UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

SAMUEL LUCAS FERNANDES

**Avaliação da efetividade de diferentes protocolos de irrigação na
limpeza do canal radicular**

BAURU
2015

SAMUEL LUCAS FERNANDES

**Avaliação da efetividade de diferentes protocolos de irrigação na
limpeza do canal radicular**

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

Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio Hungaro Duarte

Versão Corrigida

BAURU
2015

F391a Fernandes, Samuel Lucas
Avaliação da efetividade de diferentes
protocolos de irrigação na limpeza do canal
radicular / Samuel Lucas Fernandes. – Bauru, 2015.
104 p. : il. ; 31cm.

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

Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio Hungaro

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

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

Assinatura:

Data:

DEDICATÓRIA

A Deus, pela tua presença ao meu lado, porque Tu estás sempre comigo e nunca me deixas só. Tu és a força no meu momento de fraqueza, alegria no momento de tristeza, a paz, nas minhas tribulações e nas angústias, Tu és a rocha da minha salvação em que alicerço os meus projetos. És o embalar harmonioso nas minhas noites frias e traiçoeiras, És a luz que ilumina o meu caminho, a força que me faz caminhar. Tu, Senhor, envolves toda a minha vida e estás presente na hora certa, no lugar certo com a palavra certa. Quando caio, Tu me levantas com amor e carinho indelévels. Obrigado, Senhor por tudo o que Tu fizeste comigo, por tudo o que fazes comigo e por tudo que ainda vais fazer comigo. Por ter me ensinado a conviver em harmonia com o próximo e por ter proporcionado pelos seus sábios e ocultos caminhos que eu chegasse a esta vitória.

A minha avó Francisca Rosa de Jesus, pois inspirado na sua força de luta e amor para comigo cheguei até aqui. Serei eternamente grato por ter feito dos anos em que conviveste comigo, os melhores da minha vida. Espero que um dia possa reencontrar-te minha avó. Tu serás sempre a pessoa que moverá os meus sonhos, pelo amor despendido a mim e por não medir esforços para me ver bem e feliz. A herança de amor, dignidade, honestidade e espírito de união é um legado semeado por você e que somado a responsabilidade, me incumbem da tarefa de manter esta tradição. Obrigado por acreditar, confiar e torcer por mim.

Aos meus pais, pelo amor incondicional, pela luta, pelos ensinamentos e por ter me feito ver o mundo de uma diferente que compartilharam os meus ideais e os alimentaram, incentivando-me a prosseguir na jornada, fossem quais fossem os obstáculos; a vocês que mesmo distantes mantiveram-se sempre ao meu lado lutando comigo, dedico essa conquista com a mais profunda admiração e respeito. De vocês recebi o dom mais precioso do universo: a vida. Já por isso seria infinitamente grato. Mas vocês não se contentaram em presentear-me apenas com ela. Revestiram minha existência de amor, carinho e dedicação. Cultivaram na criança todos os valores que a transformaram num adulto responsável, consciente. Abriram a porta do meu futuro, iluminando meu caminho com a luz mais brilhante que puderam encontrar: o estudo. Trabalharam dobrado, sacrificaram seus sonhos

em favor dos meus, não foram apenas pais, mas amigos e companheiros, mesmo nas horas em que meus ideais pareciam distantes e inatingíveis e o estudo um fardo pesado demais. Tantas foram às vezes que o meu cansaço e preocupações foram sentidos e compartilhados por vocês, numa união que me incentivava a prosseguir. Hoje, dia da minha dissertação, procuro entre as palavras àquela que gostaria que seus corações ouvissem. E só encontro uma simples e sincera palavra: Obrigado.

Se um dia, já feito homem realizado, sentires que a terra cede a teus pés, que tuas obras desmoronam que não há ninguém a tua volta para te estender a mão, esquece a tua maturidade, passa pela tua mocidade, volta a tua infância e balbucia entre lágrimas e esperanças, as últimas palavras que sempre te restarão na alma: minha mãe, meu pai!

“Rui Barbosa”

As minhas irmãs, *Gabriela Caroline Fernandes*, por não permitir que eu caísse, pelo cuidado que tem por mim, pelo amor e principalmente por nossa amizade inabalável esteve sempre pronta a compartilhar de todos os estágios de minha vida. *Rafaela Carolina Fernandes*, que desde pequena, estar sempre preocupada comigo, pelo carinho e amor a mim despendido.

Ao meu mestre intelectual, Professor, amigo e segundo pai, Marco Antonio Hungaro Duarte, que Deus possa o recompensar por toda a confiança depositada em mim. Não seria possível a realização desse sonho e de muitos outros sem a sua orientação e colaboração. Serei eternamente grato pelos seus ensinamentos, conselhos e amizade.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, **FAPESP**, pela concessão de bolsa de mestrado (Processo: 2013/05980-3) que viabilizou a realização desse trabalho.

A Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, na pessoa da diretora, **Profa. Dra. Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado**

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

Ao coordenador da área de concentração em Endodontia **Prof. Dr. Marco Antonio Hungaro Duarte**

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Marco Antonio Hungaro Duarte** pela grande confiança depositada em mim. Por ter me adotado como um filho, colocado em minhas mãos muitos talentos e dado condições para que eu pudesse granjeá-los. Serei eternamente grato por ter me permitido se espelhar no senhor em todos os aspectos possíveis. Se todos pensassem como o senhor, teríamos um mundo melhor, com bons pais, bons mestres, bons amigos, bons orientadores, bons filhos e abarrotado de bons exemplos. Com o senhor tenho um grande exemplo de honestidade e de caráter inexequível. Tenho a certeza de que tive o melhor orientador que poderia ter, o melhor amigo e o melhor conselheiro. Muito obrigado por me orientar!

Ao **Prof. Dr. Ivaldo Gomes de Moraes** meu avô científico, com quem eu sempre pude contar para dividir experiências, boas e ruins. E pelos momentos de alquimista que só o senhor pode proporcionar. Muito obrigado por tudo!

Ao **Prof. Dr. Rodrigo Ricci Vivan** meu irmão científico mais velho. Muito obrigado pelos conselhos, pela amizade, por confiar trabalhos a minha pessoa e pelos bons momentos que passamos e mesmo chegando depois, saiba que sempre teve minha admiração e respeito. Muito obrigado por tudo!

Aos demais professores da disciplina de Endodontia... ao **Prof. Dr. Clóvis Monteiro Bramante; a Profa. Dra. Flaviana Bombarda de Andrade; ao Prof. Dr. Roberto Brandão Garcia e ao Prof. Dr. Norberti Bernanrdineli. A todos vocês** muito obrigado pelo apoio incondicional, pelos conhecimentos transmitidos, pela amizade e por me ensinarem a ser um ser humano melhor.

Agradeço também aos professores desta casa pela formação, em especial ao **Prof. Dr. Rafael Lia Mondelli, Profa. Dra. Linda Wang, Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos**, pelo apoio e parcerias durante minha graduação e pós-graduação. Mais especial ainda à **Profa. Dra. Ana Carolina Magalhães (Carol)** que foi minha mãe científica, amiga e conselheira. Obrigado por tudo,

por ser minha mãe nesses 6 anos de Bauru e por ter me iniciado na pesquisa científica! Que Deus a abençoe sempre!

Agradeço imensamente a **Marcia Graeff** por todo o tempo que se dedicou a minha pesquisa principal e as demais pesquisas que paralelamente demandaram a sua participação. Marcia você não mediu esforços para ajudar e disponibilizou seus conhecimentos sem ocultar nada para que esta pesquisa fosse realizada. Muito obrigado pela amizade e pelo exemplo de caráter que passa a todos ao seu redor!

Aos funcionários da disciplina de endodontia, a **Andressa Barraviera Tiossi Laureano**, que sempre esteve disponível para colaborar principalmente com os pacientes nas clínicas; ao **Edimauro de Andrade** que sempre esteve disponível para ajudar a solucionar as intercorrências durante as pesquisas e a **Suely Bettio** que sempre me ajudou com a papelada e recados.

A funcionária **Edna Aparecida Zaupa Nebo** em nome da qual agradeço todos os funcionários da FOB-USP que sempre estiveram prontos em ajudar, fossem quais fossem os problemas, em especial aos funcionários do CIP, da disciplina de Dentística e de materiais odontológicos e da assistência acadêmica.

Agradeço aos professores da **Universidade Camilo Castelo Branco** em nome do **Prof. Dr. Nilton Boer**, por me proporcionarem oportunidades ímpares pelas quais, tenho certeza de que venho atingindo outro patamar na formação acadêmica. E ao professor e grande amigo **Farid Arruda**, pela parceria de sempre, além de ser meu exemplo como cirurgião dentista.

Agradeço a todos os amigos de mestrado, doutorado e pós doutorado que foram meus contemporâneos. Obrigado pelo aprendizado, momentos de descontração e carinho. Muito sucesso a todos!

Agradeço em especial ao **Bruno Cavenago**, pois é um grande amigo e parceiro de trabalho. Obrigado por acreditar no meu potencial e desde a

graduação me ensinar os caminhos da pesquisa, da boa convivência e por ser meu amigo.

Ao **Ronald Zapata** e ao **Aldo Perrochena**, que me ensinaram juntamente com o **Bruno Cavenago** a fazer pesquisa, a ler mais e a buscar o conhecimento. Além disso, foram grandes amigos e parceiros de trabalho. E ajudaram na realização desde e de muitos outros. Obrigado por tudo!

Aos meus amigos do pós-doutorado, **Marina e Professor Paulo Henrique**, muito obrigado pelas parcerias, conselhos e ensinamentos. Vocês foram muito importantes para a minha formação. Muito obrigado!

Aos amigos e parceiros de trabalho que estão no doutorado **Raquel Midena, Bruno Guimarães, Talita, Clarissa, Lincoln**, pelo grande apoio e amizade durante todo esse tempo. Levarei vocês sempre em minha vida. Muito obrigado! E aos demais colegas do doutorado **Pablo, Paloma, Amanda, Ericson, Marcela, Marcelo e Carolina Filpo**. Muito obrigado pelo apoio, ensinamentos e amizade!

A minha turma de mestrado **Murilo, Layla, Thaís e Sávio**, muito obrigado pela parceria e amizade, pelos seminários, viagens, carinho e diversão. Que todos nós trilhemos caminhos de sucesso em nossas vidas. Muito obrigado turma! Em especial ao **Murilo e Layla**, pela parceria desde os tempos de graduação e que se manteve também durante o mestrado, estudando, realizando pesquisas e nos momentos de descontração.

A nova turma de mestrado, **Rafaela, Jussaro, Denise, Bruno e Francine**, muito obrigado pelo carinho e pela amizade. Agradeço em especial ao **Jussaro Duque** por tão logo que chegou ao departamento já se tornou um grande amigo. Uma pessoa batalhadora e que não deixa as oportunidades se esvaírem. Obrigado por tudo!

AGRADECIMENTOS

Família, vocês que sempre torceram pelo meu sucesso e me ampararam em alguns dos momentos difíceis da vida. *Avós, Bisavós, Tios e Primos*, Todos vocês foram essenciais para esta conquista. Obrigado por orarem por mim sempre que precisei. E por estarem sempre presente na minha vida torcendo para o meu sucesso!

In Memoriam Alberto Hoshino, pela grande amizade e apoio enquanto conosco esteve entre os vivos, muito obrigado pela amizade desde a infância e por ser o meu melhor amigo.

Daniel, meu amigo desde a infância e que me motiva com a sua vontade de viver mesmo estando a enfrentar essa terrível enfermidade. Muito obrigado por torcer e vibrar comigo pelas minhas conquistas.

Carina, você sempre foi um amiga leal e fonte de inspiração, uma das pessoas que me levou a Odontologia e acreditar em sonhos, pois tenho visto tornar os seus em realidade. Muito obrigado pelo amor e carinho dispendido a minha pessoa, saiba que sempre foi recíproco.

Aos meus amigos de apartamento Caio Peresi e Danilo Gavazza pela amizade e por serem irmãos que conquistei nesses anos que passamos juntos, obrigado por não desistirem de mim, principalmente nos momentos que eu mesmo desisti. Sou muito grato a todo o apoio que me forneceram e saibam que contribuíram muito para que eu chegasse até aqui. Que a partir das nossas conquistas a vida seja melhor para cada um de nós.

Euliara, por dividir os momentos de aflições e indecisões e também os bons momentos mesmo que a uma distância considerável. Obrigado por ser sempre presente na minha vida. Muito obrigado pelo apoio incondicional e carinho.

Juliana Delatorre, grande parceira dos congressos e uma incentivadora dos meus projetos de vida e estudos e agora uma parceira nos trabalhos. Deus queira que nossa parceria seja duradoura. Muito obrigado por fazer parte desta conquista.

Espero que esteja presente nas demais! E sei que vai, pois nem o Atlântico e as infinitas responsabilidades consegue separar a gente. Sucesso para nós!

Bia, Beatriz Souza, minha dupla de especialização, minha grande amiga, muito obrigado por participar da minha vida e colaborar para o meu crescimento. Sucesso para ti sempre.

Agradeço a amigos e amigas que muito me incentivaram durante essa caminhada e que não poderia deixar de mencionar nesse momento tão sublime. **Fábio Avelar**, **Diogo Farias**, **Danilo Rossetto**, **Caio Fernandes Noronha**, **Alessandro “LEGO”**, **Laurinho**, **Rafael Massunari**, **Ana Paula Moreno**, **Gabi Oliveira**, **Luiza de Paula**, **Bruna Motta**, **Rafaela Carolina Bonato**, **Francine Benetti**, **Guilherme (Fiuk)**, **Mônica**, **Taís Marques**, **Raphaelli Porfirio**, **Patrícia Fernandes Sartori**, **Gabriela Chicrala**, **Bruna Motta**, **Luara Pires**, **Marlyni Zens**, **Ligia Andreatta** e **Cassiana Scotti** pela amizade e que nos momentos difíceis e nos alegres sempre estiveram ao meu lado e torcendo pelo meu sucesso. Incluo no meu seleto grupo de amigos toda a turma **XLIX**, ou melhor, turma **Marco Antonio Hungaro Duarte**, gostaria de agradecê-los pelo carinho e pela homenagem que me fizeram e por me permitirem fazer parte da vossa vida. E gostaria de estender esse agradecimento a uma turma que logo no segundo ano já me prestou uma homenagem e que sou muito grato pela contemporaneidade, a **Turma LI**.

A **Fernanda Sandes** no nome da qual estendo o meu agradecimento a todos os meus **amigos do PET** que passaram muitos momentos alegres e de busca científica e que me permitiram chegar a essa conquista.

A todos os alunos de iniciação que participei nos seus projetos e a todos gostaria de incluir nos agradecimentos aos meus amigos, pois sem exceção vocês foram grandes amigos aqui e os levarei para sempre em minha vida. **Aline Keller**, **Mariana Stollai**, **Vinícius Bizelli**, **Járede Cesar**, **Julia Bubola**, **Mariana Rossetto**, **Gustavo Manfredi**, **Gustavo Braga**, **Victor Cruz**, **Letícia Vieira**, **Juliana Gatto**, **Matheus Medeiros**, **Pedro Calefi** e **Arthur Lemos**, alunos da FOB. E às minhas alunas de iniciação da Universidade Camilo Castelo Branco, **Ana Cristina** e **Sibele Alcântara**,

estou muito feliz por fazerem parte do início dessa nova etapa da minha vida. Ana, espero que a sua vida seja repleta de sucesso e felicidade.

Agradeço aos **pacientes** que permitiram que eu os atendesse tanto na FOB quanto no projeto FOB-USP em Rondônia na cidade de Monte Negro. E a **todos os alunos** que se submeteram a minha orientação, com os quais muito aprendi, meu muito obrigado.

“Eu não me importo com o que os outros pensam sobre o que eu faço, mas eu me importo muito com o que eu penso sobre o que eu faço. Isso é caráter.”

Theodore Roosevelt

RESUMO

O objetivo desse estudo foi avaliar a capacidade de dissolução e remoção de biofilme formado *in situ*, na remoção de *smear layer* e debris empregando dez protocolos de irrigação final (solução fisiológica com ou sem agitação ultrassônica; ou hipoclorito de sódio como irrigante primário, seguido de solução salina, ou EDTA 17%, ou ácido peracético (PAA) 2%, ou Qmix, com ou sem agitação ultrassônica de ambas as soluções). Duzentos e trinta raízes bovinas foram seccionadas e cortadas com 15mm de comprimento e instrumentadas com o instrumento Reciproc R50. Para a análise da remoção de debris e *smear layer* foram separadas 100 raízes, que foram clivadas e, no terço apical de uma das metades radiculares, foi confeccionado um sulco longitudinal, simulando extensões de canais ovais, posteriormente preenchidos com detritos artificiais. Após esse procedimento na outra metade foi realizada a formação de *smear layer* com uma vigora instrumentação da parede com movimentos de limagem. Essas amostras foram levadas ao MEV para análise prévia. Essas metades, depois de justapostas, voltaram a mufla e foram realizados os protocolos de tratamento. A análise dos dados foi realizada por meio de scores. Para a análise da dissolução e viabilidade do biofilme *in situ* 130 raízes foram separadas preparadas com instrumento R25 e um disco de dentina foi retirado do terço médio com uma trefina. Esses discos foram inseridos em uma placa de hawley, que foi utilizada pelo pesquisador durante três dias. Os discos foram removidos e deixados por 48 horas em BHI, em estufa a 37°C. Após a contaminação os discos voltaram para a raiz de onde foram removidos e fixados com cera utilidade voltando a mufla, sendo tratados e avaliados. Setenta discos foram utilizados para análise da dissolução e viabilidade em confocal e as imagens obtidas foram avaliadas pelo software Bioimage. Sessenta discos foram utilizados para a análise da dissolução do biofilme em MEV, sendo avaliados pré e pós-tratamento. Na comparação entre os grupos para a remoção de *smear layer* foram encontradas diferenças estatisticamente significantes ($P < 0.05$) entre os protocolos que utilizavam EDTA e Qmix, com os protocolos utilizando somente solução salina e hipoclorito seguido de solução salina independente da agitação ultrassônica. Enquanto que para a ranhura houve uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos que utilizaram PUI e os demais grupos. Tanto a agitação ultrassônica, quanto o uso do hipoclorito de sódio como irrigante primário influenciaram significativamente para a redução do

biovolume e da viabilidade bacteriana. O grupo que utilizou o NaOCl, seguido do Qmix associados ao PUI apresentou os menores valores de viabilidade e a maior dissolução do biofilme. O QMix PUI e o PAA/PUI mostraram os melhores resultados de dissolução na análise em MEV, se diferenciando estatisticamente ($P < 0.05$) dos demais grupos. Levando-se em conta todos os critérios analisados, o protocolo que se mostrou mais eficiente foi o NaOCl seguido do QMix e associados a PUI.

Palavras-chave: Irrigação. Irrigação ultrassônica passiva. Soluções irrigadoras.

ABSTRACT

Evaluation of the effectiveness of different irrigation protocols in the root canal cleaning

The aim of this study was to evaluate the dissolution capacity and removal of biofilm formed *in situ*, in smear layer and debris removal and debris use ten final irrigation protocols (saline with or without ultrasonic agitation, or sodium hypochlorite as primary irrigating, and then used saline or 17% EDTA, or 2% peracetic acid (PAA), or Qmix, with or without ultrasonic agitation of both solutions). Two hundred and thirty bovine roots were sectioned and cut with 15mm in length and instrumented with Reciproc R50. For the analysis of removal of debris and smear layer were separated 100 roots, which were cleaved, and the apical third of the half of root, has a longitudinal groove made simulating extensions of oval canals, artificial subsequently filled with debris. After this procedure was performed on half the formation of smear layer with a force wall with instrumentation filing motions. These samples were taken to SEM prior to analysis. These halves, after juxtaposed, and again the flask were held treatment protocols. Data analysis was performed by means of scores. For the analysis of the dissolution and viability of the biofilm in situ roots 130 were prepared with R25 separate instrument and dentin disc was taken from the middle third with a trephine. These disks were inserted into a hawley plate, which was used by the researcher for three days. The discs were removed and left for 48 hours in BHI at 37°C. After contamination disks back to the root from which they were removed and fixed with wax utility returning to muffle being treated and evaluated. Seventy disks were used for analysis of dissolution and viability and confocal images were evaluated by Bioimage software. Sixty discs were used for the analysis of the dissolution of the biofilm SEM and are assessed before and after treatment. Comparing the groups for the removal of smear layer statistically significant differences were found ($P < 0.05$) between the protocols used EDTA and Qmix with the protocols using only saline solution and hypochlorite followed by saline independent of ultrasonic agitation. While for the slot there was a statistically significant difference between the groups using PUI and the other groups. Both ultrasonic agitation, and the use of sodium hypochlorite as primary irrigant influenced significantly to the reduction of bacterial viability and biovolume. The group using the NaOCl, and then used Qmix associated with PUI had the lowest viability values and

the highest dissolution of the biofilm. The QMix PUI and the PAA / PUI showed the best dissolution results in the analysis MEV.se differentiating statistically ($P < 0.05$) from the other groups. Taking into account all the criteria analyzed, the protocol that was more efficient was the NaOCl and then used QMix and associated with PUI.

Key words: Irrigation. Passive ultrasonic irrigation. Irrigating solutions.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Imagens representativas dos escores de remoção de detritos: (1) Sulco vazio; (2) Menos de 50% do sulco preenchido com detritos; (3) Mais de 50% do sulco preenchido com detritos e (4) Sulco totalmente preenchido com detritos.....	55
Figura 2 -	A análise da remoção da smear layer foi feita atribuindo os seguintes scores: 1- 90-100% dos túbulos dentinários visíveis; 2- 50-90% dos túbulos dentinários visíveis; 3- 10-50% dos túbulos dentinários visíveis; 4 – 0-10% dos túbulos dentinários visíveis.....	55
Figura 3 -	Figura representativa das imagens obtidas após a realização dos protocolos de irrigação em microscopia confocal de varredura a laser.....	48
Figura 4 -	Figura representativa das avaliações em MEV frente ao protocolo de irrigação 1.....	66
Figura 5 -	Figura representativa das avaliações em MEV frente ao protocolo de irrigação 2.	67
Figura 6 -	Figura representativa das avaliações em MEV frente ao protocolo de irrigação 3.....	68
Figura 7 -	Figura representativa das avaliações em MEV frente ao protocolo de irrigação 4.	69
Figura 8 -	Figura representativa das avaliações em MEV frente ao protocolo de irrigação 5.....	70
Figura 9 -	Figura representativa das avaliações em MEV frente ao protocolo de irrigação 6.....	71
Figura 10 -	Figura representativa das avaliações em MEV frente ao protocolo de irrigação 7.....	72
Figura 11 -	Figura representativa das avaliações em MEV frente ao protocolo de irrigação 8.....	73
Figura 12 -	Figura representativa das avaliações em MEV frente ao protocolo de irrigação 9.....	74
Figura 13 -	Figura representativa das avaliações em MEV frente ao protocolo de irrigação 10.....	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição numérica e percentual dos pacientes, de ambos os grupos, de acordo com as faixas etárias.....	63
Tabela 2 - Distribuição numérica e percentual dos pacientes, de ambos os grupos, de acordo com o sexo.....	65

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

NaOCl	Hipoclorito de Sódio
PAA	Ácido Peracético
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
HEBP	Ácido Etidrônico
MTA	Agregado de Trióxido Mineral
MEV	Microscópico Eletrônico de Varredura
L	Litro
mL	Mililitro
µl	Microlitro
mm	Milímetro
g	Grama
mmol	Milimol
min	Minuto
kHz	quilohertz
PUI	Irrigação ultrassônica passiva
Er, Cr:YSGG	Erbium-Chromium: Yttrium, Scandium, Gallium , Garnet
PDT	Terapia fotodinâmica
Er:YAG	Erbium YAG
BHI	Brain heart infusion

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
+/-	Mais ou menos
+	Mais
Nº	Número
X	Vezez
<	Menor

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	REVISÃO DE LITERATURA	29
2.1	Soluções irrigadoras	31
2.1.1	Solução salina	31
2.1.2	Hipoclorito de sódio	32
2.1.3	Ácido etilenodiamino tetra-acético	34
2.1.4	Ácido peracético	36
2.1.5	Qmix	38
2.2	Irrigação ultrassônica passiva	41
3	PROPOSIÇÃO	45
4	METODOLOGIA	49
4.1	Seleção e instrumentação dos espécimes	51
4.2	Prepararo dos espécimes	52
4.2.1	Remoção de Smear Layer e Debris	52
4.2.2	Ação Antimicrobiana e Dissolução do biofilme in situ	54
4.3	Protocolos de irrigação	56
4.4	Análises	57
4.4.1	Remoção de Smear Layer e Debris	57
4.4.2	Biofilme in situ – Dissolução e ação antimicrobiana - Confocal	58
4.4.3	Biofilme in situ – Dissolução – MEV	59
4.4	Análise estatística	60
5	RESULTADOS	61
5.1	<i>Remoção de Smear Layer e Debris</i>	63
5.2	<i>Dissolução e viabilidade do biofilme in situ</i>	64
5.2.1	Análise em Confocal	64
5.2.2	Análise em MEV	64
6	DISCUSSÃO	77
7	CONCLUSÕES	85
	REFERÊNCIAS	89

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

O principal objetivo da terapia endodôntica é a remoção dos tecidos pulpare, seus restos e micro-organismos do sistema de canais radiculares buscando a limpeza e a antissepsia completa. Todavia, devido à complexa anatomia do sistema de canal radicular, mais de 50% de suas paredes permanecem sem ser instrumentados (PETERS et al., 2001). Em consequência, a persistência de polpa residual, dentina infectada e biofilmes microbianos podem ser fatores determinantes do fracasso do tratamento endodôntico.

Os restos de tecido orgânico e os biofilmes microbianos com seus produtos são os principais fatores etiológicos na iniciação, propagação e perpetuação da periodontite apical crônica (KAKEHASHI et al., 1965; MOLLER et al., 1981). Ultra-estruturalmente os biofilmes formam micro-colônias com canais dispersos, os quais estão separados do meio ambiente externo por uma matriz. As células dentro do biofilme produzem matriz extracelular e, geralmente, as alocadas em maior profundidade estão expostas às condições ambientais que diferem das condições existentes na superfície. Um exemplo desta modificação é a diminuição da tensão de oxigênio (FIGDOR; SUNDQÜIST, 2007). Além disso, a baixa taxa metabólica dos micro-organismos dentro do biofilme, assim como a matriz extracelular, dificultam a ação e efetividade de muitos antimicrobianos (DUVANAT et al., 2006). Portanto, é interessante que os estudos sobre a efetividade antimicrobiana das soluções irrigadoras devem ser conduzidos com micro-organismos na forma de biofilme (CHAVEZ DE PAZ, 2007).

Convencionalmente, a antissepsia do sistema de canais radiculares é realizada mediante procedimentos de preparo químico-mecânico que inclui a limpeza e modelagem dos canais radiculares e a aplicação de soluções químicas desinfetantes (SIQUEIRA-JÚNIOR et al., 2007). Embora esta técnica seja o procedimento padrão para a desinfecção dos canais radiculares com polpa necrótica, em muitas oportunidades, esta técnica pode falhar na eliminação completa dos biofilmes microbianos e restos de tecido orgânico, principalmente devido a diversos fatores microbiológicos e anatômicos (KVIST et al., 2004; NAIR et al., 2005), como foi demonstrado por diversos estudos que avaliaram o preparo químico-mecânico, e que apresentaram crescimento bacteriano de amostras tiradas antes da obturação do canal radicular (SJOGREN et al., 1997). É importante

mencionar que a persistência das infecções é atribuída à resistência dos micro-organismos aos agentes antimicrobianos. Desta forma os micro-organismos de um biofilme podem permanecer inativos ou se desenvolver muito lentamente quando as condições não são favoráveis para seu crescimento (XU et al., 2000). As bactérias existentes em canais com polpas necróticas têm que sobreviver em condições de limitada de nutrientes. Estas bactérias em condições de stress e ausência de nutrientes desenvolvem reações regulatórias adaptativas para mudar seu balanço metabólico e a biossíntese de energia necessária para suas funções biológicas fundamentais (WATSON et al., 1998). Em consequência, as bactérias em estado de “stand by” podem se manter viáveis mas não cultiváveis por sua quantidade reduzida. No entanto, quando as condições ambientais tornarem favoráveis novamente, elas podem se reproduzir e desenvolver rapidamente (SHEN et al., 2010).

A irrigação é um dos aspectos mais importantes no preparo biomecânico do canal radicular, já que mediante este procedimento a solução irrigadora pode atingir lugares onde os instrumentos podem não chegar devido à complexa anatomia do sistema de canais radiculares (QING et al., 2006).

O hipoclorito de sódio tem sido o irrigante antimicrobiano mais empregado na realização do tratamento endodôntico. Sua capacidade antimicrobiana *in vivo* pode depender de fatores como sua concentração, temperatura, tempo de contato, pH e concentração do ácido hipocloroso (ESTRELA et al., 2002). O hipoclorito de sódio em todas suas concentrações é efetivo na dissolução de biofilme oral quando comparado com a Clorexidina. Entretanto, uma limitação desta substância é sua alta toxicidade aos tecidos periapicais, e, quando usado em altas concentrações, causa danos estruturais na dentina (BARNHART et al., 2005; PASCON et al., 2009; DEL CARPIO et al., 2011).

Durante o preparo biomecânico, há deposição de raspas de dentina provenientes da instrumentação nas paredes do canal radicular, que contribuem para a formação de uma camada constituída por uma estrutura amorfa fracamente aderida a elas, denominada de smear layer. Segundo Paiva e Antoniazzi (1988), a dentina excisada junto a uma massa gelatinosa de tecido necrótico remanescente e fluido tecidual deve ser englobada e eliminada pela instrumentação e substância química irrigadora, para que aumentem as chances de sucesso da terapia endodôntica. Isso evitaria a formação de um magma com sua possível deposição no

forame radicular dificultando de alguma maneira o preparo biomecânico, o tratamento e, conseqüentemente, o reparo. Além disso, a remoção da camada de smear layer expõe os túbulos dentinários, permitindo uma ação mais eficiente dos curativos de demora e uma melhor adaptação do material obturador às paredes do canal radicular (GOLDBERG; ABRAMOVICH, 1977; SPANÓ et al., 2009).

Apesar da solução de hipoclorito de sódio ter se mostrado eficiente sobre o componente orgânico dos canais radiculares, estudos realizados por meio da microscopia eletrônica de varredura têm demonstrado que essa substância é ineficaz em promover a remoção da porção inorgânica da smear layer (BAKER et al., 1975; MCCOMB; SMITH, 1975; CIUCCHI; KHETTABI; HOLZ, 1989; GARBEROGLIO; BECCE, 1994).

Para a eliminação dessa camada de smear layer vários métodos têm sido propostos, e para isso geralmente se utilizam os agentes quelantes ou desmineralizantes (MCCOMB; SMITH, 1975; SCELZA et al., 2003; HÜLSMANN et al., 2003). Os agentes quelantes atuam como auxiliares na terapia endodôntica, suprimindo a ineficiência do hipoclorito de sódio em remover a matriz mineral do dente durante o preparo biomecânico do canal radicular (HÜLSMANN et al., 2003; SCELZA et al., 2004).

A solução quelante de EDTA é, provavelmente, a mais empregada na atualidade, devido ao seu baixo custo e bons resultados obtidos. Ela pode ser utilizada após a instrumentação para a limpeza final do canal ou alternadamente com a solução de hipoclorito de sódio durante a instrumentação dos canais radiculares (GOLDMAN et al., 1982).

Soluções como o Qmix™ 2 in 1 (Dentsply Tulsa Dental, Tulsa, OK) têm apresentado bons resultados tanto na remoção de smear layer (DAI et al., 2011) quanto em ação antimicrobiana (WANG et al., 2012; STOJICIC et al., 2012; MORGENTAL et al., 2013; WANG et al., 2013), e uma aceitável biocompatibilidade (CHANDRASEKHAR et al., 2013), sinalizando ser um potencial substituto para o EDTA, que é utilizado convencionalmente. Outra solução que vem sendo apontada na literatura como promissora é o ácido peracético (PAA) que tem demonstrado um bom potencial antimicrobiano (GUERREIRO-TANOMARU et al., 2011; ORDINOLA-ZAPATA et al., 2013; CORD et al., 2014) propriedades antifúngica, antiviral e esporicida, (MCDONNELL; RUSSELL, 1999) e apresentando-se promissor na remoção de smear layer (LOTTANTI et al., 2009; DE-DEUS et al., 2011).

Entretanto uma concentração de 2,25% de PAA é mais cáustica, podendo apresentar maior irritação aos tecidos. Em estudo De Deus et al. (2011) compararam a capacidade de remoção de smear layer da solução de PAA a 0,5% com a da solução PAA a 2,25%, verificando que após 60 segundos os resultados foram semelhantes.

Uma forma de potencializar o efeito de soluções irrigadoras, é mediante o uso de agitação mecânica. A irrigação ultrassônica, pela ativação acústica do irrigante, tem sido sugerida para promover a antissepsia de áreas onde os instrumentos não conseguem atingir, mostrando ser útil na limpeza do sistema de canais radiculares, conseguindo remover até restos inorgânicos que não podem ser eliminados com os irrigantes convencionais (AHMAD et al., 1987; SABINS et al., 2003; VAN DER SLUIS et al., 2007). No entanto o efeito da agitação ultrassônica em protocolos utilizando hipoclorito de sódio e os novos quelantes como o Qmix™ e PAA na capacidade de dissolução de biofilme e smear layer tem sido pouco investigada.

O hipoclorito de sódio tem apresentado a capacidade de dissolução, no entanto, resíduos de biofilme ainda podem permanecer; a agitação com ultrassom pode vir favorecer uma maior capacidade de remoção, necessitando esclarecer este fato. Outro aspecto importante a se verificar é se irrigante final, EDTA, Qmix™ ou PAA, empregado após o hipoclorito de sódio pode vir favorecer uma maior remoção da “smear layer”, bem como colaborar na degradação do biofilme e na viabilidade bacteriana.

2 Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 SOLUÇÕES IRRIGADORAS

O arsenal de soluções irrigadoras destinadas ao tratamento endodôntico e disponíveis comercialmente é amplo. Escolher a solução adequada depende da conjunção das propriedades da solução associada aos efeitos que se deseja obter com a irrigação de acordo com a condição clínica. Nos casos onde a polpa se encontra mortificada e há infecção, as soluções irrigadoras tem como função promover uma antissepsia, dissolver os tecidos necróticos e facilitar sua remoção, bem como neutralizar as toxinas bacterianas (SOARES; GOLDBERG, 2011; HAAPASALO et al., 2014).

2.1.1 SOLUÇÃO SALINA

A solução salina normalmente é utilizada para neutralizar outras soluções irrigadoras (LIMA; FAVA; SIQUEIRA, 2001), no intervalo entre outras soluções (HAAPASALO et al., 2014), na remoção de medicação intra-canal e nos estudos envolvendo soluções irrigadoras é utilizada como controle (ALVES et al., 2013).

EFEITO ANTIMICROBIANO

Usualmente a solução salina não é empregada como agente antimicrobiano, uma vez que não possui esse potencial. Por ser considerado inerte do ponto de vista antimicrobiano é utilizada como controle (SENA et al., 2006; TYAGI et al., 2013; YAP et al., 2014), ou seja, proporcionando o mínimo de ação antimicrobiana e simulando apenas a ação física de um protocolo utilizado. Além disso, estudos como o de Niazi et al. (2014) mostra uma maior viabilidade no biofilme tratado com solução salina do que os não tratados.

REMOÇÃO DE SMEAR LAYER

Remover a smear layer gerada durante a instrumentação das paredes do canal radicular é uma condição essencial para a melhor efetividade antimicrobiana da solução irrigadora nos túbulos dentinários (WANG et al., 2013), além de melhorar a capacidade de selamento da obturação (SHAHRAVAN et al., 2007). Nos estudos

onde a solução salina é utilizada para esse fim, essa não tem se mostrado eficiente, principalmente quando comparada ao EDTA (KARUNAKARAN et al., 2012; BALTO; GHANDOURAH; AL-SULAIMAN, 2012; AHIR et al., 2014). E tem então sido utilizada como controle, assim como nas avaliações da ação antimicrobiana dos irrigantes (CANDEIRO et al., 2011; BALTO; GHANDOURAH; AL-SULAIMAN, 2012; AHIR et al., 2014).

2.1.2 HIPOCLORITO DE SÓDIO

O hipoclorito de sódio é dentre todas as soluções irrigadoras conhecidas, a mais eficiente para limpeza dos sistemas de canais radiculares (LOTTANTI et al., 2009). Atualmente diversas concentrações dessa solução têm sido utilizadas, podendo variar de 0,5% até 6% (BAŞER CAN et al., 2015). No rol das propriedades que tornaram o hipoclorito de sódio a solução irrigadora mais utilizada na irrigação dos canais radiculares foi a sua boa capacidade de limpeza, um efetivo poder antimicrobiano, dissolução de tecidos orgânicos, potencial de inibição de outros agentes tóxicos, e desodorizante (SOARES; GOLDBERG, 2011).

EFEITO ANTIMICROBIANO

O potencial antimicrobiano do NaOCl é bastante conhecido, e tem agregado a esse potencial, um alto poder de dissolução da matéria orgânica. Em concentrações de 1% o NaOCl tem mostrado uma boa ação antimicrobiana e de dissolução de biofilmes imaturos (CHÁVEZ DE PAZ; BERGENHOLTZ; SVENSÅTER, 2010).

Frente a biofilmes produzidos *in situ* e biofilmes maduros não apresentam a mesma eficácia em função do desafio propiciado por esse tipo de biofilme, porém tem se mostrando mais eficaz que outras soluções como EDTA e ácido cítrico (ORDINOLA-ZAPATA et al., 2012). Rahimi et al. (2012) mostrou ainda que em biofilmes maduros criados no interior do canal radicular, o NaOCl 1% mostra-se mais eficiente que a irradiação por laser Nd:YAG, e, segundo Yap et al. (2014), mais eficiente que a solução fisiológica tanto em biofilmes maduros mono espécies e multi-espécies, na dissolução e na ação antimicrobiana.

Na concentração de 1% tem sua ação reduzida frente a biofilmes maduros (WANG; SHEN; HAAPASALO, 2012). Quando utilizado na concentração

de 2,5%, o NaOCl tem seu poder de dissolução e antimicrobiano aumentado. No estudo realizada por Wang et al. (2012) com biofilmes maduros e jovens criados *in vitro* dentro dos túbulos dentinários, e, observaram que o NaOCl a 2% foi tão eficiente quanto a clorexidina a 2%, enquanto que o NaOCl a 6% foi a substância que apresentou o melhor potencial antimicrobiano, seguido pelo Qmix. Em concentrações em torno de 5 a 6%, o NaOCl tem se mostrado o irrigante mais eficiente tanto na dissolução como na ação antimicrobiana em relação as suas concentrações mais baixas e a outros agentes irrigantes utilizados em endodontia (DEL CARPIO-PEROCHENA et al., 2011; FRÁTER et al., 2013). Guerreiro-Tanomaru et al. (2014) mostrou que o NaOCl 2,5% é mais eficiente que a clorexidina e QMix na dissolução e ação antimicrobiana sobre biofilmes de monespécie de *Enterococcus faecalis*.

Em biofilmes *in situ*, Del Carpio-Perochena et al. (2011) mostrou que mesmo as soluções mais concentradas de NaOCl apresentam dificuldade para uma completa remoção do biofilme da superfície dentinária, levando até trinta minutos para uma remoção completa do biofilme sobre a superfície em contato direto. Entretanto sendo mais eficiente que a clorexidina (DEL CARPIO-PEROCHENA et al., 2014).

REMOÇÃO DE SMEAR LAYER

O hipoclorito de sódio é utilizado principalmente como irrigante primário. E apesar de apresentar inúmeras virtudes como irrigante endodôntico, tem sua eficácia limitada no que tange a ação quelante e desmineralizante de tecidos minerais. Torabinejad et al. (2003) comparou o NaOCl 5,25% utilizado como irrigante único ou sua associação com um irrigante secundário (água destilada, EDTA, MTAD) e avaliando em Microscopia eletrônica de varredura (MEV), observaram uma semelhança da superfície dentinária tratada apenas com o NaOCl 5,25% com os espécimes tratados com água destilada como irrigante final e piores em relação ao uso do EDTA e MTAD, que foram eficazes na limpeza da superfície dentinária. Wu et al. (2012) compararam o NaOCl 3% com quatro agentes indicados para irrigação final (EDTA 17%, ácido cítrico 20%, MTAD e Smear Clear). Os resultados para o NaOCl foram similares aos obtidos com os de Torabinejad et al. (2003), mostrando a presença de smear em todo o espécime, e, dentre os irrigantes finais, o EDTA mostrou-se o mais eficiente. Resultados semelhantes a esses

também foram encontrados por Andrabi et al (2012) utilizando-se NaOCl 3% e o comparando com os mesmos irrigantes finais e com a água destilada, para avaliações nos terços apical, médio e cervical.

Venkataram et al. (2013) avaliaram em MEV a eficácia do NaOCl 2,5% extrato de camomila e MTAD na remoção de smear layer em canais de dentes decíduos. Os resultados encontrados mostraram que o extrato de camomila foi mais eficaz que o NaOCl e menos eficaz que o MTAD para a remoção da camada de smear layer. Esses resultados são corroborados por um estudo mais recente de Ahir et al. (2014) que mostra a ineficiência do NaOCl na remoção da smear layer quando comparado a protocolos que utilizam outra substância como irrigante final.

2.1.3 ÁCIDO ETILENODIAMINO TETRA-ACÉTICO

O Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) é um irrigante endodôntico geralmente utilizado após a instrumentação pela sua ação quelante, pela qual remove a camada de smear layer (SAHAR-HELFT et al., 2013). O EDTA, ou ácido etileno diamino tetracético, introduzido na Endodontia por ØSTBY em 1957, sob a forma de solução aquosa a 15,5% e pH 7,3, facilita a instrumentação de canais atrésicos, pois tem a capacidade de desmineralizar a dentina por meio de uma união estável com íons cálcio (ØSTBY, 1957). Sendo utilizado como irrigante final ou alternado com o NaOCl (GOLDMAN et al., 1982).

EFEITO ANTIMICROBIANO

Como é um irrigante bastante empregado na endodontia o EDTA tem suas propriedades antimicrobianas estudadas, uma vez que frequentemente é o irrigante final no tratamento. Bryce et al. (2009) realizaram um estudo com o objetivo de verificar a ação antimicrobiana de agentes irrigantes sobre biofilmes de micro-organismos isolados de canais radiculares. Os autores observaram uma baixa eficácia antimicrobiana do EDTA sobre o biofilme, principalmente quando comparado ao hipoclorito de sódio. Além disso, o EDTA condiciona a dentina de tal forma que possibilita um aumento na quantidade de micro-organismos aderidos, bem como a força de adesão dos mesmos (KISHEN et al., 2008), e comparado a outros irrigantes tem um baixo poder de contenção na reinfecção, ou seja baixa atividade residual, que só pode ser melhorada com a adição de coadjuvantes em

sua composição (FERRER-LUQUE et al., 2012). Em biofilmes mistos desenvolvidos *in situ* na cavidade bucal, Ordinola-Zapata et al. (2012) avaliaram a efetividade de agentes irrigantes comumente utilizados em endodontia e verificaram que o hipoclorito de sódio foi o mais efetivo para a dissolução e na extenuação do biofilme. Já o EDTA não se mostrou eficiente para esses fins e teve uma ação comparada à da solução salina.

Entretanto há quem contradiga esses achados. Há um estudo onde mostra um potencial quase nulo de desorganização da estrutura do biofilme, entretanto, um alto potencial antimicrobiano do EDTA, chegando a níveis parecidos aos do hipoclorito de sódio, quando utilizado em pH 12, e 50 mmol/L, afetando a integridade da membrana de biofilmes de 24 horas de *E. faecalis*, *L. paracasei*, e *S. anginosus* (CHÁVEZ DE PAZ; BERGENHOLTZ; SVENSÄTER, 2010).

O EDTA tem ainda atividade antifúngica contra a *Candida albicans*, a qual é um fungo frequentemente associado a insucessos endodônticos. Avaliando-se a ação antifúngica do EDTA em relação ao ácido thylene glycol-tetraacético (EGTA), tetrafluoreto de titânio, fluoreto de sódio, nistatina e cetoconazol, o EDTA e o tetrafluoreto de titânio mostraram a melhor ação antifúngica (ATES; AKDENIZ; SEN, 2005). Esse estudo corrobora com um estudo anterior de Sen et al. (2000) que compararam o halo de inibição do EDTA em relação a diversos antifúngicos e ao hipoclorito de sódio, tendo o EDTA com os resultados mais satisfatórios.

REMOÇÃO DE SMEAR LAYER

O poder de remoção da smear layer pelo EDTA o faz um dos quelantes mais utilizados na irrigação dos canais radiculares. Este normalmente é utilizado como padrão ouro para a remoção de smear layer nos comparativos em pesquisas (LOTTANTI et al., 2009; KIRCHHOFF et al., 2014).

Em um estudo avaliando a remoção de smear layer em MEV por diversos agentes irrigantes (EDTA, vinagre de maçã, ácido maleico 5%, ácido acético e água destilada como controle), o EDTA promoveu os melhores resultados, mostrando-se ser a solução mais eficaz (KIRCHHOFF et al., 2014). Outro trabalho verificando a remoção de smear layer com avaliação em MEV foi realizado por Cehreli et al. (2013). Esse trabalho realizado *in vivo*, promoveu a instrumentação e irrigação de canais com NaOCl 5,25% ou EDTA 17% ou MTAD biopure, e foram extraídos imediatamente. E dentre essas soluções irrigadoras o EDTA mostrou resultados

significativamente melhores as custas de uma maior erosão dentinária. Já em um estudo realizado por Zia et al. (2014) realizados em dentes extraídos, pode-se observar uma equivalência do EDTA ao MTAD biopure, sendo mais eficientes que a solução salina. Eliot et al. (2014) comparou três formulações diferentes do QMix com o EDTA e encontrou uma melhor efetividade do QMix na remoção de smear layer no terço apical, e, equivalência entre os resultados das soluções nos terços médios e cervicais, mostrando uma alternativa viável ao EDTA para a irrigação final. Alternativa seria a utilização do EDTA gel, que tem se mostrado tão eficiente quanto o líquido nas mesmas concentrações e condições de uso (KIM et al., 2013).

2.1.4 ÁCIDO PERACÉTICO

Uma substância promissora para ser empregada como quelante e com ação antimicrobiana é o ácido peracético (LOTTANTI et al., 2009). Apesar de ter sido amplamente utilizado em endodontia na Europa Oriental na década de 1980, somente há pouco tempo o PAA foi sugerido como uma solução química auxiliar com potencial para substituir o EDTA na irrigação final após o preparo biomecânico. O PAA é um peroxigênio que apresenta, em concentrações menores que 0,5%, ação esporicida, bactericida, virucida e fungicida, mesmo na presença de proteínas (LENSING; OEI, 1985). Durante o seu emprego, o PAA se decompõe em subprodutos seguros como o ácido acético e oxigênio. O fato de o ácido acético ser liberado ou estar presente nas soluções de PAA apresenta a possibilidade de essa substância ser usada após a instrumentação como irrigante final para dissolver a camada de smear layer e colaborar na antisepsia do sistema de canais radiculares (LOTTANTI et al., 2009).

EFEITO ANTIMICROBIANO

O potencial antimicrobiano do PAA foi um fator crucial para propor sua utilização na endodontia, como irrigante final em substituição ao EDTA. Essa substância possui rápida ação antimicrobiana de amplo espectro, sendo capaz de inativar bactérias Gram positivas e Gram negativas, fungos e leveduras em 5 minutos ou menos (RUTALA; WEBER, 1999). A explicação para essa propriedade está em sua ação oxidante, que leva a desnaturação de proteínas, ruptura da membrana celular, oxidação de sulfidrilas e a formação de ligações de enxofre em

proteínas, enzimas e outros metabólitos e consequentemente a morte microbiana (CORD et al., 2014).

Diversas concentrações do PAA têm sido testadas *in vitro* com o objetivo de verificar qual a ideal para se obter uma ação antimicrobiana satisfatória. Em um estudo utilizando *Enterococcus faecalis* em suspensão, o PAA a 1% reduziu as contagens bacterianas em 86% após 3 min e eliminou completamente o *E. faecalis* após 10 min, mostrando uma ação eficaz contra este micro-organismo, apesar de sua ação ser mais lenta em comparação com o NaOCl a 2.5% e a CHX a 2% (GUERREIRO-TANOMARU et al., 2011). A ação antimicrobiana do PAA 1% também foi analisada em dentes unirradiculados contaminados com *E. faecalis*, e, os resultados mostraram que os grupos em que foram utilizados o PAA a 1%, o NaOCl a 2.5% e a clorexidina a 2% tiveram contagens bacterianas mais baixas que os demais grupos (DORNELLES-MORGENTAL et al., 2011). Resultados semelhantes foram encontrados quando se utilizou raízes mesiais de molares inferiores também contaminadas com *E. faecalis*, sendo que a irrigação final com PAA 1% apresentou resultados antimicrobianos similares a irrigação convencional em que associou o EDTA a 17% seguido do NaOCl a 2,5%, o que reforça o seu uso com o intuito de reduzir o protocolo ideal de irrigação (CORD et al., 2014).

Quando avaliada a ação do PAA a 2% em biofilmes de 5 dias, essa solução mostrou uma percentagem de células mortas similar a clorexidina e significativamente menor quando comparada ao NaOCl e a mistura de NaOCl + HEBP (ácido etidrónico). Quanto a diminuição do biovolume total, os resultados do PAA continuaram inferiores aos do NaOCl e mistura de NaOCl + HEBP, mas foram superiores aos do grupo controle e da clorexidina (ARIA-MOLIZ et al., 2014). Já em biofilmes criados *in situ* sobre dentina, a solução de PAA a 4% se mostrou tão eficiente para remover e matar o biofilme quanto às soluções de NaOCl a 2,5 e 5,25% (ORDINOLA-ZAPATA et al., 2013).

Durante a etapa de obturação do sistema de canais radiculares também é importante que sejam tomados determinados cuidados para evitar que micro-organismos sejam levados para o interior do sistema de canais radiculares. Devido a isso e ao elevado poder antimicrobiano, o PAA também foi testado na desinfecção de cones de guta percha contaminados *in vitro* com *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Candida albicans* e *Bacillus subtilis* (SALVIA et al., 2011). Os autores observaram que a exposição dos cones por apenas 1 min ao

PAA a 2% foi eficaz contra os biofilmes de todos os micro-organismos testados. Esses resultados foram corroborados por outro estudo que mostrou que tanto em cones de guta percha quanto de resilon, contaminados com *Enterococcus faecalis* e *Bacillus subtilis*, o PAA promoveu uma desinfecção melhor que o NaOCl 3% e similar a clorexidina a 2% (SUBHA et al., 2013).

REMOÇÃO DE SMEAR LAYER

O PAA somado à uma boa ação antimicrobiana têm se mostrado eficiente na remoção de smear layer das paredes do canal radicular. Na concentração de 2,25% mostrou-se tão eficiente quanto o EDTA na irrigação final (LOTTANTI et al., 2009). Outro estudo realizado comparando o PAA nas concentrações de 0.5 e 2,25% e o EDTA a 17% mostrou que após sessenta segundos de exposição da dentina houve uma ação similar de remoção de smear layer entre todos os irrigantes (DE-DEUS et al., 2011). O que se vê tanto nos estudos verificando a ação antimicrobiana, quanto analisando a remoção de smear layer, é que há uma discordância com relação a parâmetros de concentração, temperatura, pH e volume da solução.

2.1.5 QMIX

O QMix 2 in 1 (Dentsply Tulsa Dental, Tulsa, OK) foi desenvolvido almejando coadjuvar os efeitos quelantes com os antimicrobianos, uma vez que apresenta o EDTA, clorexidina e cetrimida, em sua composição (DAI et al., 2011). Diversas propriedades já foram estudadas a respeito desse irrigante, fornecendo subsídios sobre sua efetividade, e a viabilidade da sua utilização na prática endodôntica.

EFEITO ANTIMICROBIANO

Com diversos estudos desvendando os mistérios a respeito dos insucessos endodônticos, as diretrizes dos protocolos de irrigação se voltam para um irrigante final que possua bom potencial antimicrobiano. Diversos estudos têm sido realizados a fim de avaliar e determinar o potencial antimicrobiano do QMix. Como os biofilmes são um desafio para as soluções irrigadoras, um irrigante final com potencial antimicrobiano tem sido buscado. O QMix é um irrigante desenvolvido

tanto para atuar sobre matéria inorgânica como sobre microrganismos e seus subprodutos (DAI et al., 2011).

Além de um potencial antimicrobiano similar ao do NaOCl 2% sobre biofilme *in vitro* de *E. Faecalis*, o Qmix apresenta também um bom potencial antimicrobiano sobre microrganismos concentrados nos túbulos dentinários em forma de biofilme imaturo (MA et al., 2011; WANG et al., 2012) e até mesmo sobre biofilme maduro (WANG et al., 2012; WANG et al., 2013). Stojicic et al. (2012) e Morgental et al. (2013) encontraram ainda uma melhor efetividade do QMix em relação ao MTAD e a Clorexidina sobre *E. Faecalis*, tanto na forma planctônica como em biofilme.

Ordinola-Zapata et al. (2013) realizaram uma avaliação da ação antimicrobiana do QMix em biofilme *in situ*, onde pode-se observar que esse não foi tão eficiente quanto o NaOCl 2%, NaOCl 5,25% e o PAA. Entretanto, se mostrou mais eficiente que o MTAD, água destilada, Smear Clear, Ácido maleico 7%. Em outro estudo (GUERREIRO-TANOMARU et al., 2014), a avaliação da ação antimicrobiana foi realizada *in vitro* com biofilmes de *E. Faecalis*, onde compararam a ação do Qmix com as do NaOCl e Clorexidina associadas ou não com certrimida. Verificaram um maior poder de dissolução do NaOCl corroborando com os estudos de Ordinola-Zapata et al. (2013), sendo que o QMix teve uma ação intermediária entre o NaOCl e a Solução fisiológica.

Apesar de não poder ser comparado ao hipoclorito de sódio quanto a capacidade de dissolução de matéria orgânica e ação antimicrobiana em função do tempo, o QMix tem mostrado uma boa ação antimicrobiana e um razoável poder de dissolução dos biofilmes microbianos, principalmente se indicado como irrigante final. Sendo que o seu emprego após a irrigação com Hipoclorito de Sódio pode corroborar coma a limpeza e antissepsia dos canais radiculares.

REMOÇÃO DE SMEAR LAYER

Remover a smear layer é uma condição importante para uma melhor efetividade antimicrobiana da solução irrigadora nos túbulos dentinários (WANG et al., 2013). O QMix se mostrou tão eficaz quanto o EDTA, o irrigante final mais utilizado na endodontia na atualidade para a remoção de Smear Layer, mostrando-se eficiente em uma das funções a que se propõe o irrigante (DAI et al., 2011; STOJICIC, 2012; WANG et al., 2013). O estudo de Aranda-Garcia et al. (2013)

mostra ainda que o QMix além de apresentar uma ação similar à do EDTA, possui ação similar ao Smear Clear, outro irrigante proposto com a mesma finalidade. Apesar da maioria dos autores afirmarem que o QMix é similar ao EDTA, Eliot et al. (2014) encontrou resultados superiores para o QMix na remoção da Smear layer em relação ao EDTA.

A agitação das soluções irrigadoras dentro do canal radicular tem se mostrado como uma potencializadora da ação dos agentes irrigantes. Com o QMix não é diferente. Niu et al. (2014) mostraram que a agitação sônica de diferentes agentes irrigantes, inclusive o QMix, potencializa sua ação e reduz o tempo necessário para a remoção de Smear Layer.

A remoção da smear layer está diretamente ligada a penetração do cimento no interior dos túbulos dentinários. Kara Tuncer (2014) comparou a influência do QMix e do EDTA associado a Clorexidina na penetração intratubular de um cimento obturador. O QMix apresentou resultados similares aos da associação EDTA/Clorexidina e resultados superiores aos do hipoclorito de sódio. Essas observações do estudo foram válidas para o terço cervical e médio. Quando comparados os grupos no terço apical, não houve diferenças significativas para a penetração do cimento, mostrando que ainda há uma deficiência na limpeza da região apical, sinalizando para a utilização de métodos adicionais de irrigação como a agitação ultrassônica passiva (PUI) ou agitação sônica da solução irrigadora.

A remoção de debris resultantes da instrumentação acumulado nas anfractuosidades dos canais radiculares é um desafio. Remover por meio de substâncias químicas não parece ser a forma mais viável, uma vez que Dai et al. (2011) mostraram que a maioria dos irrigantes utilizados, sejam eles quelante ou não, se mostraram ineficazes para a remoção total de debris, elucidando que a agitação ultrassônica parece ser a solução mais viável para a remoção dos debris em anfractuosidades dos canais radiculares.

Jardine et al (2015) comparou a efetividade da limpeza das paredes do canal radicular do QMix com o EDTA 17%, MTAD e solução fisiológica, bem como a relação dessa limpeza com a penetração de um cimento de resina epóxi nas paredes do canal radicular. O Qmix e o EDTA 17% proporcionaram uma melhor limpeza das paredes bem como uma maior penetração de cimento nos túbulos dentinários, mostrando uma relação direta entre a limpeza e a penetração do cimento nos túbulos dentinários.

2.2 IRRIGAÇÃO ULTRASSÔNICA PASSIVA

Existem dois métodos básicos para a produção da energia ultrassônica. Em primeiro lugar, por magneto-estricção que converte a energia eletromagnética em energia mecânica. O segundo método é o piezoelétrico que foi descoberto por Pierre e Jacques Curie em 1880 e consiste na variação das dimensões físicas de certos materiais sujeitos a campos elétricos. O contrário também ocorre, ou seja, a aplicação de pressões. Por exemplo, pressões acústicas que causam variações nas dimensões de materiais piezoelétricos provocam o aparecimento de campos elétricos neles. Os ultrassons magneto-strictivos criam unidades de movimento elíptico, o que não é ideal para uso em endodontia e outro inconveniente com estas unidades é que gera um calor intenso e é necessário ter uma forma de amenizá-lo. Unidades piezoelétricos têm algumas vantagens sobre unidades magnetostritivos como eles produzem mais ciclos por segundo, 40 contra 24 kHz. As pontas destas unidades funcionam com um movimento linear a partir de trás para a frente como um êmbolo, que é ideal para o uso na endodontia (PLOTINO et al., 2007).

Dois tipos de irrigação ultrassônica são descritos na literatura. A primeira é a combinação simultânea de ultrassons de irrigação e de instrumentação. O segundo tipo de funções sem instrumentação simultânea e é conhecido como irrigação passiva ultrassônica (PUI) (ABBOTT et al., 1991). O primeiro praticamente eliminado da prática clínica, devido à dificuldade de controlar o corte da dentina e, subsequentemente, a forma final do canal preparado, estando presente a possibilidade de promover aberrações na formatação do canal radicular. Quando os instrumentos ativados ultrassonicamente são utilizados para preparar os canais radiculares, pode-se confeccionar desvios no canal radicular de graus apicais e perfurações radiculares, especialmente em canais curvos (KLYN et al., 2010). Portanto, não é considerado como uma alternativa para instrumentação manual convencional (ABBOTT et al., 1991, VAN DER SLUIS et al., 2005; VAN DER SLUIS et al., 2007).

Afirma-se ainda que é mais vantajoso aplicar ultrassom para a irrigação passiva (MUNLEY et al., 2007; LOTTANTI et al., 2009). O termo PUI foi usado pela primeira por Weller et al. (1980) para descrever a irrigação sem instrumentação simultânea. Esta tecnologia de vibração sem a intenção de corte da dentina reduz o potencial de criação de formas aberrantes no sistema de canais radiculares. Durante

o PUI, a energia é transmitida a partir de um instrumento ou de um fio oscilando em baixa potência e agitando o irrigante por meio de ondas ultrassônicas que induzem dois fenômenos físicos: um fluxo acústico e a cavitação da solução irrigante. O fluxo acústico pode ser definido como um movimento rápido do fluido em forma circular, ou como um vortex em torno do instrumento que está vibrando. A cavitação é definida como a criação de bolhas de vapor ou a expansão, contração e/ou distorção de bolhas pré-existentes em um líquido (VAN DER SLUIS et al., 2007).

EFEITO ANTIMICROBIANO

Têm se observado uma boa capacidade de remoção de substrato do biofilme em virtude da PUI. Quando comparado com a irrigação convencional, a PUI tem se mostrado mais eficiente na remoção de biofilmes de *Enterococcus faecalis* em dentes unirradiculados (BHUVIA et al., 2010; BHARDWAJ et al., 2013). Entretanto é dependente da solução a ser utilizada para que se obtenha uma antissepsia mais eficaz, principalmente quando se tem biofilmes maduros ou muito espessos (GRÜNDLING, 2011). Quando comparada a ativação do NaOCl 2,5% por laser (Er, Cr:YSGG), PUI e RinsEndo, todos os métodos de ativação mostraram-se igualmente eficazes para a eliminação de biofilmes de *Enterococcus faecalis* em dentes unirradiculares (BAGO JURIČ et al., 2014).

A irrigação passiva ultrassônica apesar de propiciar uma redução da contagem bacteriana em um canal infectado em relação a uma irrigação convencional, não é capaz de promover uma completa antissepsia em todos os casos, despertando ainda a busca por protocolos alternativos (PAIVA et al., 2012).

O estudo de Niazi et al. (2014) mostra uma significativa redução do biovolume de um biofilme multi-espécie induzido *in vitro* em função da agitação ultrassônica da solução. Entretanto nesse estudo não se observa uma potencialização da eficácia antimicrobiana dos agentes irrigantes utilizados, com exceção da tripsina que teve sua ação antimicrobiana potencializada. Uma grande redução microbiana também foi encontrada no estudo de Muhammad (2014) que encontrou uma maior eficiência antimicrobiana em biofilmes multi-espécie de um protocolo utilizando PUI associado ao NaOCl e ao EDTA para a redução bacteriana quando comparado ao PDT com azul de metileno. Quando da utilização do Laser PIPIS pode-se observar uma melhor efetividade em relação à remoção bacteriana em biofilmes multi-espécie produzido *in situ* em relação a PUI, sendo que a PUI

mostrou-se mais eficiente que a irrigação convencional e que a irrigação sônica por meio do Endoactivator (ORDINOLA-ZAPATA et al., 2014).

REMOÇÃO DE SMEAR LAYER E DEBRIS

A irrigação ultrassônica passiva desde que sugerida apresenta o objetivo de melhorar a ação das soluções irrigadoras em suas funções. Goel e Tewari (2009) avaliaram a remoção de smear layer por quatro protocolos de irrigação (seringa convencional e cânulas Navitip FX, irrigação ultrassônica contínua com a saída da solução via cânula ou via peça de mão e PUI). Os autores obtiveram melhores resultados de limpeza quando o EDTA foi levado com a cânula escova cânulas Navitip FX e quando foi agitado de forma intermitente com PUI.

Em 2011, Saber e Hashem compararam a remoção da smear layer após a ativação do irrigante final com Endovac, agitação manual dinâmica e PUI, utilizando NaOCl 2,5% como irrigante. E concluíram que a ativação final com Endovac e agitação manual dinâmica, mostraram melhores resultados do que PUI. Entretanto o NaOCl não tem se mostrado como uma solução irrigadora que possibilite a remoção de smear layer, mesmo em função do PUI, Endovac e irrigação convencional com seringa e agulha (AHMETOGLU et al., 2014). Esses autores mostraram ainda que a eficiência dos protocolos em remover smear layer foi, em função da solução irrigadora (EDTA) e não em função da agitação da mesma.

Sahar-Helft et al. (2015) compararam em MEV a eficácia de três técnicas de irrigação (seringa e agulha, PUI inserido 1mm aquém do comprimento de trabalho e PUI no terço cervical, Laser Er:YAG inserido 1mm aquém do comprimento de trabalho e laser Er:YAG inserido no terço cervical) para a remoção de smear-layer com EDTA 17%. Os melhores resultados foram encontrados quando do uso do laser de baixa potência. A remoção ao longo do canal foi semelhante tanto para o laser no terço cervical quanto para a aplicação a 1mm aquém do comprimento de trabalho. Já em outro estudo realizado por Akyuz Ekim e Erdemir (2015), empregando metodologia semelhante, os autores não encontraram diferença entre PUI e a utilização do laser Er:YAG,.

Castagna et al. (2013) avaliaram, em MEV, a eficácia da agitação ultrassônica passiva na remoção de smear layer e debris das paredes do canal radicular frente a três protocolos de irrigação final (EDTA seguido de NaOCl 2,5%; EDTA/PUI seguido de NaOCl 2,5% e NaOCl 2,5%). As análises mostraram uma

melhora na limpeza do terço cervical do canal radicular, para o grupo onde se utilizou a ativação ultrassônica da solução. Já em 2014, Mozo et al., realizando uma análise semelhante, em quatro diferentes protocolos de irrigação (NaOCl 2,5% levado com seringa e agulha, NaOCl 2,5% PUI com pontas Irrisafe calibre 20, NaOCl 2,5% PUI com pontas Irrisafe calibre 25, NaOCl 2,5% PUI com limas K calibre 25), observaram que a agitação ultrassônica com pontas Irrisafe foi mais eficaz para a remoção de debris dentinários e limpar a embocadura dos túbulos dentinários.

Apesar das controvérsias em relação à melhora da remoção de smear layer com o PUI, a remoção de debris em irregularidades é um fator a ser considerado. Muitos trabalhos têm realizado ranhuras simuladas e preenchendo as mesmas com debris dentinários (JIANG et al., 2010; MARTINS-JUSTO et al., 2014).

De Moor et al. (2009) avaliaram a eficiência da irrigação convencional, PUI e ativação por laser ErCr:YSGG, na remoção de debris depositados em uma ranhura simulada na parede do canal radicular. Os resultados mostraram que o uso do laser resultou em melhor limpeza dos debris em relação ao PUI, que teve resultados significativamente melhores que a irrigação convencional. Em outro estudo em 2010, De Moor et al., mostraram que 20 segundos de ativação do irrigante com laser Er:YAG ou Er,Cr:YSGG foram tão eficientes quanto o PUI em 3 vezes de 20 segundos.

Quando se comparou o PUI com a seringa RinsEndo para a remoção de detritos em irregularidades simuladas, este mostrou-se mais eficiente que a RinsEndo (RÖDIG et al., 2010).

Com relação à agitação ultrassônica passiva pode-se inferir que apesar de alguns estudos não mostrarem resultados satisfatório no seu uso, Jiang et al (2010) mostraram que a eficiência depende do sentido da oscilação do instrumento no canal radicular. E assim sendo quando não há a padronização do sentido, os resultados podem não ser fidedignos.

Martins Justo et al. (2014) realizaram um estudo onde se avaliou em MEV a eficácia de diversas soluções irrigadoras (solução salina, NaOCl 2,5% e clorexidina 2%), com ou sem PUI, na remoção de debris em ranhuras simuladas no terço apical de dentes unirradiculados. Os autores observaram que os protocolos utilizando PUI, independente da solução irrigadora, foram mais eficazes que os sem PUI na remoção de detritos.

3 Proposição

3 PROPOSIÇÃO

Este estudo *in vitro* e *in situ*, randomizado e controlado em dentes bovinos teve como proposta avaliar:

- Em microscopia eletrônica de varredura a capacidade de dissolução e remoção de biofilme formado *in situ*, remoção de smear layer e debris empregando diferentes protocolos de irrigação final utilizando hipoclorito de sódio, seguido de EDTA a 17% ou ácido peracético ou Qmix, com ou sem ativação ultrassônica de ambas as soluções.
- Em microscopia confocal de varredura a laser (MCVL) a capacidade de dissolução e ação antimicrobiana sobre biofilme formado *in situ*, empregando diferentes protocolos de irrigação final utilizando hipoclorito de sódio, seguido de EDTA a 17% ou ácido peracético ou Qmix, com ou sem ativação ultrassônica de ambas as soluções.

4 Metodologia

4 METODOLOGIA

4.1 Seleção e instrumentação dos espécimes

Para se obter a 230 raízes de dentes bovinos necessárias para a realização do estudo que tivessem diâmetro anatômico 40, foram selecionadas oitocentas raízes de incisivos bovinos, de forma que não apresentassem fraturas, má formações, formação incompleta do ápice e fossem retas.

Com a finalidade de se obter raízes com 15 mm de comprimento, a partir do ápice radicular os dentes bovinos foram medidos com paquímetro digital (Starrett Indústria e Comércio Ltda., São Paulo, Brasil), e cortados a 15mm a partir do ponto de referência. Para isso, os dentes foram fixados em uma base de resina (Resina T-208, Redifibra Comércio de Produtos para Fiberglass Ltda, São Paulo, Brasil, 40x40x5 mm³), pela superfície oclusal com cera pegajosa (Asfer Industria Química Ltda). Para o corte das raízes foi utilizado um disco diamantado de dupla face - XL 12205, "High concentration", 102 x 0,3 x 12,7 mm³ (Extec Corp. Enfield, CT, USA/ Ref: 12205), devidamente acoplado à máquina de corte ISOMET 1000 (Extec Corporation, Labcut 1010, USA).

Após o corte os espécimes a serem inseridos no estudo foram selecionados a partir de uma calibragem através da inserção de limas tipo K no canal. Foram selecionadas amostras em que o instrumento de calibre 40 travasse em 14mm a partir da borda coronal do corte, totalizando 230 espécimes. Os espécimes foram divididos aleatoriamente para as três fases do estudo, amostras com 100 espécimes para avaliar a remoção de smear layer e debris das ranhuras, 70 espécimes para a avaliação da dissolução e ação antimicrobiana em MCVL e 60 espécimes para a avaliação da dissoluçãodo biofilme em MEV.

A instrumentação de todos os espécimes foi realizada utilizando-se broca brocas LaAxxess 45/.06 (SybronEndo, EUA) à 10 mm da borda coronal da raiz, para preparo do terço cervical e médio, e com Reciproc 50.05 (VDW, Alemanha) na extensão de instrumentação, que foi de 14mm. Durante o preparo dos canais, foi utilizado 5 mL de Hipoclorito de sódio Cloro Rio 2,5% (Rioquímica, São José do Rio Preto, SP, Brasil).

4.2 Prepararo dos espécimes

4.2.1 Remoção de Smear Layer e Debris

Para essa fase do estudo foi confeccionado um sulco na parte externa da raiz no sentido vestibulo-lingual com auxílio de um disco diamantado em baixa rotação e as raízes foram incluídas em silicona de condensação densa Optosil®/Xantopren® (Heraeus Kulzer, Alemanha) em uma mufla de metal, com o intuito de evitar o extravasamento da solução irrigadora e proporcionar uma maior simulação da realidade. Posteriormente, os dentes foram clivados obtendo-se duas metades. Uma hemissecção recebeu a confecção de um sulco na parede interna do canal, com profundidade de 0,55 mm (+/- 0,05) e 0,4mm de espessura, e 5 mm de extensão no terço apical da raiz, seguindo a metodologia descrita por Justo et al (2014). Esses sulcos foram preenchidos com debris dentinários obtidos por meio do desgaste de dentina de raízes descartadas do estudo com brocas de largo N°6, em baixa rotação.

Os detritos foram misturados na proporção de 1g para 1ml de água e essa mistura foi levada ao sulco preparado com um aplicador de MTA (Ângelus, Londrina-PR, Brasil). Os detritos que porventura permaneceram fora do sulco foram removidos com um micro-aplicador extrafino. Esse trabalho foi realizado seguindo a metodologia descrita por Justo et al (2014), para a montagem da mufla, confecção do sulco, produção e inserção dos debris na ranhura (figuras 1 e 2).

A outra hemissecção teve a formação de smear layer na parede por meio de uma vigorosa instrumentação da parede do canal com lima tipo k 40 em movimento de limagem. Nesta hemissecção foram feitos sulcos de orientação a fim de que se capturasse imagens a 3mm, 6 mm e 9 mm do ápice. Esses sulcos foram feitos com um disco diamantado na lateral da raiz utilizando-se o mesmo disco que foi utilizado para fazer o sulco na parte externa da raiz.

Fonte: Autor

Figura 1. Imagens representativas da etapa de confecção do sulco externo na raiz e montagem em mufla.

Fonte: Autor

Figura 2. Confecção do sulco na região apical, imagem das paredes de uma hemiseção e preenchimento do sulco com debris.

Figura 3. Imagem representativa dos sulcos de orientação.

4.2.2 Ação Antimicrobiana e Dissolução do biofilme *in situ*

As raízes direcionadas para essa fase do estudo foram incluídas em silicona de condensação densa em mufla, com o intuito de evitar o extravasamento da solução irrigadora e proporcionar uma maior simulação da realidade.

Discos de dentina radicular de origem bovina foram utilizados como meio formador de biofilme. Para isso foi retirada da região do terço médio de raízes de incisivos bovinos um disco de dentina de 3mm de diâmetro com uma broca trefina, sendo estes identificados de acordo com os referidos dentes. Os discos foram retirados de 5mm do comprimento do dente (Figura 4).

Fonte: Autor

Figura 4. Remoção dos discos de dentina com uma broca trefina.

As superfícies dentinárias desses discos obtidos foram polidas tentando padronizar o tempo de polimento em cada superfície com a finalidade de manter

uma espessura mínima de 1,00mm. Assim a regularização foi feita através do polimento com lixas de carbeto de silício (Buheler Ltda, Illinois, USA) de granulação 600, acopladas em uma máquina politriz (Fortel Indústria e Comércio Ltda., Brasil), sendo que os discos eram apoiados manualmente, sob refrigeração, por alguns segundos, até ser conseguida uma superfície lisa. Para a confirmação da espessura de cada disco de dentina, foi utilizado um paquímetro digital (Starrett Indústria e Comércio Ltda., São Paulo, Brasil).

Estes discos foram tratados com hipoclorito de sódio 1% (Rioquímica Ltda., São José do Rio Preto, SP, Brasil) durante 15 minutos, em seguida com EDTA a 17% (Biodinâmica, Ibiporã, PR, Brasil) por 5 minutos. Esse tratamento químico teve por objetivo remover resíduos orgânicos e possível presença de raspas de dentina, oriundas do corte. Para constatar a eficácia da limpeza, dois discos por grupo foram aleatoriamente selecionados para a visualização por meio do Microscópio Eletrônico de Varredura.

Após essa etapa, todos os discos foram acondicionados em eppendorfs, contendo 1mL de água destilada, esse conjunto foi esterilizado em autoclave à 121°C.

Para a formação do biofilme oral, o pesquisador teve seu arco superior moldado, para ser confeccionada uma placa ortodôntica removível tipo Hawley. Nesta placa foram confeccionados 9 nichos (5 mm de diâmetro) dispostos em 3 fileiras. Nesses nichos foram colocados os discos de dentina, os quais foram mantidos com cera utilidade (Kota Ind. e Com. Ltda.; São Paulo, SP, Brasil).

Para tal o pesquisador tem ciência dos riscos inerentes ao uso do dispositivo e concorda com a utilização sendo de livre e espontânea vontade a utilização do dispositivo de acordo com as regras do estudo.

O pesquisador utilizou o referido dispositivo intra oral durante 3 dias para possibilitar a formação de biofilme sobre a superfície dos discos de dentina, sem contudo interromper seus procedimentos de higiene. Após esse tempo os discos foram imersos em caldo BHI por 48 horas para uma melhor padronização da viabilidade do biofilme.

4.3 Protocolos de irrigação

Para o estudo foram definidos dez protocolos de irrigação, considerando o irrigante inicial como irrigante primário que foi utilizado por 5 minutos e o final por 4 minutos, todos os protocolos estão descritos na tabela 1.

Tabela 1. Descrição dos grupos estudados

Grupos	Irrigante Primário (5min)	Irrigante Final (4min)
G1	Solução salina	Solução salina
G2	NaOCl	Solução salina
G3	NaOCl	EDTA
G4	NaOCl	QMix
G5	NaOCl	Ácido Peracético
G6	Solução salina + PUI	Solução salina + PUI
G7	NaOCl + PUI	Solução salina + PUI
G8	NaOCl + PUI	EDTA + PUI
G9	NaOCl + PUI	Qmix + PUI
G10	NaOCl + PUI	Ácido Peracético + PUI

Protocolo detalhado:

- ✓ 2 mL Irrigante primário (4 min)
- ✓ 3x2 mL Irrigante primário (20 segundos, com ou sem PUI)
- ✓ 4 mL s. salina
- ✓ 2 mL Irrigante Final (3 min)
- ✓ 3x2 mL Irrigante Final (20 segundos, com ou sem PUI)
- ✓ 4 mL s. salina

A irrigação foi executada utilizando-se pontas de corpo de plástico com pescoço angulado e uma cânula de metal fina (NaviTip®, Ultradent Products, USA) acopladas a uma seringa de plástico descartável transparente de 5 ml com rosca Luer Lock (Ultradent Products, USA), inundando-se o canal com o agente irrigante.

Uma ponta E1-IRRISONIC (HELSE) acoplada a caneta do ultrassom Varios 350 (NSK, Nakanishi inc.) para realização da ativação ultrassônica, a distância de 1mm aquém do comprimento de trabalho.

4.4 Análises

4.4.1 Remoção de Smear Layer e Debris

As hemissecções foram levadas ao microscópio de varredura Personal SEM© (PSEM) eXpress™ (Aspex corporation), a baixo vácuo para captura das imagens na porção cervical, média e apical antes dos protocolos de irrigação a um aumento de 500X, e na ranhura a um aumento de 35X. Posteriormente, os dentes foram montados e divididos aleatoriamente em grupos conforme os protocolos estabelecidos, sendo que foram empregados dez dentes (n:10) para cada um dos grupos.

Após o procedimento de irrigação, foi realizada a captura das imagens novamente no microscópio, nas mesmas áreas com os mesmos aumentos. Para a captura das imagens nos mesmos pontos foram utilizadas as referências dos sulcos realizados na zona de secção, descritas anteriormente.

Para analisar a remoção de debris dos sulcos pré-fabricados foram utilizados os seguintes scores: 1- sulco vazio; 2- menos de 50% do sulco preenchido com detritos; 3 mais de 50% do sulco preenchido com detritos e 4 - sulco totalmente preenchido com detritos (Van der Sluis et al, 2010). A análise da remoção da smear layer foi feita atribuindo os seguintes scores: 1- 90-100% dos túbulos dentinários visíveis; 2- 50-90% dos túbulos dentinários visíveis; 3- 10-50% dos túbulos dentinários visíveis; 4 – 0-10% dos túbulos dentinários visíveis.

As imagens foram avaliadas por dois avaliadores previamente calibrados e de forma cega, não tendo conhecimento sobre qual grupo pertencia as imagens. A calibração dos avaliadores foi feita através da apresentação de dez imagens representativas dos escores. Após 24 horas os examinadores receberam as imagens de cada variável numeradas de 1 a 100 para avaliação. O teste Conhen's Kappa foi utilizado para avaliar a concordância entre avaliadores (numero do kappa). Os resultados obtidos das avaliações após os tratamentos foram subtraídos dos

scores atribuídos antes do tratamento e por essa diferença foi determinada o grau de limpeza obtido.

Fonte: Autor

Figura 5. Imagens representativas dos escores de remoção de detritos: (1) Sulco vazio; (2) Menos de 50% do sulco preenchido com detritos; (3) Mais de 50% do sulco preenchido com detritos e (4) Sulco totalmente preenchido com detritos.

Fonte: Autor

Figura 6. A análise da remoção da smear layer foi feita atribuindo os seguintes scores: 1- 90-100% dos túbulos dentinários visíveis; 2- 50-90% dos túbulos dentinários visíveis; 3- 10-50% dos túbulos dentinários visíveis; 4 – 0-10% dos túbulos dentinários visíveis.

4.4.2 Biofilme *in situ* – Dissolução e ação antimicrobiana - Confocal

Após a formação do Biofilme, sete discos de dentina por grupo foram selecionados para a análise em confocal sendo que um disco de dentina foi escolhido aleatoriamente e levado ao microscópio de varredura Personal SEM© (PSEM) eXpress™ (Aspex corporation), para captura da imagem do biofilme a fim de

confirmar a completa colonização do espécime. Sendo confirmada a formação do biofilme os discos foram reposicionados nos dentes de onde foram tirados a interface selada com cera utilidade e os dentes levados novamente a mufla. Os protocolos de irrigação foram realizados em cada grupo conforme descritos anteriormente.

Após a aplicação dos irrigantes, os discos de dentina foram removidos das respectivas raízes e lavados com 100 µL de PBS para eliminar resíduos e foram corados com 50 µl de uma solução de Syto 9/Iodeto de propídio (Live/Deadtechnique-In Vitro Gen), durante 10 minutos. O Syto9 é um corante fluorescente (verde) seletivo do ácido nucléico, indicado para corar células vivas e mortas (corante geral). Já o iodeto de propídio visa identificar a população microbiana com membrana celular afetada ou células mortas, apresenta fluorescência vermelha. Ao entrar nas células, a fluorescência vermelha diminui a fluorescência do Syto-9, deixando as células mortas uma fluorescência vermelha ou amarelada.

As amostras após a coloração foram avaliadas no Microscópio Confocal de Varredura a Laser (Leica, Mannheim, Alemanha) utilizando um aumento de 10x para obter uma visão panorâmica.

No biofilme avaliado foram eleitos 5 pontos, nos quais foram captadas imagens, com aumento de 40x. Essas imagens foram feitas com intervalos de 1µm desde a parte mais superior do biofilme até a superfície dentinária.

As imagens obtidas (arquivos com extensão.lif) foram analisadas no software bioImage_L : Image Analysis. Software esse que foi desenvolvido para estudos de biofilmes microbianos. E foram avaliados o biovolume total e a porcentagem de células vivas e mortas no biofilme.

4.4.3 Biofilme *in situ* – Dissolução - MEV

Após a colonização pelo biofilme *in situ* seis discos foram levados ao microscópio eletrônico de varredura Personal SEM© (PSEM) eXpress™ (Aspex corporation), para captura da imagem do biofilme a fim de confirmar a completa colonização do espécime. Sendo confirmada a formação do biofilme os espécimes foram tratados de acordo com os protocolos de cada grupo da mesma forma que os discos que foram utilizados para a análise em microscopia confocal.

Após o tratamento os mesmos espécimes foram novamente levados ao MEV e as imagens capturadas no mesmo ponto da anterior a fim de comparar a limpeza pré e pós-tratamento em cada campo.

A análise da dissolução foi feita atribuindo os seguintes scores: 1- 90-100% dos túbulos dentinários visíveis; 2- 50-90% dos túbulos dentinários visíveis; 3- 10-50% dos túbulos dentinários visíveis; 4 – 0-10% dos túbulos dentinários visíveis. Conforme visualizado na figura 6.

A partir da diferença dos scores atribuídos foi calculado o grau de limpeza variando de zero a três, onde zero seria um menor grau de limpeza enquanto 3 seria um maior grau de limpeza.

4.4 Análise estatística

A análise estatística foi realizada com os testes Kruskal-Wallis e Dunn's não paramétricos, pois os dados não apresentaram distribuição normal ($p < 0,05$). O Prisma 5.0 (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA) foi utilizado como o software analítico.

5 Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Remoção de Smear Layer e Debris

Na comparação entre as soluções independente do ultrassom para a remoção de smear layer o QMix apresentou os melhores resultados se diferenciando estatisticamente dos demais grupos com exceção do EDTA, entretanto para a remoção de debris não houve diferença entre as soluções.

Quando se comparou o uso do ultrassom independente das soluções este apresentou uma remoção de debris superior aos grupos onde as soluções não receberam o PUI ($P < 0.05$).

Na comparação entre os grupos não foram encontradas diferenças estatisticamente significante ($P < 0.05$) para a remoção de smear layer entre os terços analisados. Enquanto que para a ranhura houve uma diferença estatisticamente significativa ($P < 0.05$) entre os grupos que utilizaram PUI e os demais grupos. Os resultados estão descritos da tabela 1.

Tabela 1 – Mediana do grau de limpeza, valores mínimo e máximo da diferença entre os scores inicial e final de smear layer nos terços (apical, cervical e médio) e na ranhura após os protocolos de tratamento.

Grupos	Apical	Médio	Cervical	Ranhura
S. Salina	0,0 (0-2) ^a	0,0 (0-1) ^{a,c}	0,0 (0-1) ^a	0,5 (0-3) ^a
NaOCl	0,5 (0-2) ^a	0,5 (0-2) ^{a,c,d}	0,0 (0-1) ^a	2 (0-3) ^a
EDTA	3 (0-3) ^{b,c}	3,0 (0-3) ^{b,d}	3,0 (0-3) ^{b,c}	1,5 (0,3) ^a
QMix	3 (2-3) ^{b,c}	3,0 (1-3) ^b	3,0 (2-3) ^b	2,5 (1-3) ^a
Ac. Peracético	2 (0-3) ^{a,c}	1,0 (0-3) ^{a,b,d}	1,0 (0-2) ^{a,c}	1 (0-2) ^a
S. Salina PUI	0 (0-1) ^a	0,0 (0-0) ^c	0,0 (0-0) ^a	3 (2-3) ^b
NaOCl PUI	1 (0-2) ^a	1,0 (0-2) ^{a,d}	1,5 (0-2) ^a	3 (2-3) ^b
EDTA PUI	2(2-3) ^{b,c}	3,0 (2-3) ^{b,d}	3,0 (2-3) ^b	3 (2-3) ^b
QMix PUI	3(2-3) ^{b,c}	3,0 (2-3) ^b	3,0 (3-3) ^b	3 (2-3) ^b
Ac. Peracético PUI	2(2-3) ^{a,c}	2,0 (0-3) ^{a,b,d}	2,0 (2-3) ^b	3 (2-3) ^b

Diferentes letras indicam diferenças estatisticamente significante entre os grupos ($P < 0.05$).

5.2 Dissolução e viabilidade do biofilme *in situ*

5.2.1 Análise em Confocal

Para a comparação entre as soluções utilizadas nos protocolos, independente do PUI, a solução salina foi a que apresentou o maior biovolume e viabilidade se diferenciando estatisticamente ($P < 0.05$) dos que mais grupos. Dentre as demais soluções o Qmix foi a que apresentou o menor biovolume se diferenciando do EDTA e do NaOCl ($P < 0.05$). O PAA apresentou um menor biovolume quando comparado ao NaOCl ($P < 0.05$). Foi observado um menor biovolume e viabilidade ($P < 0.05$) quando foi comparado o efeito do PUI independente das soluções.

Na comparação entre os grupos, com relação à viabilidade, o QMix PUI apresentou os menores valores, e todas os demais grupos reduziram significativamente a viabilidade do biofilme com relação aos grupos de solução salina ($P < 0.05$) com ou sem PUI. Os resultados dessa comparação estão descritos da tabela 2.

5.2.2 Análise em MEV

Nas comparações entre os protocolos, independente do PUI, para a dissolução do biofilme, o QMix e o PAA mostrou uma maior dissolução diferenciando-se estatisticamente ($P < 0.05$) dos demais protocolos. Quando se comparou a dissolução em função da agitação ultrassônica independente dos irrigantes a agitação favoreceu uma maior dissolução e remoção do biofilme aderido ($P < 0.05$).

Na comparação entre os grupos, todos os grupos de diferenciaram estatisticamente ($P < 0.05$) da solução salina agitada com ou sem PUI. O QMix PUI e o PAA/PUI mostraram os melhores resultados se diferenciando estatisticamente ($P < 0.05$) dos demais grupos com exceção do EDTA PUI. Os resultados dessa comparação estão descritos da tabela 2.

Tabela 2 – Mediana, valores mínimo e máximo do biovolume e porcentagem de verde, do biovolume e do grau de limpeza, obtidos após os tratamentos do biofilme produzido *in situ*.

	Biovolume total μm^3	Verde (%)	Grau de limpeza
Sol. Salina	75200 (23541-260493) ^a	87,95 (62,89-99,48) ^a	0 (0-1) ^a
Sol. Salina PUI	13350 (3593-56801) ^{a,b}	87,41 (36,18-97,61) ^a	0(0-2) ^a
NaOCI	1242(253-29276) ^b	5,16 (0-36,53) ^b	2 (1-3) ^b
NaOCI PUI	273,5 (0-1330) ^{c,d}	0,50 (0-4,48) ^{c,d}	3(2-3) ^b
EDTA	2743(425-31756) ^{b,e}	5,37 (1,28-36,47) ^b	3(2-3) ^b
EDTA PUI	105,5 (0-3314) ^c	0,64 (0-7,01) ^{c,d}	0(0-2) ^a
QMix	1090 (0-12194) ^{d,e}	1,91 (0-12,76) ^{b,c,d}	2(1-3) ^b
QMix PUI	0 (0-154) ^c	0,0 (0-3,59) ^d	3(2-3) ^b
Ac. Peracético	728(256-4851) ^{b,e}	2,38 (0-10,08) ^{b,c}	3(2-3) ^c
Ac. Peracético PUI	7 (0-134) ^c	0,06 (0-3,1) ^{c,d}	3(2-3) ^c

Diferentes letras indicam diferença estatisticamente significante entre os grupos (P<0.05).

Fonte: Autor

Figura 7. Figura representativa das imagens obtidas após a realização dos protocolos de irrigação em microscopia confocal de varredura a laser. 40x

Fonte: Autor

Figura 8. Figura representativa das avaliações em MEV G1.

Fonte: Autor

Figura 9. Figura representativa das avaliações em MEV G2.

Fonte: Autor

Figura 10. Figura representativa das avaliações em MEV G3.

Fonte: Autor

Figura 11. Figura representativa das avaliações em MEV G4.

Fonte: Autor

Figura 12. Figura representativa das avaliações em MEV G5.

Fonte: Autor

Imagem 13. Figura representativa das avaliações em MEV G6.

Fonte: Autor

Figura 14. Figura representativa das avaliações em MEV G7.

Fonte: Autor

Figura 15. Figura representativa das avaliações em MEV G8.

Fonte: Autor

Figura 16. Figura representativa das avaliações em MEV G9.

Fonte: Autor

Figura 17. Figura representativa das avaliações em MEV G10.

6 Discussão

6 DISCUSSÃO

No presente estudo foi avaliada a limpeza do canal radicular em função de diferentes protocolos de irrigação. Para se avaliar a limpeza foi avaliada a capacidade de remoção de smear layer, debris dentinários, de dissolução de biofilme e ação antimicrobiana. Na literatura há vários estudos estudando cada um desses fatores e irrigantes isolados, entretanto existem poucos relatos sobre o efeito de protocolos de irrigação sobre todos esses fatores relacionados à qualidade de limpeza do canal radicular.

Dentes bovinos foram utilizados no estudo com base em estudos anteriores que têm utilizado tanto para estudos em microbiologia (GRÜNDLING et al., 2011) quanto para estudos na remoção de debris (VAN DER SLUIS et al., 2005) e smear layer (CASTAGNA et al., 2013). Os dentes bovinos são uma alternativa a falta de dentes humanos para a demanda amostral dos estudos e as características da dentina se assemelha muito a dentina humana (ORSTAVIK; HAAPASALO, 1990; SCHILKE et al., 1999), justificando-se então o uso dos dentes bovinos neste estudo.

Com novos métodos de técnicas de instrumentação a modelagem dos canais radiculares é realizada em pouco tempo (BÜRKLEIN et al., 2012; BÜRKLEIN; SCHÄFER, 2012) e permite pouco tempo de permanência das soluções irrigadoras no canal. Uma vez que o tempo de contato é importante para a efetividade das soluções irrigadoras torna-se importante se estabelecer um protocolo eficiente de irrigação a fim de se propiciar uma limpeza eficiente do sistema de canais radiculares.

Os irrigantes tornam-se importantes uma vez que os instrumentos não tocam todas as paredes do canal durante a modelagem do sistema de canais radiculares e há regiões de complexidade anatômica onde é impossível o alcance pela instrumentação (RICUCCI; SIQUEIRA, 2010; ARNOLD et al., 2013). Além disso, a instrumentação dos canais radiculares produz smear layer e debris dentinários (HAAPASALO et al., 2010; VIOLICH; CHANDLER, 2010; RIBEIRO et al., 2012). A smear layer fica aderida as paredes dos canais radiculares obliterando os túbulos dentinários e pode impedir a penetração de irrigantes sem poder quelante, medicação intracanal e proporcionar falhas na adaptação de materiais obturadores (PASHLEY et al., 1986; VIOLICH; CHANDLER, 2010; SISODIA et al., 2014).

Dentre os métodos utilizados a fim de remover a smear layer e debris está o emprego de métodos químicos e físicos (VIOLICH; CHANDLER, 2010) a fim de removê-los de áreas de complexidades anatômicas (CAPAR; ARI AYDINBELGE, 2014). O EDTA é a substância mais utilizada na endodontia a fim de remover a smear layer, entretanto possui baixo potencial antimicrobiano (KAUSHIK et al., 2013) e de dissolução de matéria orgânica (BALLAL et al., 2011).

Há uma busca por um irrigante que proporcione a dissolução de matéria orgânica, capacidade antimicrobiana e de remoção de smear layer. Na literatura há trabalhos que sinalizam para o QMix e o PAA como irrigantes finais mais completos, uma vez que apresentam ação antimicrobiana (GUERREIRO-TANOMARU et al, 2011; WANG et al, 2012; STOJICIC et al, 2012; MORGENTAL et al, 2013; WANG et al, 2013; ORDINOLA-ZAPATA et al, 2013; CORD et al, 2014).

A fim de se sanar dúvidas a respeito da real importância de cada substância durante a irrigação foram determinados os grupos do estudo. Foi instituído como controle do estudo um grupo com solução salina considerando que essa substância não possui capacidade de dissolução (BALLAL et al, 2011) e não possui ação quelante (BAUMGARTNER et al, 1984).

Para avaliar a capacidade de remoção de debris e smear layer foi realizado um desenho experimental com base nos estudos de Van der Sluis (VAN DER SLUIS et al, 2005; VAN DER SLUIS et al, 2010). A variação metodológica desse estudo se constituiu na avaliação do mesmo campo antes e após o tratamento, possibilitando a padronização das imagens adquiridas em um microscópio de baixo vácuo, o que permitiu visualizar as amostras após o preenchimento das ranhuras, a criação da smear layer e a formação do biofilme e após os protocolos de tratamento a serem realizados.

Essa metodologia proporcionou um parâmetro de comparação pela mesma amostra e local de captura da imagem, e para que se pudesse realizar essa comparação foi determinada que o resultado final de limpeza fosse à diferença entre os scores iniciais e os finais.

O PUI foi realizado em três vezes de 20 segundos totalizando-se 1 minuto de agitação ultrassônica. Esse protocolo foi realizado de acordo com o descrito por Van der Sluis et al. (2010), que mostra que essa combinação promove um efeito cumulativo e é eficiente para a remoção de debris do terço apical. A direção da agitação é um fator determinante para o sucesso do procedimento, portanto foi

definida que a agitação seria feita no sentido da ranhura (JIANG et al., 2010; MARTINS JUSTO et al., 2014). E a direção da agitação foi determinada baseando-se no estudo de Jiang et al (2010) que mostraram que a eficiência depende do sentido da oscilação do instrumento no canal radicular. E assim sendo quando não há a padronização do sentido, os resultados podem não ser fidedignos.

Uma quantidade de irrigante a ser utilizado foi definida a fim de se evitar interferências do volume de irrigação nos parâmetros avaliados. Nos grupos onde foi realizada PUI a cada período de 20 segundos a solução foi trocada e nos grupos onde não foi realizada PUI foram realizadas 3 trocas de solução a fim de se eliminar a influência física e química da irrigação convencional na comparação entre os grupos.

A Microscopia eletrônica de varredura foi empregada para a captura das imagens uma vez que possibilita a visualização da limpeza dos canais radiculares tanto para a remoção de debris quanto para a remoção da smear layer (RIBEIRO et al., 2012; CASTANGNA et al., 2013; MARTINS JUSTO et al., 2014). Nesse estudo foi utilizada a magnificação de 30 vezes para a ranhura e de 500 vezes para o estudo da remoção de smear layer uma vez que aumentos maiores podem gerar viés nos resultados e apenas uma pequena parte do canal é observada (MARTINS JUSTO et al., 2014).

Para a avaliação da remoção de debris e smear layer foram utilizados critérios quantitativos baseados em scores (1- 90-100% dos túbulos dentinários visíveis; 2- 50-90% dos túbulos dentinários visíveis; 3- 10-50% dos túbulos dentinários visíveis; 4 – 0-10% dos túbulos dentinários visíveis) adaptando de metodologias de outros trabalhos (CASTANGNA et al., 2013; PROTOGEROU et al., 2013; MARTINS JUSTO et al., 2014). E fator pode ser preponderante para diminuir a concordância intraexaminadores. Nesse estudo pelo teste Kappa foi encontrada uma boa concordância o que mostrou uma boa calibração, qualidade das imagens e resultados fidedignos.

Os resultados relativos à remoção de debris dentinários mostrou que não houve influência das soluções utilizadas, deixando claro que o QMix, o EDTA e até mesmo o PAA quando utilizados na irrigação convencional não atinge esse objetivo. Os resultados concordam com os de Dai et al. (2011) que mostra a fraca capacidade do QMix e do EDTA de remover debris. A remoção de debris parece estar mais ligada a ação física do ultrassom do que química das soluções. A dilatação apical

padronizada em 50 neste estudo obteve resultados de limpeza semelhantes ao de Rödíg et al. (2010), mostrando que esse diâmetro de dilatação apical propicia uma boa limpeza das complexidades anatômicas na região apical. Outro fator a ser discutido é o efeito cumulativo do PUI uma vez que quando foi utilizado mais de uma vez mostrou um maior grau de limpeza das ranhuras (VAN DER SLUIS et al., 2010).

Um fator que pode ser observado sistematicamente nas ranhuras onde a irrigação foi realizada com quelantes após o uso do hipoclorito e associados ao ultrassom foi uma grande quantidade de túbulos dentinários expostos. Mostrando que apesar da possibilidade da remoção dos debris apenas com a agitação ultrassônica a associação de quelantes a essa agitação promove uma limpeza de melhor qualidade, propiciando que o agente quelante agisse nas paredes sobre as quais estavam os debris. São necessários mais estudos para esclarecer esse fato.

Além disso, a utilização da PUI mostrou que possibilita um melhor desempenho dos agentes irrigantes sobre os biofilmes, potencializando a sua ação e tornando o protocolo mais efetivo. A ação do PUI em reação a remoção de debris também foi constatada em outros estudos que viram uma melhor eficácia quando do uso do PUI em relação a protocolos convencionais (De Moor et al. (2009) JIANG et al., 2010; CASTAGNA et al., 2013; MARTINS-JUSTO et al., 2014) e que outros protocolos como o uso do Rinsendo (RÖDIG et al., 2010). Entretanto há autores que afirma uma melhor efetividade da ativação a laser da solução irrigadora é mais eficiente que o PUI, entretanto ambos os protocolos são eficazes (DE MOOR et al. 2009; DE MOOR et al., 2010).

Com relação à remoção de smear layer na comparação das soluções independente do uso do ultrassom o QMix apresentou os melhores resultados se diferenciando estatisticamente dos demais grupos com exceção do EDTA. Com relação ao Qmix esses resultados vão de acordo com os estudos de Dai et al. (2011) e Aranda-Garcia AJ et al. (2013) que mostram uma ação sobre a smear layer próxima a obtida pelo EDTA. Com relação a ação do PAA este estudo contradiz os de Lottanti et al. (2009) e De-Deus, et al. (2011) que mostram uma ação desse ácido semelhante a do EDTA sobre smear layer. A ação do PUI não foi significativa para a remoção da smear layer, mostrando que a ativação da solução não é aumenta a efetividade da solução tendo resultados semelhantes aos de Akyuz Ekim, Erdemir (2015), entretanto alguns autores afirmam que o PUI melhora a remoção da smear layer (GOEL, TEWARI, 2009). Em uma comparação global para a remoção de

Smear layer e debris os melhores resultados são atribuídos aos grupos onde se associaram o QMix ou o EDTA 17% ao PUI.

Para avaliação da dissolução e viabilidade do biofilme *in situ* após o tratamento pelos mesmos protocolos foram utilizadas duas microscopias a fim de visualizar a dissolução volumétrica pela microscopia confocal e por scores no MEV, tendo a possibilidade de avaliação pré e pós-tratamento de biofilme em MEV.

O protocolo de formação do biofilme foi realizado de acordo com metodologias descritas na literatura (DEL CARPIO-PEROCHENA et al., 2011; ORDINOLA-ZAPATA et al., 2012; ORDINOLA-ZAPATA et al., 2013) e uma vez que o biofilme *in situ* tem a possibilidade de chegar a um biovolume médio maior do que o biofilme monoespécie, proporcionando um maior desafio a dissolução. As amostras receberam o mesmo protocolo de irrigação a fim de que se estabelecesse um parâmetro fiel de comparação entre as propriedades de limpezas exigidas.

Para a comparação entre as soluções utilizadas nos protocolos independentes do PUI a solução salina foi a que apresentou o maior biovolume e viabilidade se diferenciando estatisticamente ($P < 0.05$) dos que mais grupos. Mostrando que o hipoclorito de sódio apresenta um bom poder de dissolução, levando a uma dissolução considerável em relação a solução fisiológica.

Os grupos onde se utilizou QMix e Ác peracético apresentaram um menor biovolume, quando comparados ao NaOCl associado ao EDTA ou solução salina como irrigantes finais. Mostrando que essas substâncias possuem um bom poder de limpeza na irrigação final. Apesar de o ácido peracético ter um poder de dissolução comprovado do biofilme (ORDINOLA-ZAPATA et al., 2013) o Qmix não se mostrou tão eficaz em biofilmes multiespécies quando utilizado sozinho (ORDINOLA-ZAPATA et al., 2013). Entretanto nesse estudo podemos ver esse irrigante sendo eficaz na irrigação final após o uso do hipoclorito de sódio para remover o biofilme e com uma excelente ação antimicrobiana. O EDTA comportou-se da mesma maneira que em outros estudos que avaliaram a sua ação antimicrobiana sobre biofilmes bacterianos (ORDINOLA-ZAPATA et al. 2012)

Quando se fez a avaliação em MEV os resultados para as soluções, independente do PUI mostram resultados concordantes com os encontrados na microscopia confocal, mostrando que o QMix e o PAA proporcionaram uma maior dissolução do biofilme, entretanto a maior dissolução do biofilme se deve a associação com o hipoclorito de sódio e a ação desses irrigantes finais se mostrou

mais eficiente que o EDTA quando associados ao NaOCl. Com relação ao NaOCl e o PAA os resultados vão de encontro com o mostrado por Ordinola-Zapata et al. (2013), que mostrou uma fraca ação do QMix. Entretanto há trabalhos que mostram uma boa capacidade antimicrobiana do Qmix e poder de dissolução do biofilme, porém menor que o do NaOCl (STOJICIC et al., 2012; WANG et al., 2012; GUERREIRO-TANOMARU et al., 2014).

O PUI teve um papel significativo na melhora da ação das soluções irrigadoras sobre o biofilme, mostrando que a ação mecânica é um fator importante na remoção do biofilme, uma vez que se pode observar uma redução do biovolume mesmo quando do uso da solução salina. O mesmo foi observado em todos os grupos quando se utilizou o PUI, esses resultados obtidos corroboram com outros estudos que compararam o PUI a irrigação convencional (BHUVA et al., 2010; BHARDWAJ et al., 2013), entretando não é capaz de eliminar completamente a contaminação, bem como as demais técnicas alternativas (PAIVA et al., 2012; ORDINOLA-ZAPATA et al., 2014; MUHAMMAD, 2014; NIAZI et al. 2014).

Nenhuma substância ou método por si só é eficiente para atingir os objetivos da irrigação, entretanto a associação de substâncias e métodos propicia uma melhor qualidade da irrigação. Neste estudo o uso de um protocolo associando o NaOCl, QMix e PUI apresentou os melhores resultados para a remoção de smear layer, debris, biofilme e ação antimicrobiana, suprimindo o déficit das substâncias e do método quando utilizados isoladamente.

Por esse estudo podemos visualizar uma nova metodologia de análise de limpeza em MEV, mostrando que uma avaliação pré e pós no mesmo ponto da amostra podem ser realizadas, reduzindo o viés do estudo.

7 Conclusões

7 CONCLUSÕES

Os protocolos que utilizaram NaOCl seguido de QMix ou EDTA mostraram uma melhor capacidade de remoção de Smear Layer.

Para a remoção de debris das ranhuras simuladas todos os protocolos associados ao PUI demonstraram maior efetividade.

Os protocolos que utilizaram NaOCl seguido de QMix ou Ácido peracético mostraram uma melhor capacidade de dissolução de biofilme e ação antimicrobiana.

Todos os protocolos associados ao PUI tiveram sua efetividade melhorada quando comparados aos protocolos sem PUI.

Referências

REFERÊNCIAS

- Abbott PV, Heijkoop PS, Cardaci SC, Hume WR, Heithersay GS. An SEM study of the effects of different irrigation sequences and ultrasonics. *Int Endod J*. 1991;24:308–16.
- Ahir B, Parekh V, Katyayan MK, Katyayan PA. Smear layer removal efficacy of different irrigating solutions: a comparative scanning electron microscope evaluation. *Indian J Dent Res*. 2014 Sep-Oct;25(5):617-22.
- Ahmad M, Pitt Ford TJ, Crum LA. Ultrasonic debridement of root canals: acoustic streaming and its possible role. *J Endod* 1987;13:490–9.
- Ahmetoglu F, Keles A, Yalcin M, Simsek N. Effectiveness of different irrigation systems on smear layer removal: A scanning electron microscopic study. *Eur J Dent*. 2014 Jan;8(1):53-7.
- Akyuz Ekim SN, Erdemir A. Comparison of different irrigation activation techniques on smear layer removal: an in vitro study. *Microsc Res Tech*. 2015 Mar;78(3):230-9.
- Alves FR, Neves MA, Silva MG, Rôças IN, Siqueira JF Jr. Antibiofilm and antibacterial activities of farnesol and xylitol as potential endodontic irrigants. *Braz Dent J*. 2013;24(3):224-9.
- Andrabi SM, Kumar A, Kumar Tewari R, Kumar Mishra S, Iftexhar H. An In Vitro SEM Study on the Effectiveness of Smear Layer Removal of Four Different Irrigations. *Iran Endod J*. 2012 Fall;7(4):171-6.
- Aranda-Garcia AJ, Kuga MC, Vitorino KR, Chávez-Andrade GM, Duarte MA, Bonetti-Filho I, Faria G, Só MV. Effect of the root canal final rinse protocols on the debris and smear layer removal and on the push-out strength of an epoxy-based sealer. *Microsc Res Tech*. 2013 May;76(5):533-7.
- Arnold M, Ricucci D, Siqueira JF Jr. Infection in a complex network of apical ramifications as the cause of persistent apical periodontitis: a case report. *J Endod*. 2013 Sep;39(9):1179-84.

Ates M, Akdeniz BG, Sen BH. The effect of calcium chelating or binding agents on *Candida albicans*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2005 Nov;100(5):626-30.

Bago Jurič I, Plečko V, Anić I. Antimicrobial efficacy of Er,Cr:YSGG laser-activated irrigation compared with passive ultrasonic irrigation and RinsEndo(®) against intracanal *Enterococcus faecalis*. Photomed Laser Surg. 2014 Nov;32(11):600-5.

Baker NA, Eleazer PD, Averbach RE, Seltzer S. Scanning electron microscopic study of the efficacy of various irrigating solutions. J Endod. 1975;1(4):127-35.

Ballal NV, Mala K, Bhat KS. Effect of maleic acid and ethylenediaminetetraacetic acid on the dissolution of human pulp tissue--an in vitro study. Int Endod J. 2011 Apr;44(4):353-6.

Balto H, Ghandourah B, Al-Sulaiman H. The efficacy of *Salvadora persica* extract in the elimination of the intracanal smear layer: A SEM study. Saudi Dent J. 2012 Apr;24(2):71-7.

Barnhart BD, Chuang A, Lucca JJ, Roberts S, Liewehr F, Joyce AP. An in vitro evaluation of the cytotoxicity of various endodontic irrigants on human gingival fibroblasts. J Endod. 2005;31(8):613-5.

Başer Can ED, Karapınar Kazandağ M, Kaptan RF. Inadvertent apical extrusion of sodium hypochlorite with evaluation by dental volumetric tomography. Case Rep Dent. 2015;2015:247547.

Bhardwaj A, Velmurugan N, Sumitha, Ballal S. Efficacy of passive ultrasonic irrigation with natural irrigants (*Morinda citrifolia* juice, Aloe Vera and Propolis) in comparison with 1% sodium hypochlorite for removal of *E. faecalis* biofilm: an in vitro study. Indian J Dent Res. 2013 Jan-Feb;24(1):35-41.

Bhuva B, Patel S, Wilson R, Niazi S, Beighton D, Mannocci F. The effectiveness of passive ultrasonic irrigation on intraradicular *Enterococcus faecalis* biofilms in extracted single-rooted human teeth. Int Endod J. 2010 Mar;43(3):241-50.

Bryce G, O'Donnell D, Ready D, Ng YL, Pratten J, Gulabivala K. Contemporary root canal irrigants are able to disrupt and eradicate single- and dual-species biofilms. *J Endod*. 2009 Sep;35(9):1243-8.

Bürklein S, Hinschitza K, Dammaschke T, Schäfer E. Shaping ability and cleaning effectiveness of two single-file systems in severely curved root canals of extracted teeth: Reciproc and WaveOne versus Mtwo and ProTaper. *Int Endod J*. 2012 May;45(5):449-61.

Bürklein S, Schäfer E. Apically extruded debris with reciprocating single-file and full-sequence rotary instrumentation systems. *J Endod*. 2012 Jun;38(6):850-2.

Candeiro GT, Matos IB, Costa CF, Fonteles CS, Vale MS. A comparative scanning electron microscopy evaluation of smear layer removal with apple vinegar and sodium hypochlorite associated with EDTA. *J Appl Oral Sci*. 2011 Nov-Dec;19(6):639-43.

Capar ID, Ari Aydinbelge H. Effectiveness of various irrigation activation protocols and the self-adjusting file system on smear layer and debris removal. *Scanning*. 2014. [Epub ahead of print]

Castagna F, Rizzon P, da Rosa RA, Santini MF, Barreto MS, Duarte MA, Só MV. Effect of passive ultrasonic instrumentation as a final irrigation protocol on debris and smear layer removal--a SEM analysis. *Microsc Res Tech*. 2013 May;76(5):496-502.

Cehreli ZC, Uyanik MO, Nagas E, Tuncel B, Er N, Comert FD. A comparison of residual smear layer and erosion following different endodontic irrigation protocols tested under clinical and laboratory conditions. *Acta Odontol Scand*. 2013 Sep;71(5):1261-6.

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

Chavez de Paz LE. Redefining the persistent infection in root canals: possible role of biofilm communities. *J Endod* 2007;33(6):652-62.

Ciucchi B, Khettabi M, Holz J. The effectiveness of different endodontic irrigation procedures on the removal of the smear layer: a scanning electron microscopic study. *Int Endod J*. 1989 Jan;22(1):21-8.

Cord CB, Velasco RV, Ribeiro Melo Lima LF, Rocha DG, da Silveira Bueno CE, Pinheiro SL. Effective analysis of the use of peracetic acid after instrumentation of root canals contaminated with *Enterococcus faecalis*. *J Endod*. 2014 Aug;40(8):1145-8.

Dai L, Khechen K, Khan S, Gillen B, Loushine BA, Wimmer CE, Gutmann JL, Pashley D, Tay FR. The effect of QMix, an experimental antibacterial root canal irrigant, on removal of canal wall smear layer and debris. *J Endod*. 2011 Jan;37(1):80-4.

Davis SR, Brayton SM, Goldman M. The morphology of the prepared root canal: a study utilizing injectable silicone. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1972 Oct;34(4):642-8.

De Moor RJ, Blanken J, Meire M, Verdaasdonk R. Laser induced explosive vapor and cavitation resulting in effective irrigation of the root canal. Part 2: evaluation of the efficacy. *Lasers Surg Med*. 2009 Sep;41(7):520-3.

De Moor RJ, Meire M, Goharkhay K, Moritz A, Vanobbergen J. Efficacy of ultrasonic versus laser-activated irrigation to remove artificially placed dentin debris plugs. *J Endod*. 2010 Sep;36(9):1580-3.

De-Deus G, Reis C, Paciornik S. Critical appraisal of published smear layer-removal studies: methodological issues. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2011 Oct;112(4):531-43.

De-Deus G, Souza EM, Marins JR, Reis C, Paciornik S, Zehnder M. Smear layer dissolution by peracetic acid of low concentration. *Int Endod J* 2011; 44: 485-490.

Del Carpio-Perochena A, Bramante CM, Hungaro Duarte MA, de Andrade FB, Cavenago BC, Villas-Bôas MH, Ordinola-Zapata R, Amoroso-Silva P. Application of laser scanning microscopy for the analysis of oral biofilm dissolution by different endodontic irrigants. *Dent Res J (Isfahan)*. 2014 Jul;11(4):442-7.

Del Carpio-Perochena AE, Bramante CM, Duarte MA, Cavenago BC, Villas-Boas MH, Graeff MS, et al. Biofilm dissolution and cleaning ability of different irrigant solutions on intraorally infected dentin. *J Endod* 2011;37(8):1134-8.

Dunavant TR, Regan JD, Glickman GN, Solomon ES, Honeyman AL. Comparative evaluation of endodontic irrigants against *Enterococcus faecalis* biofilms. *J Endod* 2006;32(6):527-31.

Eliot C, Hatton JF, Stewart GP, Hildebolt CF, Jane Gillespie M, Gutmann JL. The effect of the irrigant QMix on removal of canal wall smear layer: an ex vivo study. *Odontology*. 2014 Jul;102(2):232-40.

Estrela C, Estrela CR, Barbin EL, Spano JC, Marchesan MA, Pecora JD. Mechanism of action of sodiumhypochlorite. *BrazDent J* 2002;13(2):113-7. 3.

Ferrer-Luque CM, Conde-Ortiz A, Arias-Moliz MT, Valderrama MJ, Baca P. Residual activity of chelating agents and their combinations with cetrimide on root canals infected with *Enterococcus faecalis*. *J Endod*. 2012 Jun;38(6):826-8.

Figdor D, Sundqvist G. A big role for the very small--understanding the endodontic microbial flora. *Aust Dent J* 2007;52(1 Suppl):S38-51.

Fráter M, Braunitzer G, Urbán E, Bereczki L, Antal M, Nagy K. In vitro efficacy of different irrigating solutions against polymicrobial human root canal bacterial biofilms. *Acta Microbiol Immunol Hung*. 2013 Jun;60(2):187-99.

Garberoglio R, Becce C. Smear layer removal by root canal irrigants. A comparative scanning electron microscopic study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1994 Sep;78(3):359-67.

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*. 2009 Sep;108(3):465-70.

Goldberg F, Abramovich A. Analysis of the effect of EDTAC on the dentinal walls of the root canal. *J Endod*. 1977;3(3):101-5.

Goldman M, Goldman LB, Cavaleri R, Bogis J, Lin PS. The efficacy of several endodontic irrigating solutions: a scanning electron microscopic study: Part 2. J Endod. 1982;8(11):487-92.

Gründling GL, Zechin JG, Jardim WM, de Oliveira SD, de Figueiredo JA. Effect of ultrasonics on *Enterococcus faecalis* biofilm in a bovine tooth model. J Endod. 2011 Aug;37(8):1128-33.

Guerreiro-Tanomaru JM, Morgental RD, Faria-Junior NB, Berbert FL, Tanomaru-Filho M. Antibacterial effectiveness of peracetic acid and conventional endodontic irrigants. Braz Dent J. 2011;22(4):285-7. Chandrasekhar et al, 2013

Guerreiro-Tanomaru JM, Nascimento CA, Faria-Júnior NB, Graeff MS, Watanabe E, Tanomaru-Filho M. Antibiofilm activity of irrigating solutions associated with cetrimide. Confocal laser scanning microscopy. Int Endod J. 2014 Nov;47(11):1058-63.

Haapasalo M, Shen Y, Qian W, Gao Y. Irrigation in endodontics. Dent Clin North Am. 2010 Apr;54(2):291-312.

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

Huffaker SK, Safavi K, Spangberg LS, Kaufman B. Influence of a passive sonic irrigation system on the elimination of bacteria from root canal systems: a clinical study. Journal of endodontics. 2010;36(8):1315-8.

Hülsmann M, Heckendorff M, Lennon A. Chelating agents in root canal treatment: mode of action and indications for their use. Int Endod J. 2003;36(12):810-30.

J.C. Baumgartner, C.M. Brown, C.L. Mader, et al. A scanning electron microscopic evaluation of root canal debridement using saline, sodium hypochlorite, and citric acid. J Endod, 10 (1984), pp. 525–531

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

Takehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The Effects of Surgical Exposures of Dental Pulp in Germ-Free and Conventional Laboratory Rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1965;20:340-9.

Karunakaran JV, Kumar SS, Kumar M, Chandrasekhar S, Namitha D. The effects of various irrigating solutions on intra-radicular dentinal surface: An SEM analysis. *J Pharm Bioallied Sci.* 2012 Aug;4(Suppl 2):S125-30.

Kaushik N, Rehani U, Agarwal A, Kaushik M, Adlakha V. Antimicrobial Efficacy of Endodontic Irrigants against *Enterococcus Faecalis* and *Escherichia Coli*: An in vitro study. *Int J Clin Pediatr Dent* 2013;6(2):178-182.

Kaushik N, Rehani U, Agarwal A, Kaushik M, V. Adlakha Antimicrobial Eficácia da endodônticos Irrigantes contra *Enterococcus faecalis* e *Escherichia Coli* : An in vitro estudo. *Int J Clin Pediatr Dent* 2013, 6 (2): 178-182.

Kim HJ, Park SJ, Park SH, Hwang YC, Yu MK, Min KS. Efficacy of flowable gel-type EDTA at removing the smear layer and inorganic debris under manual dynamic activation. *J Endod.* 2013 Jul;39(7):910-4.

Kirchhoff A L, Viapiana R, Miranda C, Sousa Neto M D, Cruz Filho A M. Comparison of the apple vinegar with other chelating solutions on smear layer and calcium ions removal from the root canal. *Indian J Dent Res* 2014;25:370-4.

Kishen A, Sum CP, Mathew S, Lim CT. Influence of irrigation regimens on the adherence of *Enterococcus faecalis* to root canal dentin. *J Endod.* 2008 julho; 34 (7): 850-4.

Klyn SL, Kirkpatrick TC, Rutledge RE. in vitro comparison of debris removed of the Endoactivator System, the F File, ultrasonic irrigation, and NaOCl irrigation alone after hand rotary instrumentation in human mandibular molars. *J Endod.* 2010;36:1367–71.

Kvist T, Molander A, Dahlen G, Reit C. Microbiological evaluation of one- and two-visit endodontic treatment of teeth with apical periodontitis: a randomized, clinical trial. *J Endod* 2004;30(8):572-6.

Lima KC, Fava LR, Siqueira JF Jr. Susceptibilities of *Enterococcus faecalis* biofilms to some antimicrobial medications. *J Endod*. 2001 Oct;27(10):616-9.

Lottanti S, Gautschi H, Sener B, Zehnder M. Effects of ethylenediaminetetraacetic, etidronic and peracetic acid irrigation on human root dentine and the smear layer. *Int Endod J*. 2009;42:335–43.

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

Markvart M, Darvann TA, Larsen P, Dalstra M, Kreiborg S, Bjørndal L. Micro-CT analyses of apical enlargement and molar root canal complexity. *Int Endod J*. 2012 Mar;45(3):273-81.

Martins Justo A, Abreu da Rosa R, Santini MF, Cardoso Ferreira MB, Pereira JR, Húngaro Duarte MA, Reis Só MV. Effectiveness of final irrigant protocols for debris removal from simulated canal irregularities. *J Endod*. 2014 Dec;40(12):2009-14.

McComb D, Smith DC. A preliminary scanning electron microscopic study of root canals after endodontic procedures. *J Endod*. 1975;1(7):238-42.

McDonnell G, Russell AD Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clinical Microbiology Reviews* 1999;12:147–79.

Moller AJ, Fabricius L, Dahlen G, Ohman AE, Heyden G. Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. *Scand J Dent Res* 1981;89(6):475-84.

Morgental RD, Singh A, Sappal H, Kopper PM, Vier-Pelisser FV, Peters OA. Dentin inhibits the antibacterial effect of new and conventional endodontic irrigants. *J Endod*. 2013 Mar;39(3):406-10.

Morgental RD, Singh A, Sappal H, Kopper PM, Vier-Pelisser FV, Peters OA. Dentin inhibits the antibacterial effect of new and conventional endodontic irrigants. *J Endod*. 2013 Mar;39(3):406-10.

Mozo S, Llena C, Chieffi N, Forner L, Ferrari M. Effectiveness of passive ultrasonic irrigation in improving elimination of smear layer and opening dentinal tubules. *J Clin Exp Dent*. 2014 Feb 1;6(1):e47-52.

Muhammad OH, Chevalier M, Rocca JP, Brulat-Bouchard N, Medioni E. Photodynamic therapy versus ultrasonic irrigation: interaction with endodontic microbial biofilm, an ex vivo study. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2014 Jun;11(2):171-81.

Munley PJ, Goodell GG. Comparison of passive ultrasonic debridement between fluted and nonfluted instruments in root canals. *J Endod*. 2007;33:578–80.

Nair PN, Henry S, Cano V, Vera J. Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after "one-visit" endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2005;99(2):231-52.

Niazi SA, Clark D, Do T, Gilbert SC, Foschi F, Mannocci F, Beighton D. The effectiveness of enzymic irrigation in removing a nutrient-stressed endodontic multispecies biofilm. *Int Endod J*. 2014 Aug;47(8):756-68.

Niu LN, Luo XJ, Li GH, Bortoluzzi EA, Mao J, Chen JH, Gutmann JL, Pashley DH, Tay FR. Effects of different sonic activation protocols on debridement efficacy in teeth with single-rooted canals. *J Dent*. 2014 Aug;42(8):1001-9.

Ordinola-Zapata R, Bramante CM, Aprecio RM, Handysides R, Jaramillo DE. Biofilm removal by 6% sodium hypochlorite activated by different irrigation techniques. *Int Endod J*. 2014 Jul;47(7):659-66.

Ordinola-Zapata R, Bramante CM, Cavenago B, Graeff MS, Gomes de Moraes I, Marciano M, Duarte MA. Antimicrobial effect of endodontic solutions used as final irrigants on a dentine biofilm model. *Int Endod J*. 2012 Feb;45(2):162-8.

Ordinola-Zapata R, Bramante CM, Garcia RB, de Andrade FB, Bernardineli N, de Moraes IG, Duarte MA. The antimicrobial effect of new and conventional endodontic irrigants on intra-orally infected dentin. *Acta Odontol Scand*. 2013 May-Jul;71(3-4):424-31.

Orstavik D, Haapasalo M. Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. *Endod Dent Traumatol*. 1990 Aug;6(4):142-9.

Østby NB. Chelation in root canal therapy. *Odontologisk Tidskrift*. 1957;65(2):3-11.

Paiva JG, Antoniazzi JH. *Endodontia: bases para a prática clínica*. 2. ed. São Paulo: Artes Médicas, 1988

Paiva SS, Siqueira JF Jr, Rôças IN, Carmo FL, Ferreira DC, Curvelo JA, Soares RM, Rosado AS. Supplementing the antimicrobial effects of chemomechanical debridement with either passive ultrasonic irrigation or a final rinse with chlorhexidine: a clinical study. *J Endod*. 2012 Sep;38(9):1202-6.

Pascon FM, Kantovitz KR, Sacramento PA, Nobre-dos-Santos M, Puppim-Rontani RM. Effect of sodium hypochlorite on dentine mechanical properties. A review. *J Dent* 2009;37(12):903-8.

Pashley DH, Kalathoor S, Burnham D. 1986. The effects of calcium hydroxide on dentin permeability. *J Dent Res* 65:417–420.

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

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

Protogerou E, Arvaniti I, Vlachos I, Khabbaz MG. Effectiveness of a canal brush on removing smear layer: a scanning electron microscopic study. *Braz Dent J*. 2013 Nov-Dec;24(6):580-4.

Qing Y, Akita Y, Kawano S, Kawazu S, Yoshida T, Sekine I. Cleaning efficacy and dentin micro-hardness after root canal irrigation with a strong acid electrolytic water. *J Endod* 2006;32(11):1102-6.

Rahimi S, Shahi S, Gholizadeh S, Shakouie S, Rikhtegaran S, Soroush Barhaghi MH, Ghojazadeh M, Froughreyhani M, Abdolrahimi M. Bactericidal effects of Nd:YAG

laser irradiation and sodium hypochlorite solution on *Enterococcus faecalis* biofilm. *Photomed Laser Surg*. 2012 Nov;30(11):637-41.

Ribeiro EM, Silva-Sousa YT, Souza-Gabriel AE, Sousa-Neto MD, Lorencetti KT, Silva SR. Debris and smear removal in flattened root canals after use of different irrigant agitation protocols. *Microsc Res Tech*. 2012 Jun;75(6):781-90.

Ricucci D, Siqueira JF Jr. Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. *J Endod*. 2010 Aug;36(8):1277-88.

Rödig T, Sedghi M, Konietschke F, Lange K, Ziebolz D, Hülsmann M. Efficacy of syringe irrigation, RinsEndo and passive ultrasonic irrigation in removing debris from irregularities in root canals with different apical sizes. *Int Endod J*. 2010 Jul;43(7):581-9.

Saber Sel-D, Hashem AA. Efficacy of different final irrigation activation techniques on smear layer removal. *J Endod*. 2011 Sep;37(9):1272-5.

Sabins RA, Johnson JD, Hellstein JW. A comparison of the cleaning efficacy of shorttermsonic and ultrasonic passive irrigation after hand instrumentation in molar root canals. *J Endod* 2003;29:674–8.

Sahar-Helft S, Sarp AS, Stabholtz A, Gutkin V, Redenski I, Steinberg D. Comparison of positive-pressure, passive ultrasonic, and laser-activated irrigations on smear-layer removal from the root canal surface. *Photomed Laser Surg*. 2015 Mar;33(3):129-35.

Sahar-Helft S, Stabholtz A, Moshonov J, Gutkin V, Redenski I, Steinberg D. Effect of Er:YAG laser-activated irrigation solution on *Enterococcus Faecalis* biofilm in an ex-vivo root canal model. *Photomed Laser Surg*. 2013 Jul;31(7):334-41.

Scelza MF, Pierro V, Scelza P, Pereira M. Effect of three different time periods of irrigation with EDTA-T, EDTA, and citric acid on smear layer removal. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2004;98(4):499-503.

Scelza MF, Teixeira AM, Scelza P. Decalcifying effect of EDTA-T, 10% citric acid, and 17% EDTA on root canal dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003;95(2):234-6.

Schilke R, Bauss O, Lisson JA, Schuckar M, Geurtsen W. Bovine dentin as a substitute for human dentin in shear bond strength measurements. *Am J Dent.* 1999 Apr;12(2):92-6.

Sen BH, Akdeniz BG, Denizci AA. The effect of ethylenediamine-tetraacetic acid on *Candida albicans*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2000 Nov;90(5):651-5.

Sena NT, Gomes BP, Vianna ME, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ. In vitro antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine against selected single-species biofilms. *Int Endod J.* 2006 Nov;39(11):878-85.

Shen Y, Stojicic S, Haapasalo M. Bacterial viability in starved and revitalized biofilms: comparison of viability staining and direct culture. *J Endod* 2010;36(11):1820-3.

Siqueira JF, Jr., Paiva SS, Rocas IN. Reduction in the cultivable bacterial populations in infected root canals by a chlorhexidine-based antimicrobial protocol. *J Endod* 2007;33(5):541-7.

Sisodia R, Ravi KS, Shashikiran ND, Singla S, Kulkarni V. Bacterial penetration along different root canal fillings in the presence or absence of smear layer in primary teeth. *J Clin Pediatr Dent.* 2014 Spring;38(3):229-34.

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

Soares JN, Goldberg F. *Endodontia - Técnicas e fundamentos*. 2 ed. Artmed: Porto Alegre; 2011.

Spanó JC, Silva RG, Guedes DF, Sousa-Neto MD, Estrela C, Pecora JD. Atomic absorption spectrometry and scanning electron microscopy evaluation of

concentration of calcium ions and smear layer removal with root canal chelators. *J Endod.* 2009;35(5):727-30.

Stojicic S, Shen Y, Qian W, Johnson B, Haapasalo M. Antibacterial and smear layer removal ability of a novel irrigant, QMiX. *Int Endod J.* 2012 Apr;45(4):363-71.

Torabinejad M, Cho Y, Khademi AA, Bakland LK, Shabahang S. The effect of various concentrations of sodium hypochlorite on the ability of MTAD to remove the smear layer. *J Endod.* 2003 Apr;29(4):233-9.

Tyagi SP, Sinha DJ, Garg P, Singh UP, Mishra CC, Nagpal R. Comparison of antimicrobial efficacy of propolis, *Morinda citrifolia*, *Azadirachta indica* (Neem) and 5% sodium hypochlorite on *Candida albicans* biofilm formed on tooth substrate: An in-vitro study. *J Conserv Dent.* 2013 Nov;16(6):532-5.

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

van der Sluis LW, Vogels MP, Verhaagen B, Macedo R, Wesselink PR. Study on the influence of refreshment/activation cycles and irrigants on mechanical cleaning efficiency during ultrasonic activation of the irrigant. *J Endod.* 2010 Apr;36(4):737-40.

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 Sep;38(9):593-6.

Venkataram V, Gokhale ST, Kenchappa M, Nagarajappa R. Effectiveness of chamomile (*Matricaria recutita* L.), MTAD and sodium hypochlorite irrigants on smear layer. *Eur Arch Paediatr Dent.* 2013 Aug;14(4):247-52.

Violich DR, Chandler NP. The smear layer in endodontics - a review. *Int Endod J.* 2010 Jan;43(1):2-15.

Wang Z, Shen Y, Haapasalo M. Effect of smear layer against disinfection protocols on *Enterococcus faecalis*-infected dentin. *J Endod.* 2013 Nov;39(11):1395-400.

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

Watson SP, Clements MO, Foster SJ. Characterization of the starvation-survival response of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 1998;180(7):1750-8.

Wu L, Mu Y, Deng X, Zhang S, Zhou D. Comparison of the effect of four decalcifying agents combined with 60°C 3% sodium hypochlorite on smear layer removal. *J Endod.* 2012 Mar;38(3):381-4.

Xu KD, McFeters GA, Stewart PS. Biofilm resistance to antimicrobial agents. *Microbiology* 2000;146 (Pt 3):547-9.

Yap B, Zilm PS, Briggs N, Rogers AH, Cathro PC. The effect of sodium hypochlorite on *Enterococcus faecalis* when grown on dentine as a single- and multi-species biofilm. *Aust Endod J.* 2014 Dec;40(3):101-10.

Zehnder M. Root canal irrigants. *J Endod.* 2006 May;32(5):389-98.

Zia A, Andrabi SM, Bey A, Kumar A, Fatima Z. Endodontic irrigant as a root conditioning agent: An in vitro scanning electron microscopic study evaluating the ability of MTAD to remove smear layer from periodontally affected root surfaces. *Singapore Dent J.* 2014 Dec;35:47-52.

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

Jardine AP, Rosa RA, Santini MF, Wagner M, Só MV, Kuga MC, Pereira JR, Kopper PM. The effect of final irrigation on the penetrability of an epoxy resin-based sealer into dentinal tubules: a confocal microscopy study. *Clin Oral Investig.* 2015.

Chandrasekhar V, Amulya V, Rani VS, Prakash TJ, Ranjani AS, Gayathri Ch. Evaluation of biocompatibility of a new root canal irrigant Q Mix™ 2 in 1- An in vivo study. *J Conserv Dent.* 2013 Jan;16(1):36-40.