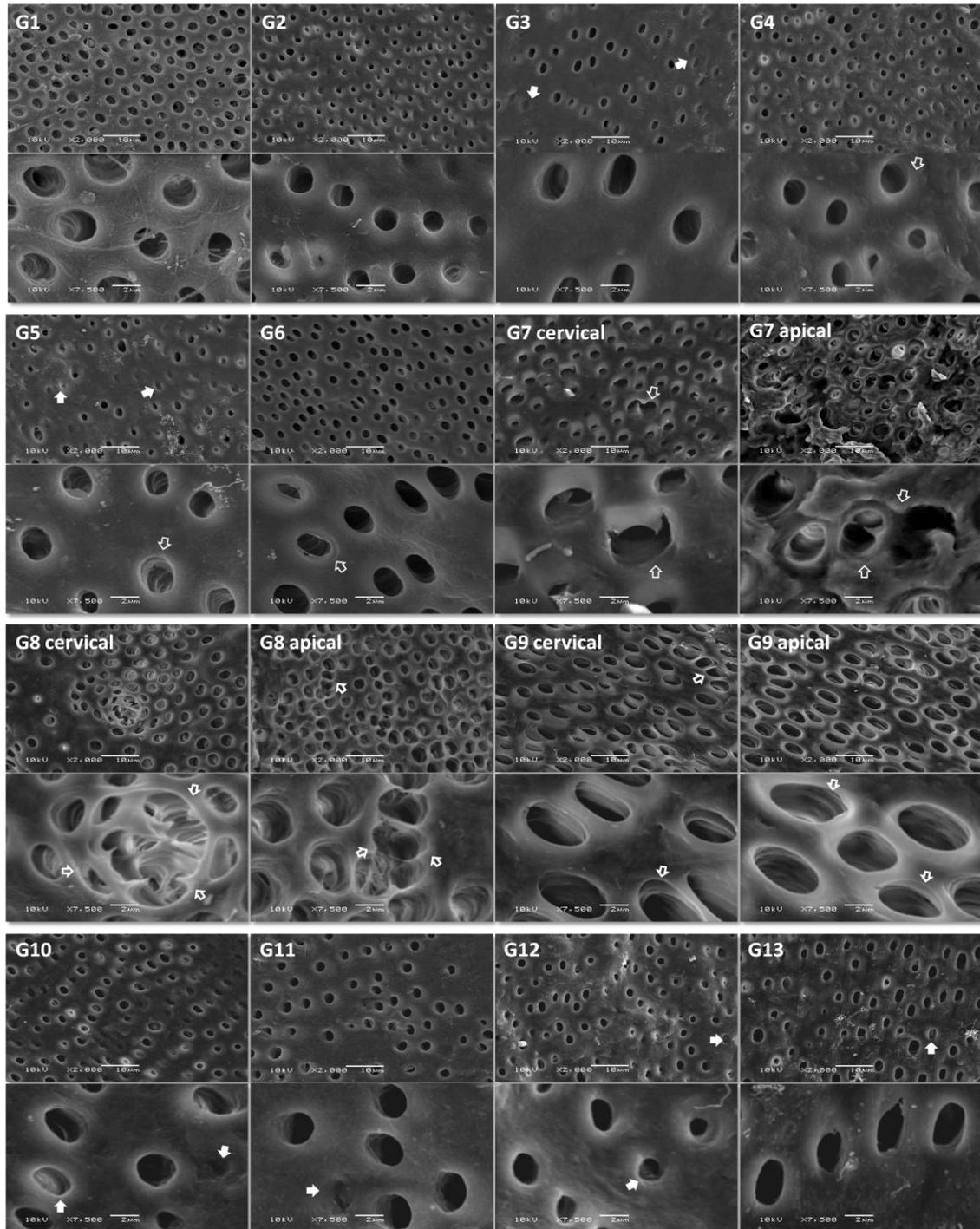
**Figura 2:** G5.1, .2 e .3 - superfície com colágeno disperso; estrutura do colágeno sem alterações. G5.2 e .3 – fibra colágena (ponta da seta). G6.1, .2, .3, .1a, .2a, .3a - Superfície com colágeno disperso (entre setas); estrutura do colágeno com a ponta parcialmente dissolvida. Note-se a perda de substância afinando a ponta do colágeno (ponta da seta). Isso aparece inclusive no fundo do túbulo. G7.1, .2, .3 - Degradação apenas superficial do colágeno, menor do que no grupo em que o NaOCl foi utilizado isoladamente.



**Figura 3:** **G8.1** - Alargamentos globulares nos túbulos (setas abertas) e **G8.1, .2, .3, .2a e .3a** - Superfície com colágeno disperso; estrutura do colágeno com a ponta parcialmente dissolvida. Note-se a perda de substância afinando a ponta do colágeno (ponta da seta). Isso aparece inclusive no fundo do túbulo. **G9.1, .2, .3, .2a, .3a** - Colágeno disperso, dissolução das pontas das fitas de colágeno. Superfície parcialmente dissolvida e degradação do colágeno em profundidade na dentina intertubular.



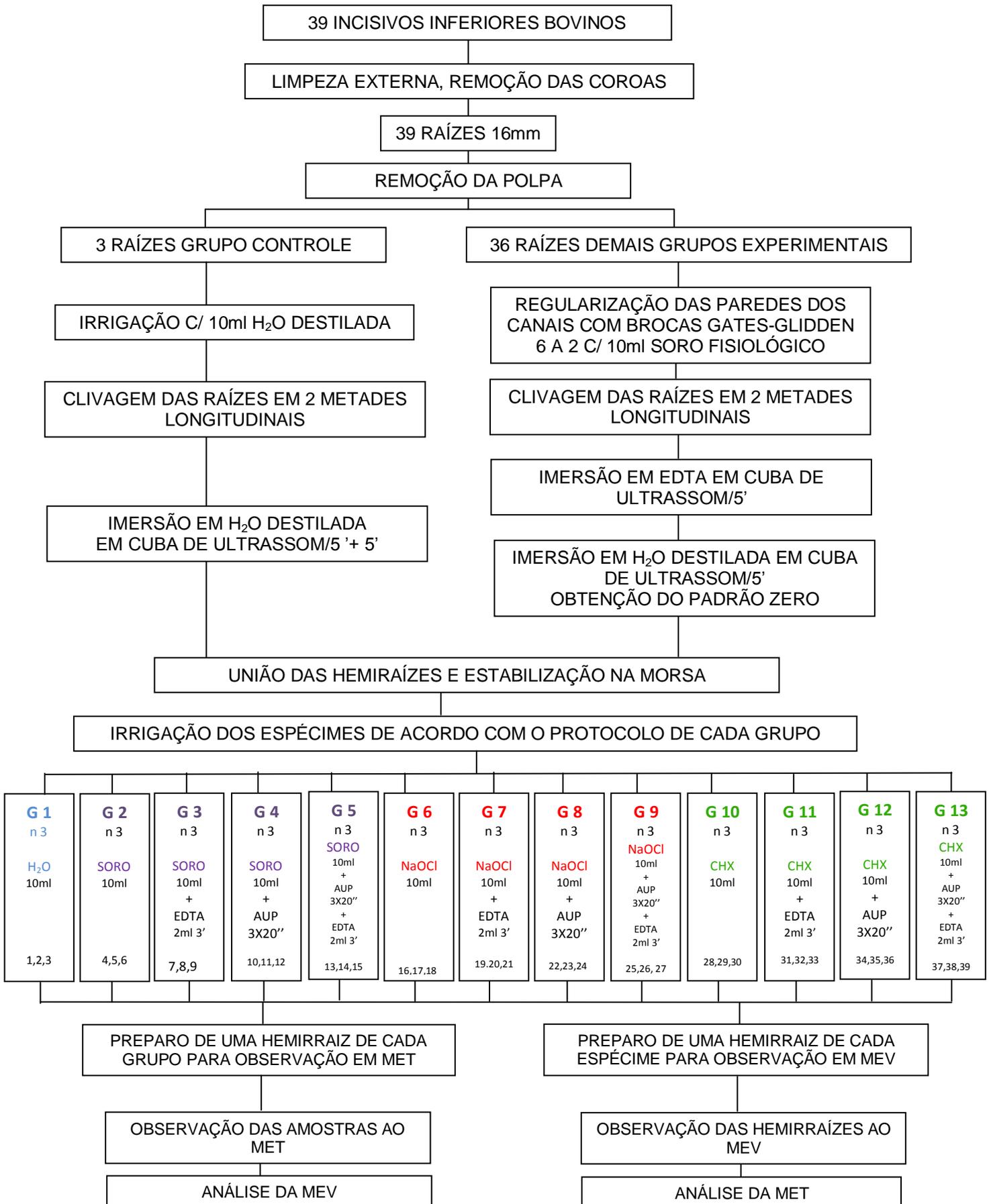
**Figura 4 – G10.1, .2, .3 - Superfície lisa e estrutura do colágeno íntegra. G11.1, .2, .3, G12.1, .2, .3, G12.2 – porção de dentina na entrada do túbulo (ponta de seta). G13.1, .2 e .3 - Superfície ligeiramente aberta e estrutura do colágeno íntegra. Fibras colágenas (entre as setas).**



**Figura 5** - Eletromicrografias de MEV, com magnificações originais de 2000 X (superior) e 7500X (inferior). **G1**(água destilada) e **G2**(soro): menos de 50% de *debris* e de lama dentinária, 0% de erosão na dentina peri e intertubular. **G3**(soro+EDTA): menos de 50% de *debris*, mais de 50% de lama dentinária, presença de *smear plugs* (setas abertas), 0% de erosão na dentina peri e intertubular. **G4**(soro+AUP): menos de 50% de *debris* e lama dentinária, menos de 50% de erosão na dentina peritubular (seta aberta) e 0% na intertubular. **G5**(Soro+AUP+EDTA): menos de 50% de *debris*, mais de 50% de lama dentinária, presença de *smear plugs* (setas fechadas), menos de 50% de erosão na dentina peritubular (seta aberta) e 0% na intertubular. **G6**(NaOCl): menos de 50% de *debris*, 0% de lama dentinária, menos de 50% de erosão na dentina peritubular (seta aberta) e 0% na intertubular. **G7**(NaOCl+EDTA) **cervical**: 0% de *debris* e lama dentinária, mais de 50% de erosão na dentina peritubular, menos de 50% na intertubular (setas abertas). **G7**(NaOCl+EDTA) **apical** e **G8**(NaOCl+AUP) **cervical** e **apical**: 0% de *debris* e lama dentinária, 100% de erosão na dentina peritubular, menos de 50% na intertubular (setas abertas). **G9**(NaOCl+AUP+EDTA) **cervical** e **apical**: 0% de *debris* e lama dentinária, mais de 50% de erosão na dentina peritubular, menos de 50% na intertubular (setas abertas). **G10**(CHX), **G11**(CHX+EDTA), **G12**(CHX+AUP) e **G13**(CHX+AUP+EDTA): menos de 50% de *debris* e lama dentinária, *smear plugs* em poucas áreas (setas fechadas), 0% de erosão na dentina peri e intertubular.

## 9 APÊNDICE

## 9.1 Fluxograma



## 9.2 Protocolo básico de preparação de amostras para MET – CME UFRGS

### 1) Solução fixadora:

Glutaraldeído 25%-----	1ml
Parafolmadeído 8%-----	2,5ml
Tampão Fosfato 0,2M-----	5ml
Água ( destilada e deionizada)-----	1,5ml
<b>Total:</b> -----	10ml

**Solução final:** glutaraldeído 2,5% + parafomadeído 2% + tampão fosfato 0,12 M ( p.H 7,2-7,4 )

### 2) Lavagens:

Feitas com tampão Fosfato 0,1 M: 3 banhos de 30 min

### 3) Pós- Fixação

Feitas com Tetróxido de Ósmio 2% + Tampão fostato 0,2M ( 1:1 )

Tempo: de 30 à 45 min

### 4) Lavagens:

Feitas com tampão Fosfato 0,1 M: 3 banhos de 30 min

### 5) Desidratação:

- 5.1 - Acetona P.a- 30%- 10 min.
- 5.2 - Acetona P.a- 50%- 10 min.
- 5.3 - Acetona P.a- 70%- 10 min.
- 5.4 - Acetona P.a- 95%- 10 min.
- 5.5 - Acetona P.a- 95%- 20 min.
- 5.6 - Acetona P.a- 100%- 10 min.
- 5.7 - Acetona P.a- 100%- 20 min.

### 6) Pré- Embebição:

É feita com banhos, misturando o desidratante com a resina escolhida, em proporções gradativas crescentes de resina, com o tempo de no mínimo 2 horas em cada banho.

### 7) Embebição:

É feita com um banho de resina 100%, durante 24 horas de preferência em rotator.

### 8) Inclusão:

É feita com moldes de silicone, com resina pura, em estufa com temperatura constante de 60°C por 72 horas.

## 10 ANEXOS

## 10.1 Aprovação do Comitê De Pesquisa

### PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Projeto Nº: 23051



Áreas de Pesquisa

Objetos de Pesquisa

Áreas de Atuação

Áreas de Pesquisa

Programa de Iniciação Científica

Voluntário

Programa de Fomento à

Pesquisa (auxílio)

Retorna

Fechar Imprimir

Projeto Nº: 23051

**Título:** AVALIAÇÃO ATRAVÉS DA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA E TRANSMISSÃO DA DENTINA BOVINA APÓS O USO DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE IRRIGAÇÃO

COMISSÃO DE PESQUISA DE ODONTOLOGIA: Parecer

O objetivo deste estudo experimental, in vitro, randomizado e controlado será analisar através de microscopia eletrônica de varredura e de transmissão, a ultra-estrutura dentinária de dentes bovinos após a utilização de diferentes protocolos de irrigação. Trinta e nove incisivos inferiores bovinos recém extraídos e limpos, terão suas coroas removidas. Em seguida, serão removidas as polpas dentárias e as amostras serão divididas aleatoriamente em 13 grupos (n=3). Todas as raízes serão identificadas e clivadas longitudinalmente em um fragmento mesial e outro distal. As seis hemi raízes pertencentes ao grupo 1 serão imersas em água destilada, em cuba de ultrassom, acionada por dois intervalos de 5 minutos. As demais hemi raízes serão imersas em EDTA 17%, em cuba de ultrassom, acionada por 5 minutos e em seguida, em água destilada, na cuba de ultrassom, acionada por 5 minutos para obtenção do padrão zero. As hemi raízes serão unidas novamente, presas em uma morsa e receberão o protocolo de irrigação específico para cada grupo. Em todos os grupos a irrigação e aspiração serão realizadas simultaneamente, por 3 minutos utilizando 10 ml da solução teste destinada a cada grupo, que são: água destilada, solução fisiológica 0,9% (Soro), Hipoclorito de Sódio (NaOCl) 2,5% e guconato de clorexidina (CHX) 2%. A ativação ultrassônica nos grupos indicados, será feita de forma passiva (AUP) em 3 intervalos de 20 segundos com a solução teste no interior do canal e, para os grupos indicados, será feita irrigação/aspiração com 2ml de EDTA 17% por 3 minutos. no Grupo 1 água destilada; Grupo 2: soro; Grupo 3: soro e EDTA; Grupo 4: soro e AUP; Grupo 5: soro, AUP e EDTA; Grupo 6: NaOCl; Grupo 7: NaOCl e EDTA; Grupo 8: NaOCl e AUP; Grupo 9: NaOCl, AUP e EDTA; Grupo 10: CHX; Grupo 11: CHX e EDTA; Grupo 12: CHX e AUP. Grupo 13: CHX, AUP e EDTA. Após receber o respectivo protocolo de irrigação, cada uma das amostras terá a solução irrigadora aspirada do interior do canal radicular com cânula de aspiração e este será completamente seco com pontas de papel. Em seguida, as amostras serão separadas nos dois fragmentos longitudinais previamente existentes e, individualmente, serão colocadas em frascos contendo glutaraldeído 2,5%. Sendo que uma hemi-raiz de cada espécime será preparada para posterior avaliação em microscopia eletrônica de transmissão, e a outra hemi-raiz, para microscopia eletrônica de varredura. As imagens serão analisadas qualitativamente e será feita a análise descritiva das mesmas quanto aos aspectos orgânicos e inorgânicos e as possíveis alterações observadas na ultraestrutura da dentina bovina após a aplicação dos diferentes protocolos de irrigação. O projeto encontra-se bem descrito e possui mérito científico. O parecer é pela aprovação.

## 10.2 Declaração de doação de dentes bovinos

### DECLARAÇÃO

Declaro que foram doados 50 dentes bovinos destinados à pesquisa, provenientes de animais abatidos para fins comerciais neste frigorífico.

Santa Cruz do Sul, 18 de abril de 2012.



TIAGO PRETTO  
Diretor Técnico  
Frigorífico Gassen LTDA  
Linha Nova, Santa Cruz do Sul

**Tiago Luis Pretto**  
Médico Veterinário - CRMV-RS 8470  
Diretor Técnico  
FRIGORIFICO GASSEN LTDA.

CNPJ: 73.801.814/0001-30