UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

MARCELO HAAS VILLAS BÔAS

**Análise das propriedades químicas, biológicas e antimicrobianas de
solventes endodônticos**

BAURU

2015

MARCELO HAAS VILLAS BÔAS

**Análise das propriedades químicas, biológicas e antimicrobianas de
solventes endodônticos**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de
Bauru da Universidade de São Paulo para a
obtenção do título de Doutor em Ciências no
Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas.
Área de concentração: Endodontia

Orientador: Prof. Dr. Norberti Bernardineli

Co-orientador: Prof. Dr. Marco Antonio Húngaro
Duarte

Versão Corrigida

BAURU

2015

Villas Bôas, Marcelo Haas

V713a Análise das propriedades químicas, biológicas e antimicrobianas de solventes endodônticos / Marcelo Haas Villas Bôas - Bauru, 2015.

129 p. : il. ; 31 cm.

Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo.

Orientador: Prof. Dr. Norberti Bernardineli

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

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

Assinatura do autor:

Data:

DADOS CURRICULARES

Marcelo Haas Villas Bôas

22 de julho de 1979

Nascimento
Resende – Rio de Janeiro

Filiação

Eduardo Dias da Costa Villas Bôas
Maria Aparecida Haas Villas Bôas

2001 – 2007

Graduação em Odontologia Universidade de
Brasília

2007 – 2009

Especialização em Saúde Bucal Coletiva
Universidade de Brasília

2008 – 2010

Especialização em Endodontia Hospital de
Reabilitação de Anomalias Crâniofaciais
Universidade de São Paulo

2009 – 2011

Pós-Graduação, Mestrado em Ciências
Odontológicas Aplicadas, área de
concentração em Endodontia, pela Faculdade
de Odontologia de Bauru Universidade de São
Paulo

2011 – 2015

Pós-Graduação, Doutorado em Ciências
Odontológicas Aplicadas, área de
concentração em Endodontia, pela Faculdade
de Odontologia de Bauru Universidade de São
Paulo

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho especialmente à minha família, verdadeira razão do meu viver, base sólida sobre a qual edifico todos os meus sonhos...

Aos meu país, Maria Aparecida e Eduardo,

por proporcionarem-me a vida e por permanecerem ao meu lado em todos os momentos de minha existência. Pelo amor incondicional, pelos conselhos, pelas orações, palavras de apoio, preocupação e principalmente, por serem meus maiores exemplos. Agradeço por serem os responsáveis diretos por tudo o que sou. Vocês me são essenciais. As palavras jamais seriam suficientes para resumir meu amor por vocês.

Às minhas irmãs, Ticiane e Adriana,

por serem minhas companheiras e amigas. Pelas nossas conversas, experiências e situações compartilhadas. Pela amizade que temos por me ampararem e por serem minhas confidentes e amigas compreensivas. Não saberia viver sem vocês. Amo muito vocês.

Aos meus sobrinhos e afilhados Gustavo (Zezinho), Guilherme (Jacaré) e Henrique, o sorriso e olhar de cada um de vocês são um estímulo.

À Vó Inalda, "in memoriam" sem o seu apoio, certamente meus sonhos não teriam se realizado. Muito obrigado por tudo, pelas orações, pelas velas acesas, pela sua alegria de viver mais que contagiante! Não tenho palavras para dizer o quanto a senhora foi importante.

À minha namorada e colega de doutorado, Marcela, por sua cumplicidade e companheirismo. Sua compreensão, paciência e carinho comigo foram decisivos para a finalização deste trabalho. Te amo!

A vocês, dedico os resultados de meus esforços, de meus estudos, minhas felicidades e lutas durante todos os anos. Sem o apoio, carinho, incentivo e compreensão de vocês nada disso seria possível. Muito Obrigado!!

Meus Sinceros Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Norberti Bernardineli, pela orientação desse trabalho e constante incentivo à busca de conhecimentos, por tudo que fez por mim. À paciência e dedicação dedicados a mim, não apenas na realização deste trabalho, mas durante todo curso de Mestrado e Doutorado. Serei eternamente grato pelos ensinamentos transmitidos e principalmente pelos exemplos de compreensão, luta, inteligência e competência em cada momento. Muito obrigado!!

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao Professor Doutor Marco Antônio Húngaro Duarte, meu co-orientador, senhor e um exemplo de professor e pesquisador. Obrigado pelo apoio, incentivo e ensinamentos presentes durante todo o desenvolvimento deste trabalho e ao longo do curso de Mestrado e Doutorado, principalmente por seus conselhos e sua amizade.

Ao Professor Doutor Ivaldo Gomes de Moraes, professor do departamento de Endodontia da FOB-USP, pelo apoio, incentivo e amizade. Foi o senhor que indiretamente estimulou a minha vinda para Bauru. Muito obrigado!!

Ao amigo Professor Doutor Ronad Ordínola Zapata, colega de pós-graduação Endodontia da FOB-USP, pela sua amizade, pelo companheirismo, e especialmente pelo exemplo prestativo e humilde, refletido num constante apoio e auxílio durante o todo decorrer do trabalho. Meu sincero obrigado!!

Ao amigo Professor Doutor João Paulo Figueiró Longo, do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília - UnB, pela amizade, disponibilidade e por ter sido tão prestativo ao me ajudar com a parte laboratorial da tese. Obrigado meu amigo!!

AGRADECIMENTOS

Agradeço os queridos professores da disciplina de Endodontia da FOB - USP, Prof. Dr. Clóvis Monteiro Bramante, Prof. Dr. Roberto Brandão Garcia, Prof. Dr. Norberti Bernardineli, Prof. Dr. Ivaldo Gomes de Moraes, Profa. Dra. Flaviana Bombarda de Andrade, Prof. Dr. Marco Antônio Húngaro Duarte e Prof. Dr. Rodrigo Ricci Vivan, por todo o carinho, atenção, e paciência que vocês tiveram comigo. Com imensa admiração e respeito, agradeço pela grandiosa amizade e confiança demonstrada e, por todos os valiosos ensinamentos que recebi durante a nossa convivência. Serei eternamente grato pela oportunidade de crescimento profissional pelo que aprendi cada um de vocês. A vocês, meu carinho e gratidão!!

Ao Professor Doutor Ricardo Bentes de Azevedo, professor do Departamento de Morfologia e Genética do IB - UnB, pela disponibilização do Aparelho de Microtomografia Computadorizada e disponibilização do laboratório. Obrigado pela forma como o senhor me recebeu não deixando me faltar qualquer coisa durante a minha estada em sua escola. Muito obrigado!!

A meus professores de Endodontia da graduação Prof. Dr. Edson Dias Costa Júnior, Prof. Dr. Roberto Machado Cruz e Prof. Dr. Laudimar Alves de Oliveira, da Universidade de Brasília, obrigado por me estimularem à pesquisa. Agradeço também pelo incentivo e ajuda que nunca me foram negados. Que deus os abençoe sempre!

À família Milanezi de Almeida: Sr. Aurivan, Dona Nilce, Luízão, Ana Brígida, Laís e Júlia por serem pessoas queridas que me receberam e acolheram de braços abertos, pelo apoio e companhia durante meus estudos em Bauru. E à minha namorada Marcela, meu agradecimento pelas palavras de apoio, pela paciência, cumplicidade, pelo carinho, amizade e amor. Obrigado, Má!!

Aos meus amigos da turma do mestrado e doutorado em Endodontia: Aldo del Carpio Perochena, Bruno Cavalini Cavenago, Elaine Cristina Consolmagno, Marina Angélica Marciano da Silva, Raquel Zanin Midena e Thaís Vieira Rizzo Nunes da Cunha, Clarissa Teles Rodrigues, Paloma Gagliardi Minotti guardo de vocês lembranças e carinho. Muitos Sucesso a vocês!

Às funcionárias da Disciplina de Endodontia, D. Neide, Suelly e Andressa, pelo profissionalismo gentileza e atenção presentes em todos os momentos. Vocês são uns anjos!

Ao meu amigo Edímauro, pela confiança e amizade, pelos bons momentos de conversas e risadas. Você se tornou um amigo. Obrigado por tudo!!

À Ms Márcia Sirlene Zardin Graeff pela amizade, simpatia e disponibilidade que transformaram, de forma amena, as horas de trabalho em momentos produtivos.

Aos Funcionários da Biblioteca, exemplos de eficiência, organização, dedicação e simpatia. Agradeço pelos conhecimentos transmitidos e pela atenção dispensada.

Ao Bruno Guimarães, Denise Oda, Marcela Arias, Marcelo Vitoriano, Rafaela Zancan, Sávio Brands, Pablo Amoroso, Samuel Lucas Fernandes, Murilo Priori Alcade, Amanda Maliza pela excelente convivência durante esse período de pós-graduação.

Aos amigos do Mestrado e Doutorado das demais áreas da Odontologia e da Fonoaudiologia da FOB - USP: obrigado pela convivência e aprendizado ao longo desses anos...

À todos os professores do curso de Pós-graduação durante o Mestrado e Doutorado.

À todos que direta ou indiretamente estiveram envolvidos no desenvolvimento deste trabalho.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À 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 da Faculdade de Odontologia de Bauru na pessoa do Prof. Dr. Guilherme dos Reis Pereira Janson.

Ao Coordenador do programa de Pós-graduação na área de concentração em Endodontia Prof. Dr. Marco Antonio Húngaro Duarte.

Ao Departamento de Morfologia e Genética, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, na pessoa do Prof. Dr. Ricardo Bentes de Azevedo.

Ao Coordenação e Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela concessão de bolsa de estudo para a realização deste trabalho.

Ao Programa de Apoio à Pós-Graduação - (PROAP) CAPES, pela ajuda com a disponibilização dos materiais utilizados nesta dissertação.

*Se o destino lhe der um limão,
faça dele uma limonada.*

Dale Carnegie

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar as propriedades químicas, biológicas e antimicrobianas dos solventes endodônticos, Citrol, Eucaliptol, d-Limoneno, Xilol e Endosolv E. Dentre os testes químicos, foram avaliados a microdureza dentinária, onde utilizamos blocos de dentina bovina que foram expostos aos solventes por 2 períodos, 5 e 15 min e submetidos ao teste de microdureza. Outro teste químico foi a capacidade de dissolução dos materiais obturadores pelo teste de imersão nos solventes em 3 períodos, 2, 5 e 15 min. Para essa avaliação foram confeccionados corpos de prova dos cimentos, AH Plus, Acroseal, Sealer 26, Endofill, MTA Fillapex e RealSeal SE e dos cones de guta-percha padronizado Dentsply (DP), ProTaper e Resilon. Um terceiro teste, foi realizado para avaliar a capacidade de desobturação dos canais radiculares e o efeito da agitação ultrassônica dos solventes endodônticos após a desobturação. Sessenta incisivos centrais superiores foram divididos em 6 grupos sendo um para cada solvente (n=10) mais um grupo controle (solução fisiológica). Todos dentes foram instrumentados e obturados pela mesma técnica e escaneados no Micro-CT. Os dentes foram então desobturados utilizando ProTaper Retratamento/ProTaper Universal como técnica para todos grupos, associada a um dos solventes e foram escaneados novamente para a avaliação do volume de material remanescente após a desobturação. Cada um dos dentes foi desobturado e preenchido com o mesmo solvente utilizado na desobturação. Cada solvente foi agitado pelo ultrassom por 1 min e novamente foram escaneados e avaliados os volumes restantes dos materiais nos canais radiculares. Na avaliação biológica, utilizamos o teste de citotoxicidade com células de camundongo NIH-3T3 pelo ensaio MTT. As culturas celulares foram plaqueadas e submetidas aos solventes diluídos nas concentrações de 0.5 a 2.5%, e avaliados quanto à viabilidade celular. Por fim o último teste foi o antimicrobiano, avaliado pelo teste de contato direto em biofilme misto, formado *in situ* sobre blocos de dentina bovina. Os biofilmes foram expostos por 5 min a um dos solventes, corados com Live/Dead e avaliados em microscopia confocal de varredura a laser. Como resultados encontramos que todos solventes causaram alterações físicas na dentina e foram capazes de comprometer a microdureza dentinária, sendo que esta ação foi aumentada quando o tempo de contato foi maior. O Xilol e o Endosolv E foram mais efetivos na dissolução dos cimentos AH Plus e Endofill no período de 15 minutos em relação aos demais solventes. O Endosolv E apresentou capacidade de dissolução mais efetiva sobre os cones de guta-percha DP no período de 15 minutos em relação aos outros solventes estudados. Nos demais cimentos, materiais sólidos e nos outros períodos, os solventes apresentaram capacidade de dissolução semelhantes. Na avaliação do Micro-CT, todos solventes foram capazes de remover as obturações dos canais radiculares inclusive o grupo controle, porém nenhum foi capaz de remover os materiais obturadores completamente. A agitação ultrassônica dos solventes favoreceu um aumento na remoção do material obturador, porém não proporcionou a remoção completa do material. A agitação ultrassônica dos solventes removeu mais material obturador remanescente do que a agitação sem solvente (controle). No teste biológico todos solventes foram citotóxicos, no entanto somente o Xilol foi capaz de manter mais de 50% de células viáveis. E por fim, o Xilol e o Eucaliptol foram os solventes que apresentam a melhor ação antimicrobiana enquanto que o Citrol mostrou a pior.

Palavras chave: Retratamento do canal radicular, Solventes endodônticos, Desobturação do canal radicular

ABSTRACT

Analysis of chemical, biological and antimicrobial properties of endodontic solvents

The aim of this study was to evaluate the chemical, biological and antimicrobial properties of the Endodontic solvents, Citrol, Eucalyptol, d-Limonene, Xylene and Endosolv E. First chemical properties analysis were evaluated by dentin microhardness, where we used bovine dentin blocks that were exposed to the solvents in 2 periods, 5 and 15 min and subjected to the microhardness test. Second test was to evaluate the ability of endodontic solvents to dissolve root-filling materials by immersion test in, 2, 5 and 15 minutes. Specimens of sealers, AH Plus, Acroseal, Sealer 26, Endofill, MTA Fillapex an RealSeal SE and gutta-percha Dentsply (DP), ProTaper and Resilon points were prepared and evaluated in the three periods. Next test was conducted to evaluate the ability of solvents to desobturate root canals filled and analyse the effect of the ultrasonic passive agitation of solvents after canal unfill procedure. Sixty maxillary central incisors were prepared and obturated by same technique and randomly divided into 6 groups, one for each solvent (n=10) and a control group (saline solution). Teeth were scanned in Microcomputed Tomography (Micro-CT), unfilled with ProTaper Retratament/Protaper Universal with one of the solvents and scanned again. The residual root-fillings volumes were analysed and all teeth root canal were filled with the same solvent used in unfilling process and were passive-ultrasonically agitated (PUI) for 1 min. All teeth were scanned again in Micro-CT and data were analysed. Biological properties assessments were evaluated by cytotoxicity test with NIH-3T3 mouse cells by MTT assay. Cell cultures were subjected to diluted solvents at concentrations of 0.5 to 2.5%, and cell viability were analysed. Last evaluation in our study was the antimicrobial test. A total of 60 bovine dentin specimens infected intraorally were exposed for 5 min in direct contact to one of the solvents evaluated. After that, the dentin blocks with biofilms were stained with Live/Dead and the proportions of dead and live bacteria assessed by Confocal Laser Scanning Microscopy were analysed. The results revealed that that all solvents caused physical changes in dentin and were able to compromise the dentin microhardness, and this action was increased when the contact time was higher. In the dissolving test, Xylene and Endosolv E were more effective to dissolve AH Plus sealers and Endofill in the 15 min period, compared to other solvents. The highest dissolution capacity of Endosolv E was observed on gutta-percha cones DP also in the period of 15 minutes an this dissolving capacity was more effectively then other solvents. In all other root-fillings and gutta-percha and Resilon points and in other periods (2 and 5 min), the solvents showed similar dissolution capacity. In Micro-CT evaluation all solvents were able to remove the root canal filling materials, including saline solution, but none could remove it completely. Solvents PUI, showed an increase in root-filling material left from unfilling procedure, but also provided incomplete removal. When solvents were PUI, they removed the remaining materials significantly compared to control group (saline solution). In biological test all solvents showed high cytotoxicity, however only the Xylene was able to maintain more than 50% of viable cells. According to the antimicrobial evaluation, Xylene and Eucalyptol showed best antimicrobial action while the Citrol showed the worst.

Keywords: Root canal retreatment, Endodontic solvents, Root canal filling removal

LISTA DE ILUSTRÇÕES

- FIGURAS

- Figura 1** - (A) anél de vidro com diâmetros interno de 6 mm, externo de 8 mm e 1,5 mm de altura, obtido à partir de tubetes de anestésico para a confecção dos corpos de prova e corpo de prova de cimento. (B) Cone de guta-percha PT F3, cortado entre a linha de marcação azul e a ponta totalizando 13 mm. (C) Balança analítica AY220, Shimadzu, utilizada para a pesagem dos corpos de prova..... 49
- Figura 2** - (A) Microscópio confocal de varredura a laser Leica TCS-SPE utilizado para a análise da viabilidade microbiana em biofilme. (B) Imagem em Microscopia Eletrônica de Varredura de bloco de dentina em aumento de 1000x, demonstrando a eficácia da limpeza, antes da obtenção do biofilme formado *in situ*. 50
- Figura 3** - (A) Placa de 96 poços contendo fibroblastos em meio de cultura DMEM expostos aos diferentes solventes testados solubilizados em diferentes concentrações, os parênteses indicam o teste feito em triplicatas. (B) Espectrofotômetro UV-1700, Shimadzu, utilizados para a leitura das placas no teste de citotoxicidade..... 53
- Figura 4** - (A) Microdurômetro Buehler KV 400 utilizado para os testes de microdureza. (B) Imagem Microscópica num aumento de 50x do aspecto de losângulo de uma das indentações. Posicionamento do “+” e linhas paralelas sobrepondo os vértices agudos do losangulo, o que determinou os valores em KHN. (C) Indentação (*Knoop*) no centro do bloco de dentina. (D) Imagem microscópica num aumento de 10x das indentações indicadas com setas amarelas. As seis indentações realizadas em cada período do experimento espaçadas paralelamente em 200 µm entre si, verticalmente e 100 µm horizontalmente. 55
- Figura 5** - (A) Aparelho de micro-CT Skyscan 1076 utilizado para o escaneamentos das amostras. (B) Software CTan, utilizado para análise do volume das obturações e presença de material remanescente após a desobturação e agitação ultrassônica associados aos solventes endodônticos..... 57
-
-

Figura 6 - Microscopia confocal de varredura a laser de dentina infectada tratada com solução fisiológica (A), Citrol (B), d-Limoneno (C), Eucaliptol (D), Endosolv E (E) e Xilol (F). Fluorescência verde representa viabilidade microbiana; fluorescência vermelha representa morte microbiana.....	73
--	----

- GRÁFICOS

Grafico 1 - Curvas dos valores correspondentes a porcentagem (%) de células viáveis após a exposição celular por 24 horas nas diferentes concentrações dos solventes. A concentração 0% corresponde ao grupo controle com número de células no momento do tratamentos.	75
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Grupos Experimentais.....	47
Tabela 2	- Mediana, valores mínimo e máximo em (g) de solubilização do cimento AH Plus nos diferentes solventes nos períodos analisados Inicial, 2, 5 e 15 minutos. Letras minúsculas diferentes indicam significância entre os períodos analisados ($P<0.05$). Letras maiúsculas diferentes, indicam significância entre os solventes ($P<0.05$).	63
Tabela 3	- Mediana, valores mínimo e máximo em (g) de solubilização do cimento Acroseal nos diferentes solventes nos períodos analisados Inicial, 2, 5 e 15 minutos. Letras minúsculas diferentes indicam significância entre os períodos analisados ($P<0.05$). Letras maiúsculas diferentes, indicam significância entre os solventes ($P<0.05$).	64
Tabela 4	- Mediana, valores mínimo e máximo em (g) de solubilização do cimento Sealer 26 nos diferentes solventes nos períodos analisados Inicial, 2, 5 e 15 minutos. Letras minúsculas diferentes indicam significância entre os períodos analisados ($P<0.05$). Letras maiúsculas diferentes, indicam significância entre os solventes ($P<0.05$).	64
Tabela 5	- Mediana, valores mínimo e máximo em (g) de solubilização do cimento Endofill nos diferentes solventes nos períodos analisados Inicial, 2, 5 e 15 minutos. Letras minúsculas diferentes indicam significância entre os períodos analisados ($P<0.05$). Letras maiúsculas diferentes, indicam significância entre os solventes ($P<0.05$). solventes nos períodos analisados Inicial, 2, 5 e 15 minutos. Letras minúsculas diferentes indicam significância entre os períodos analisados ($P<0.05$). Letras maiúsculas diferentes, indicam significância entre os solventes ($P<0.05$).....	65
Tabela 6	- Mediana, valores mínimo e máximo em (g) de solubilização do cimento MTA Fillapex nos diferentes	66
Tabela 7	- Mediana, valores mínimo e máximo em (g) de solubilização do cimento RealSeal SE nos diferentes solventes nos períodos analisados Inicial, 2, 5 e 15 minutos. Letras minúsculas diferentes indicam significância entre os períodos analisados ($P<0.05$). Letras maiúsculas diferentes, indicam significância entre os solventes ($P<0.05$).	67

Tabela 8	- Mediana, valores mínimo e máximo em (g) de solubilização do cone de guta-percha PT nos diferentes solventes nos períodos analisados Inicial, 2, 5 e 15 minutos. Letras minúsculas diferentes indicam significância entre os períodos analisados ($P<0.05$). Letras maiúsculas diferentes, indicam significância entre os solventes ($P<0.05$).	67
Tabela 9	- Mediana, valores mínimo e máximo em (g) de solubilização do cone Resilon nos diferentes solventes nos períodos analisados Inicial, 2, 5 e 15 minutos. Letras minúsculas diferentes indicam significância entre os períodos analisados ($P<0.05$). Letras maiúsculas diferentes, indicam significância entre os solventes ($P<0.05$).	68
Tabela 10	- Mediana, valores mínimo e máximo em (g) de solubilização do cone de guta-percha DP nos diferentes solventes nos períodos analisados Inicial, 2, 5 e 15 minutos. Letras minúsculas diferentes indicam significância entre os períodos analisados ($P<0.05$). Letras maiúsculas diferentes, indicam significância entre os solventes ($P<0.05$).	69
Tabela 11	- Mediana, média, valores mínimo e máximo dos resultados do biovolume total, biovolume de células vivas (μm^3) e porcentagem de células vivas após a exposição aos solventes endodônticos e grupo controle. * Letras minúsculas diferentes indicam significância entre os solventes analisados ($P<0.05$).	70
Tabela 12	- Média e desvio padrão do teste de microdureza dentinária, valores dos grupos dos solvente e grupos controle positivo e negativo em (<i>Knoop</i>). Análises nos períodos inicial e após 5 e 15 minutos de exposição aos solventes. Letras diferentes indicam significância entre solventes em cada período ($P<0.05$).	76
Tabela 13	- Mediana, mínimo e máximo dos valores dos volumes em (mm^3) dos dentes obturados, desobturados e após agitação ultrassônica (PUI). Porcentagens total de material desobturado (% Desobturado), obtidos entre a diferença dos valores obturados e desobturados. Porcentagem de material remanescente removido pós-ultrassom (% PUI), obtida entre a diferença dos valores de desobturado e após agitação ultrassônica. Letras minúsculas diferentes indicam significância entre os períodos ($P<0.05$). Letras maiúsculas diferentes indicam significância entre os solventes ($P<0.05$).	77

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DA LITERATURA	27
3	PROPOSIÇÃO	41
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	45
4.1	Análise da Dissolução	47
4.1.1	Seleção dos materiais:	47
4.1.2	Confecção dos corpos de prova:.....	48
4.1.3	Pesagem dos corpos de prova e avaliação da solubilidade	48
4.2	Análise da ação antimicrobiana.....	49
4.2.1	Obtenção dos Blocos de dentina:	49
4.2.2	Formação do biofilme oral:	50
4.2.3	Cultura bacteriana e tratamento dos blocos de dentina:	51
4.2.4	Análise microscópica dos espécimes após a exposição ao solvente:	51
4.3	Análise da citotoxicidade	52
4.3.1	Seleção e cultura celular.....	52
4.3.2	Teste de viabilidade celular	53
4.4	Microdureza dentinária.....	54
4.4.1	Obtenção dos blocos de dentina:	54
4.4.2	Teste de microdureza.....	54
4.4.3	Tratamento dos blocos de dentina com os solventes.....	55
4.5	Capacidade de desobturação e limpeza dos canais radiculares	56
4.5.1	Seleção, preparo e obturação dos canais radiculares.....	56
4.5.2	Escaneamento no Micro-CT.....	57
4.5.3	Desobturação dos Canais Radiculares.....	58
4.5.4	Agitação ultrassônica dos solventes e limpeza dos canais radiculares	58
4.6	Análise estatística	59

5	RESULTADOS.....	61
5.1	Dissolução dos materiais obturadores	63
5.2	Ação antimicrobiana dos solventes	70
5.3	Citotoxicidade dos solventes endodônticos.....	75
5.4	Microdureza dentinária.....	76
5.5	Análise da desobturação e agitação ultrassônica dos solventes em Micro-CT	77
6	DISCUSSÃO	79
6.1	Da dissolução dos materiais obturadores	82
6.1.1	Dos Cimentos endodônticos.....	83
6.1.2	Dos Cones de Guta-percha e Resilon	87
6.2	Da ação Antimicrobiana.....	88
6.3	Da citotoxicidade dos solventes	91
6.4	Da microdureza dentinária	93
6.5	Da ação dos Solventes na desobturação dos Canais Radiculares.....	95
6.6	Do efeito da agitação ultrassônica dos solventes	98
7	CONCLUSÕES	101
	REFERÊNCIAS	105
	ANEXOS	125

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Uma das principais razões do fracasso de um tratamento endodôntico convencional é a persistência de microrganismos no interior do sistema de canais radiculares (SIQUEIRA JR., 2001; NAIR *et al.*, 2005). Devido a complexidade da anatomia endodôntica, os microrganismos alojam-se ao longo do sistema de canais radiculares, istmos e ramificações, que são áreas de difícil acesso à ação mecânica de instrumentos endodônticos e química de soluções irrigadoras e medicações utilizadas em curativos de demora. Tais microrganismos acabam sobrevivendo, proliferando e levando ao fracasso do tratamento prévio (CARR *et al.*, 2009). O insucesso endodôntico também pode ser atribuído à persistência de microrganismos nos tecidos periapicais, reação de corpo estranho a materiais extravasados na região apical, e à presença de lesões císticas que evoluem independentemente das condições do canal radicular (NAIR *et al.*, 1990a; 1993).

Diante do fracasso endodôntico, as alternativas de resolução são o retratamento endodôntico ou a cirurgia parendodôntica (STABHOLZ; FRIEDMAN, 1988).

Historicamente, grande quantidade de pesquisas comparam o retratamento endodôntico versus a cirurgia parendodôntica, ou analisam o índice de sucesso dos dois procedimentos (PAIK; SECHRIST; TORABINEJAD, 2004, FARZANAH *et al.*, 2004; MEAD *et al.*, 2005).

Friedman e Stabholz em 1986, sugeriram uma racionalização para definir acerca do retratamento ou cirurgia. Frente a persistência de infecções intracanal, o retratamento endodôntico é geralmente mais benéfico, pois tem maior chance de eliminar os microrganismos alojados no sistema de canais radiculares. Nestas situações a cirurgia não elimina as infecções intracanal. Quando se determina que a etiologia do foco infeccioso é independente do sistema de canais radiculares (NAIR *et al.*, 1990b; 1993), ou o acesso coronário não é possível para realizar o retratamento, a cirurgia é o tratamento mais adequado.

Na realização do retratamento, subentende-se há a necessidade da remoção do material obturador prévio, novo preparo e limpeza do canal radicular, objetivando uma maior antisepsia e remoção de debris teciduais, principalmente nas áreas de complexidades anatômicas, para que na realização da nova obturação o material venha ocupar estes espaços

anteriormente vazios ou contaminados (STABHOLZ; FRIEDMAN, 1988; MANDEL; FRIEDMAN, 1992).

Diferentes técnicas foram sugeridas para proporcionar a rapidez, a eficiência e a praticidade na manobra de desobturação dos canais radiculares. Dentre elas, a utilização de instrumentos aquecidos, aparelhos ultrassônicos, técnicas manuais, e mecânicas, rotatória, (TAMSE *et al.*, 1986; WILCOX *et al.*, 1987; LADLEY *et al.*, 1991; IMURA *et al.*, 1996; WOLCOTT *et al.*, 1999; SOMMA *et al.*, 2008), oscilatória e reciprocante (FRUCHI *et al.*, 2014).

A técnica ou combinação de técnicas para remover a guta-percha e cimentos do interior dos condutos radiculares é frequentemente ditada pelas características clínicas e pela qualidade da obturação observada. Para todas essas técnicas a associação à um solvente, pode ser extremamente válido como coadjuvante, pois em algumas situações em retratamento se tem o material bem condensado, e tem se verificado que normalmente nestas situações se torna difícil o acesso aos canais radiculares (GILBERT; RICE, 1987; EZZIE *et al.*, 2006). Nesses casos o uso de solvente torna mais rápido e efetivo o acesso aos condutos, do que o uso de calor para desobturação sem solvente.

Entretanto os estudos tem mostrado que mesmo com o emprego dos solventes, em alguns casos, há ainda remanescente de material obturador, principalmente no interior dos túbulos dentinários e áreas de complexidades anatômicas (XU *et al.*, 2012; CAVENAGO *et al.* 2014).

O ultrassom é um equipamento de amplo emprego na endodontia, utilizado desde a abertura coronária até a cirurgia parendodôntica (PLOTINO *et al.* 2007). Sua capacidade de agitação da solução irrigadora tem proporcionado maior limpeza em áreas de complexidades anatômicas (VAN DER SLUIS *et al.*, 2007), bem como tem favorecido a remoção de remanescente de medicamentos nas áreas de istmos e complexidades anatômicas (WISEMAN *et al.*, 2011). Possivelmente a agitação do solvente ao final da desobturação, venha proporcionar uma maior remoção de restos de materiais obturadores dos canais radiculares (CAVENAGO *et al.*, 2014).

Diversos solventes vem sendo propostos para serem associados aos métodos de desobturação. Um solvente ideal deve estabelecer um equilíbrio entre o nível de toxicidade e agressão aos tecidos, nível de segurança clínica adequado, capacidade química de dissolução

tanto da guta-percha, como dos cimentos (MAGALHÃES *et al.*, 2007), assim como possível ação sobre microrganismos.

Tradicionalmente, o clorofórmio foi o solvente de escolha para remoção de guta-percha, como se provou ser o mais eficaz (TAMSE *et al.*, 1986; WILCOX, 1995).

No entanto, foram levantadas questões sobre sua citotoxicidade em caso de contato com tecidos periapicais, além do que foi classificado como um agente cancerígeno e um risco potencial para os profissionais da área odontológica (WENNBORG; ØRSTAVIK, 1989; DE OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Outras substâncias vem sendo propostas como o Halotano, o Xilol, o Eucaliptol, o d-Limoneno, Óleo de laranja e o Tetracloroetileno (TAMSE *et al.*, 1986; SOUZA; BRAMANTE, 1994; WILCOX, 1995; UEMURA *et al.*, 1997; MARTOS *et al.*, 2011).

A avaliação da capacidade de desobturação durante o retratamento independentemente da técnica utilizada, tem sido determinada, por diferentes metodologias como: o seccionamento transversal (WOLCOTT *et al.*, 1999) ou vertical dos dentes analisados (WILCOX *et al.*, 1987; FRIEDMAN; MOSHONOV; TROPE, 1992; MOSHONOV; TROPE; FRIEDMAN, 1994; BARRIESHI-NUSAIR, 2002; ZMENER; PAMEIJER; BANEGAS, 2006; HASSANLOO *et al.*, 2007; GIULIANI; COCCHETTI; PAGAVINO, 2008; TAKAHASHI *et al.*, 2009), para a avaliação histológica, em microscopia óptica ou de varredura e a diafanização (SCHIRRMESTER *et al.*, 2006; GU *et al.*, 2008). Outros estudos analisam a presença de remanescente de material obturador por meio de radiografias (FERREIRA; RHODES; PITT FORD, 2001; MASIERO; BARLETTA, 2005; GERGI; SABBAGH, 2007; ZANETTINI *et al.*, 2008) ou microtomografia computadorizada (micro-CT) (BARLETTA *et al.*, 2008; HAMMAD; QUALTROUGH; SILIKAS, 2008; MA *et al.*, 2012; FRUCHI *et al.*, 2014). Este último, em particular, pode fornecer imagens detalhadas dos canais radiculares (PETERS *et al.*, 2001; 2003; HÜBSCHER *et al.*, 2003; PAQUÉ *et al.*, 2005) e seu conteúdo (JUNG *et al.*, 2005; BARLETTA *et al.*, 2008), sem a necessidade de seccionamento da amostra. Os métodos não destrutivos de obtenção de imagem são mais adequados para a avaliação do alargamento gradual do espaço do canal durante o retratamento (HASSANLOO *et al.*, 2007), além de apresentarem a possibilidade de análises volumétricas quantitativas (HAMMAD; QUALTROUGH; SILIKAS, 2009; METZGER *et al.*, 2010).

Na maioria das vezes, o fracasso endodôntico é resultante da permanência de uma infecção instalada na porção apical do canal, mesmo nos casos em que os canais, aparentemente, foram tratados e obturados de forma adequada. Normalmente, os microrganismos estão alojados em áreas onde não houve a ação dos instrumentos, nem de soluções irrigadoras e estão organizados na forma de biofilme (NAIR, 1995; CARR *et al.*, 2009). Portanto, o ideal é que o solvente apresente, além da capacidade de dissolução do material obturador, uma ação antimicrobiana eficiente, principalmente quando se tem um biofilme organizado.

Durante os procedimentos de retratamento, a dentina radicular é exposta aos solventes de guta-percha depositados na câmara pulpar. Os solventes podem causar alterações físico-químicas na superfície da dentina e afetar sua interação com os materiais utilizados para a obturação, bem como sua resistência, que permitem a penetração de fluídos, possibilitando infiltrações bacterianas. Os efeitos desses agentes na dentina não foram elucidados e este questionamento se mostra clinicamente importante.

Um outro aspecto relevante na desobturação com o emprego de solventes, é que em situações onde há um material bem condensado, os mesmos são colocados na porção apical do canal radicular e podem entrar em contato com os tecidos apicais. Nesta situação, se apresentarem elevada citotoxicidade podem levar a exacerbação da reação inflamatória dos tecidos periapicais, ocasionando sintomatologia pós-operatória e prejuízo à reparação tecidual apical.

Atualmente, uma grande quantidade de solventes vem sendo empregados na desobturação em casos de retratamento, destacando-se o Xilol, Eucaliptol, Óleo de laranja, d-Dimoneno e Tetracloroetileno. Entretanto, a maioria dos estudos analisou a eficiência destes solventes na limpeza empregando dentes seccionados ou radiografia. A análise tridimensional em micro-CT da capacidade de desobturação destes solventes não foi investigada, bem como se a agitação ultrassônica destes solventes melhora sua capacidade de desobturação. Outros aspectos importantes a serem esclarecidos, são: qual destes solventes apresenta maior ação sobre microrganismos organizados na forma de biofilme; qual destes agentes apresenta maior ação danosa na dentina; e qual dos solventes apresenta menor ação citotóxica determinado pela viabilidade celular.

Um estudo mais detalhado comparando as diversas características químicas, físicas e biológicas dos solvente endodônticos não foi feito até então. A realização desta pesquisa elucidará ao clínico qual dos solventes reúne a maior quantidade de propriedades ideais para ser empregado na clínica durante a desobturação dos canais radiculares.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

Solventes

Os solventes são substâncias químicas que têm a capacidade de dissolver outra (um soluto), resultando em uma solução (LOPES; SIQUEIRA JR., 2010). Um solvente, geralmente apresenta-se na forma líquida, mas pode também estar em estado sólido ou gasoso.

De forma geral, os solventes são amplamente utilizados em indústrias têxteis, químicas, farmacêuticas, de petróleo e gás, de motores de combustão, de pesticidas, de tintas, em cervejarias, limpeza a seco e em processamento de alimentos e cosméticos.

Genericamente, os solventes são divididos em orgânicos e inorgânicos. Os primeiros dissolvem as substâncias orgânicas, enquanto as inorgânicas são dissolvidas pelos últimos (BRAMANTE; SILVA, 2009; LOPES; SIQUEIRA JR., 2010). Os solventes orgânicos foram propostos a serem utilizados na Endodontia, em especial, na desobturação total dos canais radiculares em casos de retratamento, na desobturação parcial para a confecção de pinos intrarradiculares e no amolecimento da guta-percha, para adaptação apical do cone principal em obturações, para a técnica do cone moldado (BRILLIANT; CHRISTIE, 1975; TAMSE *et al.* 1986).

Solventes Endodônticos

Vários métodos para remover o material obturador em retratamento têm sido sugeridos. Entre esses, como já mencionados, estão o uso de instrumentos manuais, instrumentos aquecidos, técnicas mecanizadas, métodos químicos e a agitação ultrassônica. Cada um de forma sozinha ou em combinação. Das técnicas citadas, as mais comumente utilizadas são o método químico associado ao mecânico.

Na execução do retratamento endodôntico, os solventes são amplamente utilizados. Entretanto, deve-se considerar sua eficácia na dissolução de materiais obturadores (GÖRDUYSUS *et al.* 1997). Existem vários agentes solventes que podem ser utilizados para

a dissolução desses materiais. A sua escolha deve basear-se em dois critérios fundamentais, a eficácia da ação solvente e o nível de toxicidade (ERDEMIR; ADANIR; BELLI, 2003). A remoção da obturação do canal radicular é bastante simplificada pelo uso dos solventes, que amolecem e dissolvem a guta-percha e alguns tipos de cimentos, o que facilita a sua remoção, minimizando danos às estruturas do dente (TAŞDEMIR; YILDIRIM; ÇELIK, 2008).

Tradicionalmente, o clorofórmio foi o solvente de escolha para remoção da guta-percha. Em casos de retratamento, ele se mostrou ser o mais eficaz (TAMSE *et al.* 1986; WENNBORG; ØRSTAVIK, 1989; WILCOX, 1995). Estudos mais recentes confirmam a eficácia do clorofórmio, principalmente com relação a rapidez que dissolve, quando comparados a outros solventes (DE OLIVEIRA *et al.*, SOMMA *et al.*, 2008; TAŞDEMIR *et al.*, 2008; RING *et al.*, 2009). Uma desvantagem constantemente observada, foi a sua alta volatilidade. Em função disso, constantes aplicações desse solvente têm de serem feitas durante um procedimento de desobturação do canal radicular (ZAKARIASEN; BRAYTON; COLLINSON, 1990).

Não se pode negar a grande capacidade solvente de guta-percha que o clorofórmio apresenta. No entanto, preocupações foram levantadas sobre sua citotoxicidade e risco em potencial para a equipe odontológica, quando inalado rotineiramente (WENNBORG; ØRSTAVIK, 1989; DE OLIVEIRA *et al.*, 2006). Após a realização de testes pela *Food and Drug Administration* (FDA), foi comprovado, em 1974, o potencial carcinogênico deste solvente (MCDONALD; VIRE, 1992). A partir daí, tem-se sugerido a utilização de outras soluções solventes para o processo de desobturação dos canais radiculares (KAPLOWITZ, 1991).

Uma alternativa apresentada ao uso do Clorofórmio foi o Xilol. Este solvente mostrou ser menos tóxico (DELLA NINA *et al.*, 1980), porém, se mostrou ser mais lento e ter menor efeito solvente sobre a guta-percha, quando comparado ao clorofórmio (TAMSE *et al.*, 1986; WENNBORG; ØRSTAVIK, 1989). Outra característica observada, também, foi a sua evaporação lenta (FRIEDMAN; STABHOLZ; TAMSE, 1990), característica que pode causar irritação caso em contato com os tecidos perirradiculares (PÉCORA; SPANÓ; BARBIN, 1993). Se inalado prolongadamente, causa irritações no trato respiratório podendo afetar o sistema nervoso central (SPANÓ *et al.*, 1995).

Alternativas que mantivessem a efetividade de ação solvente e baixa toxicidade foram buscadas no grupo dos óleos essenciais. O uso de óleos essenciais em Endodontia vem

crecendo por causa de sua segurança comprovada, biocompatibilidade e baixo potencial carcinogênico (VAJRABHAYA *et al.*, 2004). Esses solventes usados no processo de desobturação do canal radicular, são extraídos de plantas aromáticas por destilação, ou no caso de frutas cítricas, por pressão das cascas de seus frutos.

O eucaliptol é uma substância utilizada para aromatização e tem sido usado como um solvente de materiais obturadores. É considerado de baixa toxicidade, além de ser antisséptico e antimicrobiano (WENNBORG; ØRSTAVIK, 1989). Possui uma boa capacidade de dissolução sobre os cones de guta-percha, apesar de lenta. Porém sua ação pode ser acelerada quando aquecido (WOURMS *et al.*, 1990). Quando usado para a dissolução de cimentos endodônticos, apresentam baixa efetividade. Provavelmente, o primeiro autor a recomendar o uso de um óleo essencial para a dissolução de guta-percha tenha sido Buckley (1910 apud SPANÓ *et al.*, 1995), quando preconizou o uso da associação de eucaliptol mais clorofórmio para auxiliar na adaptação dos cones principais durante a obturação, na técnica do cone moldado.

O óleo de laranja, outro óleo essencial, foi apresentado inicialmente como um excelente solvente de cimento à base de óxido de zinco e eugenol (OYAMA; SIQUEIRA; SANTOS, 2002). Pécora *et al.* (1993), relataram que o óleo de laranja, apresenta ação solvente aos cones de guta-percha, semelhante ao xilol, sem contudo apresentar os efeitos adversos do xilol. Outras características benéficas, observadas no óleo de laranja, foram uma menor ação citotóxica encontrada por esse solvente, quando comparado com clorofórmio e eucaliptol (SCELZA *et al.*, 2006), e uma melhor ação antifúngica, quando comparado a outros óleos essenciais (SCHELZ; MOLNAR; HOHMANN, 2006).

Um outro óleo essencial, citado com boa ação solvente, foi o d-limoneno (UEMURA *et al.*, 1997). Este óleo é uma substância natural, extraída e refinada do óleo de laranja, que apresenta fragrância cítrica fresca, muito usado como aromatizante. Foi definido pela FDA como um material reconhecidamente seguro (*National Institutes of Health*, 1998). A capacidade do d-limoneno de dissolver cones de guta-percha é semelhante ao eucaliptol e ao óleo de laranja (TANOMARÚ-FILHO *et al.*, 1997). No entanto apresentou ser menos volátil que o xilol e menos ainda que o clorofórmio (MTZEGGER; MARIAN-KFIR; TAMSE, 2000). Nos testes de citotoxicidade, apresentou ação similar ao Clorofórmio (VAJRABHAYA *et al.*, 2004).

Outro solvente disponível para a dissolução de guta-percha e cimento endodôntico é o tetracloroetileno. Wourms *et al.* em 1990, avaliaram a eficácia de 32 solventes incluindo o tricloroetileno, o tetracloroetileno e o clorofórmio na dissolução da guta-percha, em temperaturas de 22°C e 37°C. Em ambos os períodos, esses três solventes dissolveram a guta-percha em menor tempo, quando comparados com os demais. A Septodont (Saint-Maur-des-Fossés, França), desenvolveu o Endosolv E, que em sua formulação estão o tetracloroetileno, excipientes e timol. Esse solvente apresenta boa ação em cimentos à base de óxido de zinco-eugenol, em cones de guta-percha (TAMSE *et al.*, 1986) e de resina (FARIA-JÚNIOR *et al.*, 2011). Como vantagem também, o Endosolv E apresenta baixas alterações estruturais quando aplicados na superfície dentinária (KAUFMAN *et al.*, 1997).

A escolha de um solvente ideal para o retratamento endodôntico requer um equilíbrio entre segurança clínica no seu uso (substâncias com baixa toxicidade e agressividade aos tecidos) e uma maior capacidade química de dissolução dos materiais obturadores (WOURMS *et al.*, 1990; SCHUURS; MOORER; WESSELINK, 2004; MAGALHÃES *et al.*, 2007).

A ação dos Solventes Endodônticos nos materiais obturadores

A guta-percha é o material de preenchimento mais comum usado para obturação dos canais radiculares (FRIEDMAN; ROSTEIN; SHAR-LEV, 1989), associada a uma grande variedade de cimentos endodônticos (DE OLIVEIRA *et al.*, 2006). Os cones de guta-percha apresentam em sua composição além da guta-percha, que é um polímero de hidrocarboneto (metilbutadieno ou isopreno), o óxido de zinco, radiopacificadores, ceras e resinas (LOPES; SIQUEIRA JR., 2010). Este material, pode ser dissolvido por vários solventes orgânicos. A solubilidade da guta-percha se dá pela interação das suas moléculas com o solvente. As interações ocorrem pela afinidade entre o solvente com o polímero, que penetram entre as suas cadeias macromoleculares. A ação dos solventes em guta-percha foram demonstradas historicamente por metodologias de pesagem e imersão em solventes (DELLA NINA *et al.*, 1980; TAMSE *et al.*, 1986; GÖRDUYSUS *et al.*, 1997; BUENO; VALDRIGHI, 1998; METZGER; MARIAN-KFIR; TAMSE, 2000; MAGALHÃES *et al.*, 2007), e de medição da profundidade da penetração de instrumentos (WENNBERG; ØRSTAVIK, 1989; SPANÓ *et al.*, 1995; HUNTER; DOBLECKI; PELLEU, 1991). De maneira geral, nos trabalhos citados

todos os solventes tiveram boa ação em gutta-percha, porém o que variou entre eles foi o tempo de dissolução.

Um outro material proposto para obturação do canal radicular em associação à um cimento endodôntico foi o Resilon (SybronEndo, Glendora, CA, Estado Unidos). São cones de polímero sintético termoplástico contendo vidro bioativo, com propriedades similares a gutta-percha (SHIPPER *et al.*, 2004). Para sua técnica de obturação, esse material é usado em associação ao cimento RealSeal SE (SybronEndo, Glendora, CA, Estado Unidos), que é a base de resina de metacrilato com polimerização dual. Alguns estudos mostram que os solventes apresentam capacidade de dissolução similar entre os cones Resilon e gutta-percha (MUSHTAQ *et al.*, 2012). Outros, apresentam diferenças na capacidade de dissolução com relação ao tempo e solventes utilizados (TANOMARÚ-FILHO *et al.*, 2010). Outros ainda, indicam baixa ação solvente nos cones Resilon, por todos solventes testados individualmente ou em associação (FARIA-JÚNIOR *et al.*, 2011).

Historicamente, o termo solventes de gutta-percha foi extensamente utilizado por diversos autores (TAMSE *et al.*, 1986; WENNBORG; ØRSTAVIK, 1989; KAPLOWITZ, 1991;1994; FRIEDMAN; STABHOLZ; TAMSE, 1990; LADLEY *et al.*, 1991; BARBOSA; BURKARD; SPÅNGBERG, 1994; KAUFMAN *et al.*, 1997; UEMURA *et al.*, 1997; ROTSTEIN *et al.*, 1999; METZGER; MARIAN-KFIR; TAMSE, 2000; PAIK; SECHRIST; TORABINEJAD, 2004; OYAMA; SIQUEIRA; SANTOS, 2002; ERDEMIR; ELDENIZ; BELLI, 2004a; 2004b; VAJRABHAYA *et al.*, 2004). Essa terminologia foi utilizada, provavelmente devido a baixa solubilidade encontrada em cimentos à base de óxido de zinco-eugenol frente aos solventes. Inicialmente não havia a presença da colofônia em sua composição, uma resina vegetal que proporciona tal solubilidade frente aos solventes endodônticos (PÉCORA *et al.*, 1992). Lopes e Gahyva (1992), compararam a ação do eucaliptol, do clorofórmio, do Endosolv E e do óleo de laranja doce, quanto à capacidade de solubilização e desintegração do cimento de óxido de zinco-eugenol. Os resultados mostraram que todos os solventes testados tiveram baixa ação solvente frente o cimento de óxido zinco-eugenol. Sendo o clorofórmio o que apresentou maior ação e rapidez de dissolução.

Ainda utilizando metodologias de pesagem e imersão em solventes e de medição da profundidade da penetração de instrumentos, vários estudos avaliaram a eficácia de dissolução dos solventes em diferentes tipos de cimentos endodônticos (FRIEDMAN; MOSHONOV; TROPE, 1992; HANSEN, 1998; WHITWORTH; BOURSIN, 2000;

SCHÄFER; ZANBDIGLARI, 2002; BODRUMLU; ER; KAYAOGLU, 2008; MARTOS *et al.*, 2006; MUSHTAQ *et al.*, 2012; BAYRAM; DALAT; BAYRAM, 2015). Os resultados encontrados nesses estudos demonstraram que todos os cimentos endodônticos são solúveis em algum grau, quando expostos aos solventes endodônticos.

Comparando o clorofórmio com outros solventes, ele se mostrou ser mais eficiente, tanto em quantidade quanto em velocidade de dissolução dos cimentos de resina epóxica, dos que contém hidróxido de cálcio, de óxido de zinco-eugenol e de MTA (WHITWORTH; BOURSIN, 2000; BODRUMLU; ER; KAYAOGLU, 2008). Na tentativa de solubilizar cimentos de ionômero de vidro, nenhum solvente apresenta boa ação, nem tão pouco o clorofórmio (WHITWORTH; BOURSIN, 2000; KOSTI *et al.*, 2006). Outro cimento que apresenta baixa solubilidade frente aos solventes é o de resina de metacrilato, RealSeal SE (BAYRAM; DALAT; BAYRAM, 2015). Na dissolução de cimentos que contém hidróxido de cálcio, a base de silicone e de óxido de zinco-eugenol, o xilol e o óleo de laranja apresentam efeitos similares entre eles e superiores ao eucaliptol (MARTOS *et al.*, 2006). Cimentos de resina epóxica e que contém hidróxido de cálcio, apresentam uma melhor solubilidade frente ao xilol. Já cimentos a base de silicone e de óxido de zinco-eugenol se mostraram mais solúveis ao tetracloroetileno (MUSHTAQ *et al.*, 2012).

Ação antimicrobiana dos solventes endodônticos

Casos de insucessos endodônticos que exigem o retratamento podem ser atribuídos em grande parte à infecção microbiana. Essas infecções podem ocorrer por inadequações técnicas durante o tratamento primário ou pela reinfecção do sistema de canais radiculares (SCELZA *et al.*, 2006). É difícil diferenciar entre os microrganismos remanescentes de infecções primárias e microrganismos colonizadores recentes, que contribuem para a infecção secundária. Alguns autores tentaram fazer essa distinção (SUNDQVIST *et al.*, 1998; EVANS *et al.*, 2002). Como resultados observaram que, nas infecções ocorridas nas periodontites apicais primárias, os microrganismos são caracterizados por multi-espécies, predominantemente anaeróbios obrigatórios ou facultativos, Gram-negativos. Já na periodontite apical secundária os microrganismos são anaeróbios facultativos Gram-positivos, caracterizando-se por uma quantidade limitada de espécies ou podendo ser, até mesmo, uma monoinfecção (LOVE, 2001; PORTENIER; WALTIMO; HAAPASALO, 2003).

Estudos mais recentes demonstraram que o modelo de doença mais provável nos casos endodônticos ocorrem em modelo de biofilme (NAIR *et al.*, 2005). Observaram também que, embora a doença aguda possa ser causada por microrganismos planctônicos, a fonte para todos estes microrganismos é de um biofilme preexistente e constante (NAIR *et al.*, 1990; CHÁVEZ DE PAZ *et al.*, 2007). Tanto em periodontite apical primária quanto na secundária, ocorre ao longo do complexo sistema de canais radiculares, a presença de microbiota ecologicamente organizada e protegida em formato de biofilme (COSTERTON *et al.*, 2003). As células dentro do biofilme são organizadas em microcolônias que produzem matriz extracelular que, por sua vez, às protegem de agressões externas. Sua exposição às condições ambientais diferem das condições existentes na superfície do biofilme, como por exemplo uma diminuição da tensão de oxigênio (SKUCAITE *et al.*, 2010). Além disso, a baixa taxa metabólica dos microrganismos dentro do biofilme, assim como a matriz extracelular, dificultam a ação e efetividade de muitos antimicrobianos (DUNAVANT *et al.*, 2006; CHÁVEZ DE PAZ, 2007).

Estudos recentes tem comparado o uso de diversas substâncias químicas, auxiliares no tratamento químico mecânico (NAENNI; THOMA, ZEHNDER, 2004; BRYCE *et al.*, 2009; DEL CARPIO-PEROCHENA *et al.*, 2011; ORDINOLA-ZAPATA *et al.*, 2013), analisando seus efeitos sobre biofilmes orais formados *in situ*.

Historicamente o efeito de antimicrobianos vem sendo realizado por métodos de difusão em ágar ou métodos de diluição (KALEMBA; KUNICKA, 2003; MARTOS *et al.*, 2013). Estudos anteriores demonstraram a atividade antimicrobiana apresentada pelo clorofórmio quando utilizado como solvente de guta-percha e mostraram uma significativa redução do nível de *Enterococcus faecalis* em casos de retratamento (MOLANDER *et al.*, 1998; EDGAR; MARSHALL; BAUMGARTNER, 2006). A atividade antimicrobiana de outros três solventes endodônticos foi realizada também em ensaio de difusão em ágar em colônias de *E. faecalis*. A atividade antimicrobiana do RC Solve, um dos solvente analisados, foi comparável a da vancomicina, droga padrão. O xilol não apresentou atividade antibacteriana e o Endosolv E apresentou atividade antimicrobiana menor que o RC Solve (SUBBIYA; PADMAVATHY; MAHALAKSHMI, 2013).

No processo de remoção dos materiais obturadores dos canais radiculares, o máximo possível de cimento e de guta-percha devem ser removidos do sistema de canais radiculares (STABHOLZ; FRIEDMAN, 1988; SCHIRRMUSTER *et al.*, 2006b). Essa manobra, quando

realizada com auxílio de um solvente, expõe facilmente, nos casos de presença de infecção, restos de tecidos necróticos e microrganismos (WILCOX, 1989). O solvente no processo de desobturação, além de apresentar sua ação desejada de dissolver os materiais obturadores, pode apresentar uma ação sobre microrganismos organizados em formato de biofilme.

Efeito citotóxico dos solventes endodônticos

Quando realizada em retratamento, a desobturação dos canais radiculares associada à solventes, têm sido levantada a preocupação, quanto aos efeitos tóxicos dessas substâncias químicas. Em geral, todos os solventes utilizados em retratamento são tóxicos (BARBOSA; BURKARD; SPÅNGBERG, 1994). Quanto maior o poder de dissolução da substância solvente, maior também é o seu potencial de toxicidade (WALTON, 1992). O potencial irritante dos solventes foi demonstrado quando injetados em subcutâneo de ratos. Tanto microscópica quanto macroscopicamente, claramente foram observadas reações inflamatórias de severas a moderadas e um alto índice de necrose tecidual (GROSSMAN; LALLY, 1982).

Na desobturação dos canais radiculares, quando levados os solventes à câmara pulpar durante a remoção dos materiais obturadores, por estas substâncias serem líquidas, podem escorrer pelas paredes dos canais radiculares e atingir a região apical e periapical (WALTON, 1992). Caso ocorra esse extravasamento, prováveis efeitos citotóxicos e genotóxicos, por sua difusão aos tecidos periapicais e sistêmicos (HUNTER; DOBLECKI; PELLEU, 1991), bem como possíveis efeitos mutagênicos e carcinogênicos podem ocorrer. Ribeiro *et al.* (2007), estudaram os efeitos genotóxicos e citotóxicos do clorofórmio e eucaliptol *in vitro*, pelo ensaio de cometa. Ambos solventes se mostraram citotóxicos mesmo em baixas concentrações, porém foram seguros com relação a genotoxicidade na pequena concentração testada. O potencial citotóxico dos solventes em fibroblastos de camundongos também foram testados. O clorofórmio, o halotano e a tupertina tiveram ação similar, sendo que todos tiveram um alto percentual de toxicidade (BARBOSA; BURKARD; SPÅNGBERG, 1994). Ainda em fibroblastos de camundongos, o clorofórmio e GP-Solvent (limoneno) apresentaram efeitos também similares e o mesmo alto nível de toxicidade (VAJRABHAYA *et al.*, 2004).

Com o intuito de prevenir injúrias aos tecidos periapicais, alguns autores relataram que a utilização de solventes deveria ser limitada (ZAKARIASEN; BRAYTON; COLLINSON,

1990), ou evitada na porção apical do canal radicular (TAINTOR *et al.*, 1983; GILBERT; RICE, 1987;). No entanto, no processo de desobturação da porção apical dos canais radiculares, em muitos casos nos deparamos com materiais obturadores bem condensados e antigos e canais curvos, características que dificultam esse procedimento. Nessas situações é prudente que sejam utilizados os solventes endodônticos, pois diminuem os riscos de desvios às paredes dos canais radiculares e de fratura dos instrumentos.

Efeito químico dos Solventes Endodônticos em dentina

Nas técnicas de desobturação associadas aos agentes químicos, grande parte da dentina nas porções coronária e radicular são expostas aos solventes endodônticos (KAUFMAN *et al.*, 1997; ERDEMIR; ELDENIZ; BELLI, 2004a; 2004b). Os solventes endodônticos podem alterar a composição química da superfície da dentina e, conseqüentemente, afetar a sua interação com materiais restauradores (WOURMS *et al.*, 1990). Estudos demonstraram que alguns agentes químicos provocam alterações na estrutura química da dentina humana, alterando as proporções de Cálcio-Fósforo em sua superfície (HENNEQUIN; DOUILLARD, 1994; ROTSTEIN *et al.*, 1996). Alterações entre os níveis de Cálcio-Fósforo podem mudar a relação original entre os componentes orgânicos e inorgânicos, modificando as características de permeabilidade e solubilidade da dentina (ROTSTEIN *et al.*, 1996). Variações nos níveis de cálcio e fósforo (KAUFMAN *et al.*, 1997), magnésio, potássio e enxofre (ERDEMIR; ELDENIZ; BELLI, 2004a), presentes em dentina humana, ocorrem quando em contato com os solventes utilizados para o retratamento endodôntico.

Uma outra metodologia proposta para estudar as alterações provocadas por agentes químicos em dentina, foi a avaliação da microdureza dentinária (PÉCORA *et al.*, 1994; CRUZ-FILHO *et al.*, 2001). Estudos mostraram que o clorofórmio, xilol e halotano provocam uma redução significativa na microdureza do esmalte e da dentina e, na maioria dos casos, esse efeito foi significativo aos 5 minutos (ROTSTEIN *et al.*, 1999; JACOB; LAKSHMI NARAYANAN, 2000). Em estudos posteriores, utilizando a mesma metodologia com dentes humanos, o clorofórmio e halotano (ERDEMIR; ELDENIZ; BELLI, 2004b) e o clorofórmio, eucaliptol e óleo de laranja (KHEDMAT *et al.*, 2014), apresentaram baixas alterações na microdureza dentinária, semelhantes ao grupo controle utilizado.

A desobturação dos canais radiculares

Um dos pontos cruciais envolvidos no retratamento endodôntico é a remoção do material obturador do canal radicular. Quando este material pode ser facilmente removido, a continuação do tratamento torna-se mais simples em tempo mais curto. Portanto, a possibilidade de retratamento depende da viabilidade de remover completamente o material obturador original dos canal radicular. Quando estes materiais são de natureza rígida, sua remoção é mais difícil, complicando o tratamento (SAE-LIM *et al.*, 2000).

O solventes endodônticos quando utilizados sozinhos não removem o material obturador de dentro do canal radicular. Várias técnicas têm sido propostas para remoção da guta-percha amolecida pelos solventes (FRIEDMAN; STABHOLZ; TAMSE, 1990).

Historicamente as técnicas para desobturação dos canais radiculares foram realizadas pela associação de instrumentos manuais e solventes (WILCOX *et al.*, 1987; FACHIN; WENCKUS; AUN, 1995; BARRIESHI-NUSAIR, 2002), ou pelo uso de instrumentos aquecidos (WILCOX *et al.*, 1987; WILCOX; JUHLIN, 1994; EZZIE *et al.*, 2006; BODRUMLU *et al.*, 2008). Um outro método proposto para a remoção dos materiais obturadores em retratamento foi o uso de instrumentos rotatórios em aço inoxidável (WILCOX, 1995; BODRUMLU *et al.*, 2008). A brocas Gates-Glidden acionadas em baixa rotação aquecem e plastificam a guta-percha facilitando a sua remoção. Como desvantagem foi observado que, devido à rigidez do instrumento e o risco de provocar acidentes, seu uso é restrito à porção reta do canal radicular (SOUTER; MESSER, 2005). Consequentemente, em dentes posteriores o seu uso é limitado aos terços cervical e médio dos canais radiculares (ZAKARIASEN; BRAYTON; COLLINSON, 1990). Essa limitação também foi observada em outros instrumentos propostos para o processo de desobturação, tais como o Canal Finder (FRIEDMAN; ROTSTEIN; SHAR-LEV, 1989; IMURA *et al.*, 1996) e o GPX (HÜLSMANN; STOTZ, 1997).

Com o desenvolvimento de novas gerações de instrumentos, vários relatos confirmaram as vantagens dos instrumentos e sistemas rotatórios de níquel-titânio, no processo de desobturação dos canais radiculares. Dentre esses relatos, estão a manutenção da forma do canal sem formação de degrau ou zip (BRAMANTE; BETTI, 2000; SAAD; AL-HADLAQ; ALKATHEERI, 2007; GU *et al.*, 2008), com uma desobturação mais rápida quando comparados aos instrumentos manuais (FERREIRA; RHODES; PITT FORD, 2001).

Vários estudos compararam técnicas manuais com os sistemas rotatórios no processo de desobturação dos canais radiculares. De forma geral, não existe um consenso sobre qual o tipo de instrumentos é mais eficiente para esses procedimentos. Alguns dos resultados encontrados, indicam que o uso de instrumentos manuais associados a solventes são melhores (BARRIESHI-NUSAIR, 2002; ZMENER; PAMEIJER; BANEGAS, 2006, HAMMAD; QUALTROUGH; SILIKAS; 2008), enquanto em outros, os sistemas rotatórios de NiTi foram mais eficazes (SCHIRRMESTER *et al.*, 2006; RÖDIG *et al.*, 2012), outros ainda não demonstram nenhuma diferença entre as duas técnicas (FENOUL; MELESS; PÉREZ, 2010).

A anatomia dos canais radiculares, o nível e a qualidade da obturação, principalmente quando bem condensada ou antiga, são as características que irão indicar a técnica de retratamento (LADLEY *et al.*, 1991; MOUNCE, 2004). Os cimentos endodônticos usados em conjunto com guta-percha, quando presentes em ramificações anatômicas, são uma outra preocupação, pois podem permanecer inacessíveis à remoção mecânica dos instrumentos (FRIEDMAN; MOSHONOV; TROPE, 1992; SCENZA *et al.*, 2006). Em tais casos, os solventes são essenciais para a limpeza completa dos materiais obturadores e debrís, pois permitirão uma desinfecção eficaz do sistema de canais radiculares (SCENZA *et al.*, 2006).

A agitação Ultrassônica dos Solventes

É consenso entre diversos autores que nenhum método de desobturação realizado em retratamento produz uma limpeza completa das paredes dos canais radiculares (WILCOX *et al.*, 1987; MOSHONOV *et al.*, 1994; HANSEN, 1998; IMURA *et al.*, 2000; FERREIRA; RHODES; FORD, 2001, BARRIESHI-NUSAIR, 2002; MASIERO; BARLETTA, 2005; ZEMNER *et al.*, 2006; BUENO *et al.*, 2006; HASSANLOO *et al.*, 2007; HAMMAD; QUALTROUGH; SILIKAS, 2008; ROGGENDORF *et al.*, 2010; ABRAMOVITZ *et al.*, 2012; MA *et al.*, 2012; RÖDIG *et al.*, 2012; SOLOMONOV *et al.*, 2012; CAVENAGO *et al.*, 2014). A presença residual de guta-percha e cimento nos canais radiculares podem cobrir restos de tecidos necróticos ou bactérias e seus subprodutos, o que pode causar a falha do tratamento endodôntico (LADLEY *et al.*, 1991). A permanência dos materiais obturadores nas irregularidades dos canais, tais como extensões e achatamentos, istmos e deltas apicais, ocorrem devido à inacessibilidade dos instrumentos e agentes químicos (ZEMNER *et al.*, 2006).

Segundo Hassanloo *et al.* (2007), a quantidade de material obturador remanescente após o processo de desobturação pode ser reduzida durante um novo preparo com alargamento que exceda o preparo inicial do canal radicular. Na tentativa de responder a este desafio, o alargamento adicional do canal radicular com sistemas rotatórios de NiTi tem sido proposto (MARQUES DA SILVA *et al.*, 2012). Porém, a presença de resíduos remanescentes da obturação prévia ainda foram encontrados ao longo das paredes do canal radicular, intocadas pelos instrumentos de NiTi utilizados (TAŞDEMİR; YILDIRIM; ÇELİK, 2008; SOMMA *et al.*, 2008; SÓ *et al.*, 2012).

A instrumentação ultrassônica, tem sido sugerida na literatura (KRELL; NEO, 1985; STAMOS *et al.*, 1985; STAMOS; STAMOS; PERKINS, 1988), como uma eficiente técnica de retratamento do canal radicular. Essa técnica permite a remoção de materiais de difícil remoção do interior do canal radicular (KRELL; NEO, 1985), sem a necessidade de intervenção cirúrgica. Ladley *et al.* (1991) aplicaram com sucesso as propriedades físicas do ultrassom na desobturação dos canais radiculares associado aos solventes. Como resultado, observaram que esta técnica removeu a maior parte do material obturador de forma rápida, deixando uma quantidade residual mínima de detritos.

Outras vantagens relacionadas ao ultrassom têm sido relatadas na literatura. Dentre elas, destaca-se a capacidade de remoção de tecidos orgânicos, debris e microrganismos dos canais radiculares e áreas anatômicas de difícil acesso, por meio da agitação de substâncias químicas (PLOTINO *et al.*, 2007). A ação dos irrigantes agitados de forma rápida e contínua pelo ultrassom têm o seu potencial de dissolução aumentado por atingirem uma grande parte da superfície dos canais radiculares (VAN DER SLUIS *et al.*, 2007). Recentemente, a agitação ultrassônica do solvente endodôntico Endosolv E, foi estudada e comparada com outras técnicas e substâncias também agitadas. Em todos os terços radiculares avaliados, essa combinação de ultrassom mais solvente se mostrou muito eficaz quando utilizada como técnica de irrigação final, para dissolução dos materiais obturadores remanescentes após a desobturação (MÜLLER *et al.* 2013). Dessa forma, além de apresentar uma boa ação na desobturação do canal radicular, o ultrassom tem como benefício adicional melhorar as propriedades químicas de solventes orgânicos, potencializando sua ação.

Baseado nessas observações, levando-se em conta o solvente como parte importante no processo de desobturação dos canais radiculares, achamos oportuno avaliar, dentre essas substâncias, qual delas reúne as melhores características para um uso clínico, eficaz e seguro.

3 PROPOSIÇÃO

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo do estudo foi avaliar e comparar os solventes endodônticos, Citrol, Eucaliptol, Xilol, d-Limoneno e Endosolv E, em relação às propriedades químicas, biológicas e antimicrobianas, quanto:

- a) A Capacidade de dissolução sobre guta-percha, Resilon e cimentos de resina epóxica, que contem hidróxido de cálcio, a base de óxido de zinco e eugenol, de resina de metacrilato e a base de MTA;
 - b) Ação antimicrobiana sobre biofilme formado *in situ*;
 - c) A Citotoxicidade em cultura de fibroblastos;
 - d) Efeito químico na microdureza da dentina;
 - e) Capacidade de desobturação e limpeza das paredes dos canais radiculares em Micro-CT;
 - f) Influência da agitação ultrassônica do solvente após a desobturação dos canais radiculares e avaliação do seu efeito em Micro-CT.
-
-

4 MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da FOB – USP conforme número CAAE: 43941415.4.00005417 recebendo parecer favorável (Anexo 1). O estudo encontra-se dividido em cinco partes, compostas por testes químicos, antimicrobianos e biológicos.

Os solventes testados no presente trabalho foram: Citrol, d-Limoneno, Eucaliptol, Xilol e Endosolv E (Quadro 1).

Quadro 1 – Grupos Experimentais

Grupo	Solução Solvente	Classificação	Fabricante
1	Citrol	Óleo essencial	Biodinâmica Quím e Farm. Ltda, Ibiporã-PR, Brasil
2	d-Limoneno	Composto orgânico	Paranácitrus, Paranavaí-PR, Brasil
3	Eucaliptol	Óleo essencial	Biodinâmica Quím e Farm. Ltda, Ibiporã-PR, Brasil
4	Xilol	Solvente químico	Química Especializada Erich Ltda. São Paulo-SP, Brasil
5	Endosolv E	Composto químico	Septodont, Saint-Maur-des-Fossés, França

4.1 Análise da Dissolução

4.1.1 Seleção dos materiais:

Foram utilizados os cimentos AH Plus (Dentsply DeTrey, Konstanz, Alemanha), Acroseal (Septodont, Saint-Maur-des-Fossés, França), Endofill e Sealer 26 (Dentsply, Petrópolis, RJ, Brasil), MTA Fillapex (Angelus Londrina, PR, Brasil), RealSeal SE (SybronEndo, Glendora, Ca, Estados Unidos) e como materiais sólidos, cones de Guta-percha (DP) (Dentsply, Petrópolis, RJ, Brasil), cones Resilon (SybronEndo, Glendora, Ca, Estados Unidos) e cones de Guta-percha ProTaper (PT) (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça).

4.1.2 Confeção dos corpos de prova:

Para a determinação da solubilidade foram confeccionados corpos de prova de cada um dos cimentos testados com 1,5 mm de altura e 6 mm de diâmetro e fragmentos de cones de Guta-percha DP, Guta-percha PT e Resilon com 13 mm de comprimento (Fig. 1A e 1B).

Para confecção dos corpos de prova, foram utilizados tubetes de anestésico odontológico vazios. Os tubetes foram fixados e cortados com uma máquina metalográfica de corte ISOMET (LowSpeedSaw, Buehler Ltd, Lake Bluff IL, Estados Unidos). Assim, 60 anéis de vidro com diâmetros internos de 6mm e 1,5 mm de altura foram obtidos (Fig. 1A). Cada anel de vidro foi preenchido totalmente com cada um dos cimentos em teste, devidamente manipulados conforme preconizado pelos fabricantes (n=10). Para o correto preenchimento, os anéis foram colocados sobre placas de vidro protegidas com papel celofane transparente, depois de preenchidos, uma outra placa também protegida foi colocada sobre os anéis e foram armazenados em estufa, onde permaneceram a 37° C e humidade de 100%, por sete dias para garantir a presa de todos os cimentos. No caso do cimento RealSeal SE, após o preenchimento dos anéis de vidro, foi feita a fotopolimerização do cimento antes do acondicionamento na estufa. Após o período de presa total, os espécimes foram retirados dos anéis de vidro e limpos com um pincel fino, para a remoção de partículas soltas, aderidas à sua superfície.

Para a confecção dos corpos de prova de materiais sólidos (n=10), foram utilizados cones de Guta-percha PT, F3. Fragmentos de 13 mm, entre a marcação em azul que indentifica o calibre do cone e a ponta foram obtidos por corte com lamina de bisturi nº 15 (Fig. 1B). Para os corpos de prova dos cones Resilon, foram utilizados, cones #30.06, cortados 13 mm, da mesma forma que o anterior. E por fim, foram utilizados cones de guta-percha DP #60, cortados entre a linha de indicação azul e a ponta do cone totalizando 13 mm de comprimento.

4.1.3 Pesagem dos corpos de prova e avaliação da solubilidade

Os corpos de prova foram pesados em balança analítica, com precisão de até milésimos de grama (AY220, Shimadzu CO, Kyoto, Japão) (Fig. 1C). Cada corpo de prova foi amarrado em uma linha de costura e imerso em um recipiente tampado contendo 10 mL de cada um dos solventes propostos explicitados na Tabela 1, por um período de 2, 5, e 15 min,

cuidando-se para que os corpos de prova ficassem suspensos, não tocando as paredes do recipiente. Decorridos os períodos em teste, os corpos de prova foram removidos dos solventes, imersos em água destilada por 30 min, secos em papel filtro e levados ao desumidificador por 24 horas e, então, novamente pesados.

O valor da solubilidade foi determinado por meio do cálculo da quantidade de cimento e cones de guta-percha PT, DP e Resilon, em peso, que foi perdido durante o período de imersão, isto é, pela diferença de peso do corpo de prova antes e após a imersão em solvente. Realizando a divisão da perda de peso em relação ao peso antes da imersão no solvente, obteve-se a porcentagem de solubilidade.

Figura 1. (A) anél de vidro com diâmetros interno de 6 mm e 1,5 mm de altura, obtido à partir de tubetes de anestésico para a confecção dos corpos de prova e corpo de prova de cimento. (B) Cone de guta-percha PT F3, cortado entre a linha de marcação azul e a ponta totalizando 13 mm. (C) Balança analítica AY220, Shimadzu, utilizada para a pesagem dos corpos de prova.

4.2 Análise da ação antimicrobiana

4.2.1 Obtenção dos Blocos de dentina:

Para a realização deste experimento, foram utilizados blocos de dentina radicular de origem bovina, utilizados como meio formador de biofilme. Para isso, dentes bovinos tiveram suas raízes seccionadas com a ISOMET e foram obtidos 33 blocos com dimensões aproximadas de 2x2mm.

Os blocos cortados foram tratados com hipoclorito de sódio a 1% (Rioquímica Ltda., São José do Rio Preto, SP, Brasil) durante 5 minutos, em seguida com EDTA a 17% (Biodinâmica, Ibiporã, PR, Brasil) por mais 5 minutos, com objetivo de remover resíduos orgânicos e possível presença de raspas de dentina, oriundas do corte para obtenção dos blocos. Para constatar a eficácia da limpeza, três blocos foram aleatoriamente selecionados para a visualização em Microscopia Eletrônica de Varredura (JSMT220A, Jeol, Tóquio, Japão) (Fig. 2B).

Após essa etapa, todos os blocos foram acondicionados em tubos de ensaio fechados com tampa, contendo 5mL de água destilada. Esse conjunto foi esterilizado em autoclave à 121°C.

Figura 2. (A) Microscópio confocal de varredura a laser Leica TCS-SPE utilizado para a análise da viabilidade microbiana em biofilme. (B) Imagem em Microscopia Eletrônica de Varredura de bloco de dentina em aumento de 1000x, demonstrando a eficácia da limpeza, antes da obtenção do biofilme formado *in situ*.

4.2.2 Formação do biofilme oral:

Para a formação do biofilme oral, um voluntário teve seu arco superior moldado, para ser confeccionada uma placa ortodôntica removível tipo Hawley. Nesta placa foram confeccionados 6 nichos (10x6x3mm) dispostos em 2 fileiras. Nesses nichos foram colocados os blocos de dentina bovina, os quais foram mantidos com cera utilidade (Kota Ind. e Com. Ltda., São Paulo, SP, Brasil).

O voluntário utilizou o referido dispositivo intraoral durante 3 dias para possibilitar a formação de biofilme sobre a superfície dos blocos de dentina, sem contudo interromper seus procedimentos de higiene.

4.2.3 Cultura bacteriana e tratamento dos blocos de dentina:

Após o processo de contaminação intraoral, os blocos foram retirados da placa intraoral e colocados em placas de cultura celular de 24 poços (TPP®Zellkulturtestplate 24F, Suíça). Cada bloco foi incubado em meio de cultura de BHI por 48 horas em condições de aerobiose. Após esse período, os blocos foram transferidos para outros poços e lavados com água destilada, para a remoção de biofilme não aderido à estrutura dentinária.

Os blocos de dentina contaminados foram divididos em 5 grupos experimentais mais 1 grupo controle, contendo 5 blocos cada um. Sobre cada um dos blocos contaminados, dispostos individualmente nos poços das placas de cultura, foi aplicado 100 µl de um dos solventes endodônticos propostos a serem analisados conforme Tabela 1. Dessa forma os solventes, bem como a solução controle (soro fisiológico), foram mantidos em contato com os blocos durante 5 minutos. Ao final desse período, os grupos experimentais foram imersos em 1 mL de água destilada estéril por 5 minutos para a remoção do excesso da solução solvente.

4.2.4 Análise microscópica dos espécimes após a exposição ao solvente:

Dentro de uma cabine de fluxo laminar, os blocos de dentina foram lavados com 100 µl de PBS para eliminar resíduos. Cada um dos os blocos foi corado com 50 µl de uma solução de Syto 9/Iodeto de propídio (Live/Dead technique-In Vitro Gen, Eugene, OR, Estados Unidos), durante 10 minutos. O Syto 9 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 com uma fluorescência vermelha ou amarelada.

Após a coloração, os blocos foram avaliadas no Microscópio Confocal de Varredura a Laser (LAS AF, Leica, Mannheim, Alemanha) do Centro Integrado de Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Bauru (Fig. 2A). Cinco pontos contendo maior espessura de biofilme em

cada um dos blocos de dentina foram fotografados na forma de “*stacks*” em um aumento de 40x. As imagens foram feitas a intervalos de 1 μm , desde a parte mais superior do biofilme até 5-7 μm dentro da superfície dentinária. Entre 20 e 30 secções escaneadas a intervalo de 1 μm num formato de 512 x 512 pixels, as imagens foram obtidas e salvas num formato (.lif). Para a obtenção das imagens foi utilizado o *software* Leica Application Suite-Advanced Fluorescence (LAS AF, Leica, Mannheim, Alemanha). Foram analisadas 25 “*stacks*” para cada grupo experimental e controle. Esses arquivos em formato .lif, foram exportados e transformados em arquivos .tiff e analisados utilizando o *software* bioimageL (Universidade de Malmo, Suécia). Esse *software* foi utilizado para calcular em porcentagem a proporção do volume da área colonizada (Biovolume Total). A área colonizada é a área que tem a marcação verde e vermelha simultaneamente em ambos canais do *stack*. Calculou-se, também, o Biovolume de bactérias verdes, o qual corresponde às células viáveis. E por fim, a diferença da porcentagem corresponde ao volume das células vivas (verdes).

4.3 Análise da citotoxicidade

O teste de citotoxicidade dos solventes foi realizado de acordo com as normas da International Standardization Organization ISO 10993-5/2009.

4.3.1 Seleção e cultura celular

Para os ensaios de citotoxicidade, foi utilizada a linhagem celular NIH-3T3 (CRL-1658), imortalizada de fibroblastos murinos (ATCC-American Type Culture Collection, Manassas, VA, Estados Unidos). As culturas celulares foram mantidas em frascos de cultura com 25 cm^2 com meio de cultura de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (GIBCO-BRL), suplementado com soro fetal bovino a 10% e Penicilina/Estreptomicina a 10.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Gibco, USA), na proporção 1 mL do antibiótico para cada 100 mL de meio em pH 7,4. Os frascos foram mantidos a 37°C em atmosfera de 5% CO_2 e 80% de umidade.

As culturas celulares foram plaqueadas em placas de cultura de 96 poços em uma densidade de 3×10^4 células por poço de cultura 24 horas antes da aplicação do tratamento. Para os tratamentos, o meio de cultura foi repostado por um meio de cultura contendo os diferentes solventes testados solubilizados em diferentes concentrações (0%, 0.5%, 1%, 1.5%,

2% e 2.5%). A determinação das concentrações foi estabelecida entre a massa solvente e a massa do meio de cultura (% m/m). As células NIH-3T3 foram mantidas, em condições padrão de cultivo, expostas a este tratamento por um período de 24 horas. Após o período de tratamento, as culturas celulares foram processadas para análise da viabilidade celular pelo método de MTT.

4.3.2 Teste de viabilidade celular

O ensaio de MTT (brometo de 3(4,5 dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio) é um teste colorimétrico que quantifica a redução do reagente MTT em um composto conhecido como formazan pela ação de desidrogenases mitocondriais. A presença de desidrogenases mitocondriais ativas é um indicativo de viabilidade celular. Os cristais do corante roxo formazan formados pela redução do MTT são quantificados por técnicas de espectrofotometria. Para a realização do ensaio, o meio de cultura foi substituído por um meio adicionado com solução estoque de MTT (5 mg/mL) na proporção 20 μ L/180 μ L de meio de cultura. Após 3 horas de incubação com o meio de cultura adicionado com o MTT, este meio foi removido e adicionado 200 μ L de DMSO para a solubilização das estruturas celulares. Após 3 minutos, os cristais de formazan foram dissolvidos e a quantificação deste produto foi realizada por uma leitora de placa, Espectrofotômetro UV-1700 (Shimadzu, Toquio, Japão) em comprimento de onda 600 nm.

Figura 3. (A) Placa de 96 poços contendo fibroblastos em meio de cultura DMEM expostos aos diferentes solventes testados solubilizados em diferentes concentrações, os parênteses indicam o teste feito em triplicatas. (B) Espectrofotômetro UV-1700, Shimadzu, utilizados para a leitura das placas no teste de citotoxicidade.

4.4 Microdureza dentinária

4.4.1 Obtenção dos blocos de dentina:

Para este experimento, foram confeccionados 62 blocos de dentina (4x4x2,5mm) a partir de incisivos inferiores bovinos com as raízes completamente formadas. Os dentes foram seccionados 10 mm abaixo da linha amelo-cementária e 3 mm a partir do ápice radicular. A partir dessa porção radicular mediana restante, foram obtidos os blocos de dentina com o auxílio da máquina metalográfica de corte ISOMET. Após cortados, os blocos foram fixados em placas de PVC com resina acrílica autopolimerizável (Vipi, Pirassununga, SP, Brasil) e lixados com lixas de carvão de silício de granulações números 400, 600, e 1200 (3M, Sumaré, SP, Brasil), em uma Politriz Metalográfica (APL 4, Arotec, Cotia, SP, Brasil). Em seguida, foram polidos com discos de feltro e suspensão de alumina para metalografia, com partículas de tamanhos de 0,3 µm e, depois, 0,05µm (Arotec, Cotia, SP, Brasil).

Os corpos de prova foram lavados em um aparelho de ultrassom T7 Thornton (Unique, São Paulo, SP, Brasil) por 5 minutos para a remoção dos resíduos de carvão de silício e alumina, e em seguida, foram estocados com uma gaze embebida em água destilada sobrepondo as amostras, em estufa a 37°C e umidade 100%.

4.4.2 Teste de microdureza

As amostras foram divididas aleatoriamente em 5 grupos (n=10), mais um grupo controle positivo e um negativo contendo 6 amostras cada. A microdureza *Knoop* inicial da dentina radicular foi avaliada por meio de um microdurômetro Buehler KV 400 (Buehler, Lake Bluff, IL, Estados Unidos), do Laboratório de Bioquímica do departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Odontologia de Bauru (Fig. 4A).

Cada indentação foi feita com carga de 10 gramas por 15 segundos, realizada no centro dos fragmentos de dentina (Fig. 4C). Seis indentações em cada um dos períodos foram realizadas, espaçadas paralelamente em 200 µm entre si, verticalmente e 100 µm horizontalmente, indicadas pelas setas amarelas (Fig. 4D). Para as medições de microdureza foi utilizado o software Buehler Omnimet 9.5 (Buehler, Lake Bluff, IL, Estados Unidos). A média dos seis valores obtidos foi registrada em KHN (*Knoop Hardness Number*). A Figura 4B ilustra o aspecto de losango de uma das indentações observada em aumento de 50X. Para

medir as indentações, uma marca no formato de “+” foi posicionada ao centro do losango. O *software* automaticamente registrou, a partir desta marcação central, o valor compreendido entre duas linha paralelas que sobrepunham aos vértices agudos do losango.

Figura 4. (A) Microdurômetro Buehler KV 400 utilizado para os testes de microdureza. (B) Imagem Microscópica num aumento de 50x do aspecto de losango de uma das indentações. Posicionamento do “+” e linhas paralelas sobrepondo os vértices agudos do losango, o que determinou os valores em KHN. (C) Indentação (*Knoop*) no centro do bloco de dentina. (D) Imagem microscópica num aumento de 10x das indentações indicadas com setas amarelas. As seis indentações realizadas em cada período do experimento espaçadas paralelamente em 200 μm entre si, verticalmente e 100 μm horizontalmente.

4.4.3 Tratamento dos blocos de dentina com os solventes

Após o registro dos valores de microdureza inicial de cada corpo de prova, estes foram submetidos ao tratamento com as soluções solventes, em teste (Tabela 1), além disso foram incluídos os grupos controle positivo (Ácido fosfórico 37%) e negativo (Solução fisiológica).

Sobre cada corpo de prova foi aplicado 50 μl de cada uma das soluções solventes, ou soluções controles por um período de 5 minutos, após o qual foram lavados com água destilada por 20 minutos e secos com papel absorvente. Novamente foi aferida a microdureza dentinária e na sequência, uma nova aplicação de 50 μl das soluções solventes e soluções controle sobre as amostras foi realizada, agora por um período de 15 minutos. Por fim, os valores de microdureza foram novamente registrados, sempre considerando a média dos valores de 6 indentações para cada amostra em cada período analisado.

4.5 Capacidade de desobturação e limpeza dos canais radiculares

4.5.1 Seleção, preparo e obturação dos canais radiculares

Foram utilizados no presente trabalho 60 dentes uniradiculados, incisivos centrais superiores de humanos com raízes retilíneas e presença de um único canal. Os dentes tinham entre 20 e 22 mm de comprimento. Para o acesso às câmaras pulpares foi utilizado ponta diamantada 1014 (Kg Sorensen, Cotia, SP, Brasil), em alta rotação e para a remoção do teto e cornos pulpares uma ponta diamantada 3082 (Kg Sorensen, Cotia, SP, Brasil).

Após à abertura coronária, com auxílio de uma lima tipo K #15 (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça) foi feita a exploração dos canais radiculares e a determinação do comprimento real de cada dente (CRD), com auxílio de um microscópio para a verificação da ponta do instrumento através do forame apical.

Concluída a determinação do comprimento de cada dente, foi estipulado o comprimento de trabalho, sendo este 1 mm a menos do CRD.

O preparo biomecânico foi realizado empregando-se os instrumentos ProTaper Universal (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça) e LaAxxess (SybronEndo, Glendora, Ca, USA) conforme a seguinte sequência:

Inicialmente o preparo cervical foi realizado com os instrumento SX e LaAxxess 36/.06 e, em seguida, a sequência dos instrumentos S1, S2, F1, F2, F3 no comprimento real de trabalho. Durante todo preparo biomecânico, a cada troca de instrumento, o canal radicular foi irrigado com 3 mL de NaOCl a 1% (Farmácia Epecífica, Bauru, SP, Brasil). A irrigação final foi realizada com 5 mL de solução de EDTA a 17% (Biodinâmica Quím e Farm. Ltda, Ibioporã, Pr, Brasil), por 3 minutos, seguido de irrigação com hipoclorito de sódio a 1%, agitado com uma lima tipo K #15 posicionada a 2 mm do comprimento de trabalho acoplada ao ultrassom Jet Sonic (Gnatus, Ribeirão Preto, SP, Brasil), na potência 2 durante 1 minuto, com intervalo de 20 segundos e renovação da solução entre um intervalo e outro.

Após o preparo biomecânico dos canais radiculares, foi realizada a obturação com cones de guta-percha #30 convencional e cimento Endofill (Dentsply, Petrópolis, RJ, Brasil) pela técnica híbrida de Tagger. Em cada dente, após o assentamento do cone principal com o cimento, foram inseridos 4 cones acessórios B7 (Tanari, Manacapuru, AM, Brasil), pela

técnica da condensação lateral e realizada a termoplastificação dos terços médio e cervical empregando um Gutta-condensor número #50 (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça) em baixa rotação. Após a obturação, o excesso de material foi cortado e as coroas foram limpas e seladas com cotosol. Os dentes foram então numerados e armazenados a 37⁰C e umidade de 100% durante 7 dias.

4.5.2 Escaneamento no Micro-CT

Após 7 dias, os 60 dentes obturados foram escaneados individualmente num microtomógrafo-computadorizado, Aparelho de micro-CT (Skyscan 1076, Skyscan, Kontich, Bélgica) Laboratório de Nanobiotecnologia do Departamento de Morfologia e Genética do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (Fig. 5A). Como parâmetro de aquisição foram utilizados 100 kV, 100 μ A, filtro de alumínio com espessura de 1mm, resolução dos pixels da câmera de 12.56 μ m, tamanho do voxel de 9 μ m, intervalo de rotação de 0.3 graus e 180 graus de rotação. Cada aquisição resultou em 2.505 imagens as quais foram reconstruídas por meio do *software* NRecon (Skyscan, Aartselaar, Bélgica). Todos os parâmetros de aquisição e reconstrução encontram-se nos anexos 2 e 3. As obturações e presença de material obturador remanescente após a desobturação e ultrassonergização, foram avaliadas volumetricamente com o software CTAnalyser (CTan, Skyscan, Aartselaar, Bélgica) (Fig. 5B).

Figura 5. (A) Aparelho de micro-CT Skyscan 1076 utilizado para o escaneamentos das amostras. (B) Software CTan, utilizado para análise do volume das obturações e presença de material remanescente após a desobturação e agitação ultrassônica associados aos solventes endodônticos.

4.5.3 Desobturação dos Canais Radiculares

A técnica de desobturação para todos os grupos (n=10), foi feita empregando os sistemas ProTaper Retratamento e ProTaper Universal (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça), associados a um dos solventes conforme Tabela 1, mais um grupo controle, obedecendo a seguinte sequência: Os canais foram desobturados em uma sequência “crown-down” usando instrumento ProTaper D1 para remover o material obturador a partir da porção cervical do canal radicular, enquanto que os terços médio e apical foram desobturados com instrumentos ProTaper D2 e D3, respectivamente, usando ação de instrumentação, com pressão de movimentos, lateral até o instrumento D3 atingir o comprimento de trabalho. Ainda no comprimento de trabalho foram empregados os instrumentos ProTaper F2 e F3. Para todos os instrumentos, foi utilizada a velocidade constante de 500 rpm sem controle de torque. No início da desobturação e a cada troca de instrumento foi colocado 0,5 mL do solvente de acordo com o grupo, sendo que antes da colocação do solvente foi realizada a irrigação com hipoclorito de sódio a 1% e aspiração para a remoção do material dissolvido anteriormente. No grupo controle, foi utilizado 0,5 mL de soro fisiológico sendo que antes, foi realizada a irrigação com hipoclorito de sódio a 1% e aspiração, para a remoção do material removido pelo desgaste anteriormente do interior dos canais radiculares. Após esta etapa, um novo escaneamento no micro-CT foi realizado.

4.5.4 Agitação ultrassônica dos solventes e limpeza dos canais radiculares

Para esse teste, foram utilizadas as mesmas amostras do teste de desobturação. Os canais radiculares dos dentes de cada um dos grupos foi preenchido com 0,5 mL da mesma solução solvente utilizada na desobturação. No grupo controle, 0,5 mL de soro fisiológico foi utilizado. Após o preenchimento, as soluções foram ultrassonoenergizadas, por um espaçador digital A (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça) acoplado com um inserto ao ultrassom Jet Sonic. Esse espaçador foi aplicado 2 mm aquém do comprimento de trabalho e agitado nos sentidos Mesio-distal e Vestibulo-lingual, na potência 2 durante 1 minuto, com intervalos de 20 segundos. Nova irrigação foi realizada com hipoclorito de sódio a 1% e aspiração, para a remoção do material remanescente dissolvido. Por fim, um novo escaneamento no micro-CT foi realizado utilizando os mesmos parâmetros de escaneamento e reconstrução utilizados no teste de desobturação (anexos 2 e 3). O volume de material obturador remanescente após a ultrassonoenergização, foi comparado com os volumes das obturações iniciais e após desobturação.

4.6 Análise estatística

Os dados obtidos pelas diferentes avaliações foram submetidos aos testes de D'Agostino-Pearson para a verificação e distribuição de normalidade. Os que se apresentaram dentro da normalidade em três ou mais variáveis, a comparação entre os grupos foi realizada pelo teste Two-Way ANOVA para comparação global e o teste de Tukey para as comparações individuais. Nos testes em que os dados não passaram pelo pela normalidade foi empregado o teste de Kruskal-Wallis para a comparação global e o teste de Dunn para as comparações individuais.

Em cada um dos testes, foi considerado o nível de significância de 5%. Para a realização dos testes estatísticos foi utilizado o *software* GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, San Diego, Estados Unidos).

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Dissolução dos materiais obturadores

Os resultados da dissolução dos cimentos e cones estão demonstrados nas tabelas 2 a 10. A tabela 2 contém os valores da mediana, mínimo e máximo dos valores em (g), após a ação dos solventes testados na solubilização do cimento AH Plus, nos diferentes tempos analisados.

Tabela 2 – Mediana, valores mínimo e máximo em (g) de solubilização do cimento AH Plus nos diferentes solventes nos períodos analisados Inicial, 2, 5 e 15 minutos. Letras minúsculas diferentes indicam significância entre os períodos analisados ($P < 0.05$). Letras maiúsculas diferentes, indicam significância entre os solventes ($P < 0.05$).

	Inicial	2 min	5 min	15 min
Citrol	0,085 (0,060-0,097) ^{aA}	0,081 (0,059-0,095) ^{aA}	0,081 (0,059-0,095) ^{aA}	0,081 (0,059-0,095) ^{aA}
d-Limoneno	0,074 (0,054-0,100) ^{aA}	0,059 (0,042-0,084) ^{aA}	0,052 (0,042-0,080) ^{aA}	0,042 (0,037-0,071) ^{aA}
Eucaliptol	0,094 (0,078-0,099) ^{aA}	0,075 (0,070-0,080) ^{aA}	0,070 (0,049-0,089) ^{aA}	0,059 (0,039-0,064) ^{aA}
Xilol	0,080 (0,071-0,092) ^{aA}	0,066 (0,056-0,081) ^{aA}	0,048 (0,040-0,062) ^{aA}	0,025 (0,012-0,053) ^{bB}
Endosolv E	0,083 (0,062-0,097) ^{aA}	0,055 (0,043-0,079) ^{aA}	0,048 (0,037-0,072) ^{aA}	0,030 (0,009-0,055) ^{bB}

Na comparação entre os períodos, inicial, 2 e 5 minutos não houve diferença estatisticamente significativa, para nenhum dos solventes testados ($P > 0,05$). Quando comparados os demais períodos com o período de 15 minutos, o Eucaliptol, d-Limoneno e Citrol não apresentaram diferenças estatisticamente significantes ($P > 0,05$). Ainda, para o período de 15 minutos, foi observada diferença estatisticamente significantes para o Xilol e o Endosolv E quando comparados com os períodos inicial, 2 e 5 minutos ($P < 0,05$). O Citrol, foi o solvente que apresentou a menor ação em todos os períodos.

Na comparação entre os solventes, não foi observado diferenças estatísticas significantes nos períodos inicial ($P > 0,05$). No período de 2 min o Endosolv e o d-Limoneno foram os que mais dissolveram, seguidos do xilol, eucaliptol e por fim o Citrol, não havendo diferenças estatísticas significantes entre nenhum deles ($P > 0,05$). No período de 5 minutos o Xilol e o Endosolv E foram os que apresentaram os menores valores, seguidos do d-Limoneno, Eucaliptol e Citrol, também não havendo diferenças estatísticas significantes entre eles ($P > 0,05$). No o período de 15 minutos, o Xilol e Endosolv E, tiveram ação solvente

estatisticamente significativa maior que o Eucaliptol e Citrol ($P < 0,05$). Sendo que, o que mais dissolveu o AH Plus, foi Xilol seguido do Endosolv E e d-Limoneno, não havendo diferença estatística significativa entre eles ($P > 0,05$).

A tabela 3 apresenta os valores da mediana, mínimo e máximo dos valores em (g), após a ação dos solventes testados na solubilização do cimento Acroseal, nos diferentes tempos analisados.

Tabela 3 – Mediana, valores mínimo e máximo em (g) de solubilização do cimento Acroseal nos diferentes solventes nos períodos analisados Inicial, 2, 5 e 15 minutos. Letras minúsculas diferentes indicam significância entre os períodos analisados ($P < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes, indicam significância entre os solventes ($P < 0,05$).

	Inicial	2 min	5 min	15 min
Citrol	0,064 (0,040-0,099) ^{aA}	0,061 (0,037-0,099) ^{aA}	0,060 (0,036-0,096) ^{aA}	0,059 (0,036-0,096) ^{aA}
d-Limoneno	0,064 (0,043-0,080) ^{aA}	0,064 (0,043-0,080) ^{aA}	0,063 (0,040-0,080) ^{aA}	0,063 (0,040-0,080) ^{aA}
Eucaliptol	0,065 (0,036-0,100) ^{aA}	0,065 (0,036-0,100) ^{aA}	0,062 (0,033-0,097) ^{aA}	0,061 (0,032-0,097) ^{aA}
Xilol	0,072 (0,050-0,095) ^{aA}	0,071 (0,050-0,095) ^{aA}	0,069 (0,049-0,093) ^{aA}	0,069 (0,049-0,092) ^{aA}
Endosolv E	0,062 (0,036-0,081) ^{aA}	0,061 (0,036-0,080) ^{aA}	0,060 (0,035-0,080) ^{aA}	0,060 (0,035-0,078) ^{aA}

Na comparação da solubilização do cimento Acroseal, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre nenhum dos períodos para nenhum dos solventes ($P > 0,05$). Todos os solventes apresentaram baixa dissolução do cimento Acroseal e agiram de forma similar. Também não foi observada diferenças estatisticamente significantes entre nenhum dos solventes em nenhum dos períodos ($P > 0,05$).

A tabela 4 demonstra os valores da mediana, mínimo e máximo dos valores em (g), após a ação dos solventes testados na solubilização do cimento Sealer 26, nos diferentes tempos analisados.

Tabela 4 – Mediana, valores mínimo e máximo em (g) de solubilização do cimento Sealer 26 nos diferentes solventes nos períodos analisados Inicial, 2, 5 e 15 minutos. Letras minúsculas diferentes indicam significância entre os períodos analisados ($P < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes, indicam significância entre os solventes ($P < 0,05$).

	Inicial	2 min	5 min	15 min
Citrol	0,053 (0,041-0,070) ^{aA}	0,053 (0,041-0,070) ^{aA}	0,051 (0,041-0,069) ^{aA}	0,051 (0,040-0,068) ^{aA}
d-Limoneno	0,060 (0,036-0,094) ^{aA}	0,060 (0,035-0,092) ^{aA}	0,058 (0,032-0,092) ^{aA}	0,058 (0,032-0,091) ^{aA}
Eucaliptol	0,048 (0,025-0,064) ^{aA}	0,048 (0,025-0,064) ^{aA}	0,046 (0,024-0,063) ^{aA}	0,046 (0,024-0,062) ^{aA}
Xilol	0,050 (0,041-0,082) ^{aA}	0,049 (0,041-0,081) ^{aA}	0,049 (0,041-0,081) ^{aA}	0,048 (0,041-0,080) ^{aA}
Endosolv E	0,057 (0,042-0,095) ^{aA}	0,056 (0,041-0,095) ^{aA}	0,056 (0,041-0,094) ^{aA}	0,055 (0,040-0,094) ^{aA}

Para o cimento Sealer 26, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre nenhum dos períodos para nenhum dos solventes ($P>0,05$). Na comparação entre o período inicial e 2 min os solventes que tiveram melhor ação foram o Xilol e o Endosolv E. Entre 2 e 5 min, o Citrol, d-Limoneno e Eucaliptol dissolveram o Sealer 26, já o Xilol e o Endosolv E não. Na comparação entre o período de 5 e 15 min os solventes que tiveram melhor ação foram o Xilol e o Endosolv E. Na comparação entre os solventes, todos apresentaram baixa dissolução do cimento Sealer 26, agindo de forma similar e não apresentando diferenças estatisticamente significantes entre eles em nenhum dos períodos ($P>0,05$).

A tabela 5 apresenta os valores da mediana, mínimo e máximo dos valores em (g), após a ação dos solventes testados na solubilização do cimento Endofill, nos diferentes tempos analisados

Tabela 5 – Mediana, valores mínimo e máximo em (g) de solubilização do cimento Endofill nos diferentes solventes nos períodos analisados Inicial, 2, 5 e 15 minutos. Letras minúsculas diferentes indicam significância entre os períodos analisados ($P<0,05$). Letras maiúsculas diferentes, indicam significância entre os solventes ($P<0,05$).

	Inicial	2 min	5 min	15 min
Citrol	0,082 (0,068-0,099) ^{aA}	0,081 (0,067-0,095) ^{aA}	0,080 (0,065-0,093) ^{aA}	0,063 (0,049-0,063) ^{aA}
d-Limoneno	0,077 (0,046-0,089) ^{aA}	0,074 (0,044-0,089) ^{aA}	0,071 (0,036-0,082) ^{aA}	0,066 (0,032-0,081) ^{aA}
Eucaliptol	0,085 (0,056-0,096) ^{aA}	0,082 (0,055-0,090) ^{aA}	0,081 (0,054-0,089) ^{aA}	0,077 (0,053-0,084) ^{aA}
Xilol	0,090 (0,055-0,100) ^{aA}	0,070 (0,054-0,099) ^{aA}	0,063 (0,034-0,095) ^{aA}	0,036 (0,018-0,062) ^{bB}
Endosolv E	0,057 (0,050-0,108) ^{aA}	0,055 (0,045-0,106) ^{aA}	0,050 (0,028-0,086) ^{aA}	0,019 (0,008-0,030) ^{bB}

Conforme a tabela 5, na comparação entre os períodos Inicial e 2 min, o Xilol foi o que mais dissolveu o Endofill, seguido do Eucaliptol e d-Limoneno não havendo diferenças estatísticas significantes entre eles e os demais solventes ($P>0,05$). Entre os períodos de 2 e 5 min, o Xilol também foi o que melhor se apresentou, seguido do Endosolv E e do d-Limoneno não havendo diferenças estatísticas significantes entre eles e os demais solventes ($P>0,05$). Entre os períodos de 5 e 15 min, o Endosolv E foi o que mais dissolveu o cimento seguido do Xilol, sendo em ambas as comparações estatisticamente significantes ($P<0,05$), os demais solventes não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre esses períodos ($P>0,05$). Entre os períodos inicial e 15 min, somente o Xilol e o Endosolv E, dissolveram o Endofill de forma estatisticamente significantes ($P<0,05$).

Na comparação entre os solventes, somente foi observada diferenças estatisticamente significantes no período de 15 minutos, entre os solventes Xilol e Endosolv E com o Citrol, Eucaliptol e d-Limoneno ($P < 0,05$), não havendo diferença estatisticamente significativa entre os dois primeiros ($P > 0,05$).

A tabela 6 contém os valores da mediana, mínimo e máximo dos valores em (g), após a ação dos solventes testados na solubilização do cimento MTA Fillapex, nos diferentes períodos analisados.

Tabela 6 – Mediana, valores mínimo e máximo em (g) de solubilização do cimento MTA Fillapex nos diferentes solventes nos períodos analisados Inicial, 2, 5 e 15 minutos. Letras minúsculas diferentes indicam significância entre os períodos analisados ($P < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes, indicam significância entre os solventes ($P < 0,05$).

	Inicial	2 min	5 min	15 min
Citrol	0,079 (0,050-0,110) ^{aA}	0,074 (0,046-0,105) ^{aA}	0,070 (0,043-0,101) ^{aA}	0,068 (0,041-0,098) ^{aA}
d-Limoneno	0,071 (0,042-0,100) ^{aA}	0,059 (0,041-0,099) ^{aA}	0,053 (0,035-0,096) ^{aA}	0,041 (0,028-0,091) ^{aA}
Eucaliptol	0,081 (0,051-0,105) ^{aA}	0,080 (0,047-0,104) ^{aA}	0,074 (0,039-0,103) ^{aA}	0,071 (0,028-0,100) ^{aA}
Xilol	0,071 (0,033-0,099) ^{aA}	0,069 (0,025-0,097) ^{aA}	0,064 (0,022-0,093) ^{aA}	0,061 (0,018-0,090) ^{aA}
Endosolv E	0,075 (0,061-0,092) ^{aA}	0,068 (0,049-0,083) ^{aA}	0,060 (0,032-0,076) ^{aA}	0,054 (0,027-0,072) ^{aA}

Letras minúsculas diferentes indicam significância entre os períodos analisados ($P < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes, indicam significância entre os solventes ($P < 0,05$).

Na comparação entre os períodos, em que foram observadas a dissolução cimento MTA Fillapex não foi houve diferenças estatisticamente significantes para nenhum dos solventes, em nenhum dos períodos analisados ($P > 0,05$).

Entre os solventes, no período de 2 minutos o d-Limoneno foi o que apresentou maior dissolução ao cimento MTA Fillapex, seguidos do Endosolv E e do Citrol, não havendo diferenças estatísticas significantes entre nenhum deles, tão pouco com os demais solventes testados ($P > 0,05$). Nos períodos de 5 minutos, o solvente que apresentou melhor ação foi Endosolv E e nos 15 minutos o d-Limoneno não apresentando diferenças estatisticamente significantes com nenhum dos demais solventes analisados ($P > 0,05$).

A tabela 7 apresenta os valores da mediana, mínimo e máximo dos valores em (g), após a ação dos solventes testados na solubilização do cimento RealSeal SE, nos diferentes períodos analisados.

Tabela 7 – Mediana, valores mínimo e máximo em (g) de solubilização do cimento RealSeal SE nos diferentes solventes nos períodos analisados Inicial, 2, 5 e 15 minutos. Letras minúsculas diferentes indicam significância entre os períodos analisados ($P < 0.05$). Letras maiúsculas diferentes, indicam significância entre os solventes ($P < 0.05$).

	Inicial	2 min	5 min	15 min
Citrol	0,078 (0,057-0,097) ^{aA}	0,078 (0,056-0,097) ^{aA}	0,078 (0,056-0,097) ^{aA}	0,077 (0,055-0,097) ^{aA}
d-Limoneno	0,077 (0,060-0,094) ^{aA}	0,075 (0,059-0,091) ^{aA}	0,075 (0,058-0,091) ^{aA}	0,073 (0,058-0,089) ^{aA}
Eucaliptol	0,079 (0,044-0,093) ^{aA}	0,077 (0,043-0,089) ^{aA}	0,077 (0,042-0,089) ^{aA}	0,076 (0,042-0,088) ^{aA}
Xilol	0,080 (0,046-0,096) ^{aA}	0,079 (0,046-0,096) ^{aA}	0,079 (0,045-0,095) ^{aA}	0,078 (0,045-0,094) ^{aA}
Endosolv E	0,084 (0,050-0,099) ^{aA}	0,081 (0,049-0,098) ^{aA}	0,081 (0,049-0,098) ^{aA}	0,079 (0,048-0,097) ^{aA}

Conforme a tabela 7, foi observada uma baixa capacidade, por todos os solventes em dissolver cimento Realseal SE. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre nenhum dos períodos por nenhum dos solventes ($P > 0,05$). Todos os solventes agiram de forma similar na comparação entre os períodos não sendo observadas diferenças estatísticas significantes entre nenhum deles ($P > 0,05$).

A tabela 8 demonstra os valores da mediana, mínimo e máximo dos valores em (g), após a ação dos solventes testados na solubilização dos cones PT, nos diferentes períodos analisados.

Tabela 8 – Mediana, valores mínimo e máximo em (g) de solubilização do cone de guta-percha PT nos diferentes solventes nos períodos analisados Inicial, 2, 5 e 15 minutos. Letras minúsculas diferentes indicam significância entre os períodos analisados ($P < 0.05$). Letras maiúsculas diferentes, indicam significância entre os solventes ($P < 0.05$).

	Inicial	2 min	5 min	15 min
Citrol	0,034 (0,034-0,040) ^{aA}	0,034 (0,033-0,039) ^{aA}	0,034 (0,033-0,039) ^{aA}	0,034 (0,033-0,039) ^{aA}
d-Limoneno	0,034 (0,030-0,039) ^{aA}	0,033 (0,029-0,038) ^{aA}	0,032 (0,029-0,038) ^{aA}	0,032 (0,028-0,038) ^{aA}
Eucaliptol	0,038 (0,034-0,043) ^{aA}	0,038 (0,034-0,042) ^{aA}	0,038 (0,034-0,042) ^{aA}	0,037 (0,032-0,037) ^{aA}
Xilol	0,033 (0,031-0,041) ^{aA}	0,033 (0,030-0,039) ^{aA}	0,031 (0,030-0,036) ^{aA}	0,031 (0,029-0,034) ^{aA}
Endosolv E	0,039 (0,033-0,044) ^{aA}	0,037 (0,031-0,040) ^{aA}	0,033 (0,029-0,037) ^{aA}	0,027 (0,025-0,030) ^{aA}

Todos os solvente testados apresentaram uma baixa capacidade em dissolver os cones de guta-percha PT. Estatisticamente, o Citrol não apresentou nenhuma ação sobre os cones PT em nenhum dos períodos analisados ($P > 0,05$). O d-Limoneno, Eucaliptol e o Xilol apresentaram alguma ação solvente nos cones PT, porém foram muito pequenas. O Endosolv E, foi o que apresentou a maior solubilidade dos cone PT, em todos os períodos analisados,

porém não apresentou diferenças estatisticamente significantes em comparação com os demais solventes ($P>0,05$). O período onde o Endosolv E apresentou maior ação solvente foi aos 15 min.

A tabela 9 contém os valores da mediana, mínimo e máximo dos valores em (g), após a ação dos solventes testados na solubilização dos cones Resilon, nos diferentes períodos analisados.

Tabela 9 – Mediana, valores mínimo e máximo em (g) de solubilização do cone Resilon nos diferentes solventes nos períodos analisados Inicial, 2, 5 e 15 minutos. Letras minúsculas diferentes indicam significância entre os períodos analisados ($P<0,05$). Letras maiúsculas diferentes, indicam significância entre os solventes ($P<0,05$).

	Inicial	2 min	5 min	15 min
Citrol	0,030 (0,030-0,031) ^{aA}	0,030 (0,030-0,031) ^{aA}	0,030 (0,029-0,031) ^{aA}	0,030 (0,028-0,030) ^{aA}
d-Limoneno	0,031 (0,028-0,032) ^{aA}	0,030 (0,028-0,032) ^{aA}	0,030 (0,028-0,032) ^{aA}	0,030 (0,023-0,032) ^{aA}
Eucaliptol	0,030 (0,028-0,031) ^{aA}	0,029 (0,028-0,031) ^{aA}	0,029 (0,028-0,031) ^{aA}	0,028 (0,028-0,031) ^{aA}
Xilol	0,030 (0,030-0,032) ^{aA}	0,030 (0,029-0,032) ^{aA}	0,030 (0,029-0,032) ^{aA}	0,030 (0,029-0,032) ^{aA}
Endosolv E	0,030 (0,029-0,032) ^{aA}	0,030 (0,029-0,032) ^{aA}	0,030 (0,029-0,032) ^{aA}	0,029 (0,028-0,031) ^{aA}

Todos os solventes testados apresentaram uma baixa capacidade em dissolver os cones Resilon. Estatisticamente e numericamente, o Citrol e o Xilol não apresentaram nenhuma ação sobre os cones Resilon em nenhum dos períodos analisados ($P>0,05$). O d-Limoneno, Eucaliptol e o Endosolv E, apresentaram alguma ação solvente nos cones Resilon, porém foram muito pequenas. O d-Limoneno somente apresentou ação entre o período inicial e 2 min, não ocorrendo nos demais períodos. O Eucaliptol apresentou ação solvente entre os períodos inicial e 2 min e entre os períodos de 5 e 15 min. E o Endosolv E, apresentou ação somente aos 15 min. Não foram observadas diferenças estatísticas significantes, entre os períodos nem entre os solventes ($P>0,05$).

A tabela 10 apresenta os valores da mediana, mínimo e máximo em (g), após a ação dos solventes testados na solubilização dos cones de guta-percha DP, nos diferentes períodos analisados.

Tabela 10 – Mediana, valores mínimo e máximo em (g) de solubilização do cone de guta-percha DP nos diferentes solventes nos períodos analisados Inicial, 2, 5 e 15 minutos. Letras minúsculas diferentes indicam significância entre os períodos analisados ($P < 0.05$). Letras maiúsculas diferentes, indicam significância entre os solventes ($P < 0.05$).

	Inicial	2 min	5 min	15 min
Citrol	0,032 (0,029-0,033) ^{aA}	0,032 (0,029-0,033) ^{aA}	0,032 (0,029-0,032) ^{aA}	0,031 (0,029-0,032) ^{aA}
d-Limoneno	0,031 (0,028-0,032) ^{aA}	0,031 (0,028-0,032) ^{aA}	0,031 (0,028-0,032) ^{aA}	0,030 (0,028-0,032) ^{aA}
Eucaliptol	0,031 (0,029-0,033) ^{aA}	0,030 (0,029-0,033) ^{aA}	0,030 (0,028-0,032) ^{aA}	0,030 (0,028-0,032) ^{aA}
Xilol	0,032 (0,028-0,034) ^{aA}	0,030 (0,026-0,032) ^{aA}	0,029 (0,022-0,032) ^{aA}	0,028 (0,022-0,031) ^{aA}
Endosolv E	0,032 (0,028-0,037) ^{aA}	0,030 (0,026-0,035) ^{aA}	0,020 (0,011-0,032) ^{aA}	0,007 (0-0,013) ^{bB}

Letras minúsculas diferentes indicam significância entre os períodos analisados ($P < 0.05$). Letras maiúsculas diferentes, indicam significância entre os solventes ($P < 0.05$).

Entre os períodos, de forma geral, os solventes apresentaram baixa ação solvente nos cones de guta-percha DP. A exceção foi o solvente Endosolv E, que apresentou ação estatisticamente significativa maior na dissolução dos cones DP quando comparados o período de 15 min com os demais períodos ($P < 0,05$), não ocorrendo diferenças estatisticamente significantes entre os períodos inicial, 2 e 5 min. Os demais solventes, não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre nenhum os períodos avaliados ($P > 0,05$).

Na comparação entre os solventes, o Eucaliptol, Xilol e Endosolv E, apresentaram uma ação melhor que o Citrol e d-Limoneno, no período de 2 min, porém não foi estatisticamente significativa ($P > 0,05$). No período de 5 min, o solvente que apresentou melhor ação foi o Endosolv E, seguido do Xilol, porém não houve diferença estatisticamente significativa entre esses dois e os demais solventes nesse período ($P > 0,05$). O Endosolv E foi o solvente que dissolveu mais a guta-percha DP no período de 15 min e sua ação foi estatisticamente significativa maior quando comparado com todos os outros solventes testados ($P < 0,05$). Entre os demais solventes não houve diferença estatisticamente significativa no período de 15 min ($P > 0,05$).

5.2 Ação antimicrobiana dos solventes**Tabela 11** – Mediana, média, valores mínimo e máximo dos resultados do biovolume total, biovolume de células vivas (μm^3) e porcentagem de células vivas após a exposição aos solventes endodônticos e grupo controle. * Letras minúsculas diferentes indicam significância entre os solventes analisados ($P < 0.05$).

Biovolume Total (μm^3)	Citrol	d-Limoneno	Eucaliptol	Xilol	Endosolv E	Solução Fisiológica
Mediana	$1,56 \times 10^6$	$1,09 \times 10^6$	$1,44 \times 10^6$	$1,05 \times 10^6$	$0,94 \times 10^5$	$1,81 \times 10^6$
Média	$1,64 \times 10^6$	$1,15 \times 10^6$	$1,78 \times 10^6$	$1,28 \times 10^6$	$1,10 \times 10^6$	$1,68 \times 10^6$
Min-Max	$(4,79 \times 10^5 - 3,65 \times 10^6)$	$(2,41 \times 10^5 - 2,82 \times 10^6)$	$(6,07 \times 10^6 - 3,05 \times 10^6)$	$(2,79 \times 10^6 - 2,84 \times 10^6)$	$(2,50 \times 10^6 - 3,23 \times 10^6)$	$(4,25 \times 10^6 - 3,70 \times 10^6)$
Biovolume						
Células						
Vivas (μm^3)						
Mediana*	$1,03 \times 10^{6a}$	$4,24 \times 10^{5b}$	$3,84 \times 10^{5b}$	$2,15 \times 10^{5b}$	$3,37 \times 10^{5b}$	$1,42 \times 10^{6a}$
Média	$1,22 \times 10^6$	$4,48 \times 10^5$	$5,40 \times 10^5$	$4,25 \times 10^5$	$4,84 \times 10^5$	$1,37 \times 10^6$
Min-Max	$(1,78 \times 10^5 - 3,30 \times 10^6)$	$(0,22 \times 10^4 - 2,12 \times 10^6)$	$(1,28 \times 10^2 - 1,89 \times 10^6)$	$(4,02 \times 10^3 - 1,43 \times 10^6)$	$(0,57 \times 10^2 - 1,41 \times 10^6)$	$(1,79 \times 10^5 - 3,64 \times 10^6)$
Porcentagem						
Células						
Vivas (%)						
Mediana*	57,75 ^{ac}	30,72 ^{ab}	26,95 ^b	18,50 ^b	28,96 ^{ab}	83,37 ^c
Média	52,64	35,83	27,40	19,29	30,17	78,68
Min-Max	9,24-90,89	6,28-75,17	0,16-62,01	3,16-55,06	0,21-68,22	55,48-98,90

O total de 150 campos microscópicos foram analisados (25 para cada solvente incluindo o controle). A mediana, média, valores mínimo e máximo do biovolume total, biovolume das células vivas expressado em μm^3 estão apresentados na Tabela 11. Com relação ao biovolume total, não foram encontradas diferenças estatísticas entre nenhum dos grupos, incluindo o grupo controle, caracterizando um biovolume inicial similar de todas as amostras ($P > 0.05$). Com relação ao biovolume de células vivas, quando comparados o Citrol e a Solução fisiológica, com os demais solventes, estes apresentaram estatisticamente um maior biovolume de células viáveis ($P < 0.05$). O parâmetro classificado como porcentagem de células vivas também foi demonstrado na tabela 11 e ilustrados na figura 6. Neste modelo *in situ*, 83% de células viáveis foram encontradas quando expostas a solução fisiológica (controle). Entre os solventes estudados, o que apresentou maior porcentagem de células vivas

foi o grupo do Citrol, apresentando semelhança estatisticamente significativa com o grupo controle ($P>0.05$). Os solventes que apresentaram menor porcentagem de células vivas foram o Xilol seguido dos Eucaliptol, Endosolv E, e d-Limoneno respectivamente, não havendo diferenças estatísticas significantes entre eles ($P>0.05$). Porém esses quatro solventes, apresentaram uma menor quantidade de células vivas estatisticamente significativa quando comparados com o grupo controle ($P<0.05$).

Figura 6 . Microscopia confocal de varredura a laser de dentina infectada tratada com solução fisiológica (A), Citrol (B), d-Limoneno (C), Eucaliptol (D), Endosolv E (E) e Xilol (F). Fluorescência verde representa viabilidade microbiana; fluorescência vermelha representa morte microbiana.

5.3 Citotoxicidade dos solventes endodônticos

Gráfico 1. Curvas dos valores correspondentes a porcentagem (%) de células viáveis após a exposição celular por 24 horas nas diferentes concentrações dos solventes. A concentração 0% corresponde ao grupo controle com número de células no momento do tratamentos.

No presente estudo, todos solventes testados demonstraram ser capazes de comprometer a viabilidade celular nas condições estudadas, mesmo em pequenas concentrações. A medida que as concentrações dos solventes aumentaram a viabilidade celular diminuiu, com exceção do d-Limoneno que apresentou um aumento na viabilidade entre as concentrações 0.5 e 1%. Pudemos constatar, no gráfico 1, que o número de células viáveis decresceram acentuadamente independente do grupo experimental, quando a concentração foi de 0.5%. No entanto nesta concentração, o único solvente que não foi significativo foi o Xilol ($P > 0.05$), os demais solventes todos foram estatisticamente significantes ($P < 0.05$). Foram os d-Limoneno, Citrol e Eucaliptol (os três óleos essenciais), seguidos do Endosolv E, que apresentaram o maior efeito citotóxico na concentração de 0.5%, estatisticamente diferente do Xilol ($P < 0.05$).

Na concentração de 1%, todos solventes comprometeram a viabilidade celular de forma estatisticamente significativa ($P<0.05$), com destaque para o Citrol, d-Limoneno e Eucaliptol. A viabilidade celular apresentada pelo Xilol na concentração de 1%, também foi estatisticamente significativa em comparação com os demais solventes ($P<0.05$). A partir da concentração de 1%, todos solventes foram estatisticamente muito citotóxicos em todas concentrações ($P<0.05$). Porém, o Xilol manteve a diferença de viabilidade celular maior, de forma estatisticamente significativa com relação aos demais solventes ($P<0.05$), seguido do Endosolv E e d-Limoneno.

5.4 Microdureza dentinária

Tabela 12 – Média e desvio padrão do teste de microdureza dentinária, valores dos grupos dos solvente e grupos controle positivo e negativo em (*Knoop*). Análises nos períodos inicial e após 5 e 15 minutos de exposição aos solventes. Letras diferentes indicam significância entre solventes em cada período ($P<0.05$).

	Inicial		5 min		15 min		n
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	
Citrol	40,98 ^a	±12,58	31,92 ^b	±9,81	27,56 ^b	±8,36	10
d-Limoneno	34,60 ^a	±6,02	28,21 ^{ab}	±6,43	24,59 ^b	±6,53	10
Eucaliptol	37,11 ^a	±8,51	31,60 ^{ab}	±7,63	25,67 ^b	±7,71	10
Xilol	46,91 ^a	±10,65	38,61 ^b	±9,95	31,60 ^b	±10,55	10
Endosolv E	35,23 ^a	±3,98	32,06 ^{ab}	±3,77	28,19 ^b	±2,87	10
Controle +	44,77 ^a	±13,08	25,89 ^b	±6,35	14,46 ^c	±4,70	6
Controle -	36,47 ^a	±5,89	35,48 ^a	±5,90	35,71 ^a	±5,99	6

Na comparação entre os períodos, os solventes Citrol e Xilol, apresentaram diferenças estatísticas significantes somente entre os períodos inicial e 5 minutos e inicial e 15 minutos ($P<0.05$). Para ambos solventes não foram observados diferenças estatística significantes entre os períodos de 5 e 15 minutos ($P>0.05$). Os solventes d-Limoneno, Eucaliptol e Endosolv E, apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre os períodos inicial e 15 minutos ($P<0.05$), porém não apresentaram diferenças estatísticas significantes, entre os períodos inicial e 5 min, nem entre 5 e 15 min ($P>0.05$). Para o grupo Controle positivo houve diferença estatisticamente significativa entre todos os períodos ($P<0.05$) e no grupo Controle negativo não foi observado diferença estatisticamente significativa entre nenhum dos períodos ($P>0.05$).

Na comparação entre os solventes nos períodos, inicial e 5 minutos, não foi observado diferença estatisticamente significativa para nenhum dos grupos, nem quando comparados com os grupos controle positivo e negativo ($P>0.05$). Já na comparação entre solventes no período de 15 minutos todos foram estatisticamente significantes quando comparados com o grupo controle positivo ($P<0.05$).

5.5 Análise da desobturação e agitação ultrassônica dos solventes em Micro-CT

Na avaliação inicial dos dentes obturados, não foi observado diferenças estatísticas significantes dos volumes inicial das obturações, caracterizando o pareamento volumétrico da amostra ($P>0.05$). Os valores mediana, mínimo e máximo dos volumes das obturações inicial, após desobturação e agitação ultrassônica estão expostos na tabela 13.

Tabela 13. Mediana, mínimo e máximo dos valores dos volumes em (mm^3) dos dentes obturados, desobturados e após agitação ultrassônica (PUI). Porcentagens total de material desobturado (% Desobturado), obtidos entre a diferença dos valores obturados e desobturados. Porcentagem de material remanescente removido pós-ultrassom (% PUI), obtida entre a diferença dos valores de desobturado e após agitação ultrassônica. Letras minúsculas diferentes indicam significância entre os períodos ($P<0.05$). Letras maiúsculas diferentes indicam significância entre os solventes ($P<0.05$).

	Obturado	Desobturado	% Desobturado	PUI	% PUI
Citrol	6,39 (4,38-9,76) ^{aA}	1,89 (0,29-2,72) ^{bA}	79,16	0,183 (0,00207-0,61) ^{cA}	77,43
d-Limoneno	6,41 (3,23-10,84) ^{aA}	0,35 (0,025-2,17) ^{bA}	90,86	0,0091 (0,00012-1,50) ^{cA}	71,91
Eucaliptol	7,05 (3,01-11,95) ^{aA}	2,17 (0,099-6,24) ^{bA}	67,48	0,8458 (0,00032-3,34) ^{cA}	60,14
Xilol	8,84 (5,15-17,25) ^{aA}	0,96 (0,048-11,91) ^{bA}	75,60	0,0458 (0,00025-8,44) ^{cA}	76,54
Endosolv E	6,54 (3,40-8,13) ^{aA}	0,69 (0,0021-3,94) ^{bA}	85,05	0,0438 (0,00015-3,08) ^{cA}	74,42
Controle	7,29 (2,57-11,20) ^{aA}	0,84 (0,12-5,78) ^{bA}	69,75	0,598 (0,00034-5,41) ^{bb}	34,94

Na comparação entre os períodos, foram observadas diferenças estatisticamente significantes para todos os solventes e grupo controle, quando comparados à diferença dos volumes de material obturador inicial e material removido na desobturação dos canais radiculares ($P<0.05$). Entre os períodos da desobturação e após agitação ultrassônica, foi observada diferença estatística significativa para todos os solventes ($P>0.05$), porém, no grupo controle não foi observada diferença estatisticamente significativa ($P<0.05$). Na comparação entre os períodos dos canais obturados e a agitação ultrassônica, foi observado diferença estatisticamente significativa para todos grupos dos solventes incluindo o grupo controle

($P < 0.05$).

Nas comparações, entre os solventes e porcentagens do volume obturado e material removido na desobturação apresentadas na tabela 14, observou-se que, o d-Limoneno foi o solvente que melhor atuou, e o Eucaliptol, seguido do grupo controle, os que menos atuaram na desobturação dos canais radiculares, não havendo diferenças estatísticas significantes entre nenhum dos cinco solventes utilizados, nem do grupo controle ($P > 0.05$). Na comparação entre os solventes ultrassonergizados (tabela 14), todos tiveram uma ação estatisticamente significativa melhor, quando comparados com o grupo controle, na remoção dos materiais obturadores remanescentes ao longo dos canais radiculares ($P < 0.05$).

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

O retratamento endodôntico é indicado quando há a persistência de doenças infecciosas ou resultantes de microinfiltrações, diante de limpeza e modelagem incompletas dos canais radiculares, de deficiências técnicas ou na presença de anatomia complexa inatingida e não preenchida pelos materiais obturadores. Durante o retratamento endodôntico, não cirúrgico, é importante remover totalmente, tanto a guta-percha quanto os cimentos endodônticos, afim de descobrir quaisquer restos de tecidos necróticos ou microrganismos responsáveis pelo fracasso endodôntico (STABHOLZ; FRIEDMAN, 1988; SAE-LIM *et al.*, 2000; SAAD; AL-HADLAQ; AL-KATHEERI, 2007).

A remoção do material obturador pode ser conseguida com instrumentos endodônticos manuais (WILCOX *et al.*, 1987; IMURA *et al.*, 1996; CUNHA *et al.*, 2007; SÓ *et al.*, 2008), instrumento rotatórios (SAE-LIM *et al.*, 2000; SAAD; AL-HADLAQ; ALKATHEERI, 2007; (HAMMAD; QUALTROUGH; SILIKAS, 2008), pelo uso do calor (WILCOX *et al.*, 1987; BODRUMLU *et al.*, 2008) ou ultrassom (LADLEY *et al.*, 1991; MÜLLER *et al.*, 2013). Associado a todas essas técnicas, os solventes endodônticos podem ser usados para amaciar e dissolver os materiais obturadores presentes no canal radicular, facilitando a sua penetração e remoção (HUNTER; DOBLECKI; PELLEU, 1991; WILCOX, 1995; OYAMA; SIQUEIRA; SANTOS, 2002).

Alguns autores têm recomendado a desobturação dos canais radiculares sem o uso dos solventes (BRAMANTE; BETTI, 2000a; BETTI; BRAMANTE, 2001). Usar meios puramente mecânicos para remover a guta-percha é problemático, pois podem ocasionar alteração na forma original do canal radicular, desvios ou perfurações na raiz. Historicamente, os solventes têm sido utilizados para amolecer e dissolver materiais obturadores no retratamento dos canais radiculares. Canais radiculares obturados por materiais termoplastificados ou bem condensados e antigos são difíceis de serem removidos e penetrados pelos instrumentos no processo de desobturação (IMURA *et al.*, 1996; METZGER; MARIAN-KFIR; TAMSE, 2000). Portanto, nesses casos, o material obturador deve ser amolecido ou dissolvido por meio do calor ou solventes endodônticos.

Por muito tempo, o Clorofórmio foi o solvente de escolha utilizado no retratamento do canal radicular, por ser o mais eficiente em dissolver a guta-percha (TAMSE *et al.*, 1986;

WENNBERG; ØRSTAVIK, 1989; WILCOX, 1995). No entanto, questões sobre a sua segurança para o uso clínico foram levantadas (WENNBERG; ØRSTAVIK 1989, DE OLIVERIA *et al.*, 2006), principalmente por ser classificados como um agente cancerígeno (International Agency for Research of Cancer, 1987).

Como alternativa ao clorofórmio, outros solventes foram propostos para auxiliar no processo de desobturação dos canais radiculares (KAPLOWITZ, 1991). Dentre eles destacam-se, o Citrol, Eucaliptol, d-Limoneno, Endosolv E e Xilol. Conforme detalhado na revisão da literatura, as características químicas, biológicas e antimicrobianas desses solventes não estão muito claras, apresentando resultados controversos por metodologias menos precisas. Sabe-se bem que a função dos solventes endodônticos é a de dissolver e facilitar a remoção dos materiais obturadores do interior dos canais radiculares, permitindo o retratamento completo de forma satisfatória. Porém as demais características dessas substâncias químicas não devem ser ignoradas. Um solvente ideal para o retratamento endodôntico deve ter um equilíbrio entre os seguintes requisitos: apresentar um nível aceitável de segurança clínica, ter baixo nível de toxicidade e destruição tecidual, possuir a capacidade química de dissolução (MAGALHÃES *et al.*, 2007) e ter atividade antimicrobiana.

O presente estudo teve como objetivo avaliar as propriedades químicas (microdureza dentinária, dissolução dos materiais obturadores, desobturação dos canais radiculares e agitação ultrassônica), biológicas (citotoxicidade) e antimicrobianas do Citrol, Eucaliptol, d-Limoneno, Endosolv E e Xilol.

6.1 Da dissolução dos materiais obturadores

Não existe nenhuma padronização internacional para a avaliação de testes de solubilidade dos materiais obturadores. O método utilizado em nosso estudo foi descrito anteriormente, sendo selecionado por ser simples, reprodutível, rápido e fácil de realizar (TAMSE *et al.*, 1986; WHITWORTH; BOURSIN, 2000), tanto para os cimentos quanto para os materiais sólidos (cones). A avaliação da solubilidade por imersão em solvente foi estudada também por outros autores, por meio da avaliação de cimentos (MARTOS *et al.*, 2006; BODRUMLU; ER; KAYAOGLU, 2008; MARTOS *et al.*, 2011; MUSHTAQ *et al.*, 2012; BAYRAM; DALAT; BAYRAM, 2015) e de cones de guta-percha e de Resilon (MAGALHÃES *et al.*, 2007; TANOMARÚ-FILHO *et al.*, 2010; FARIA-JÚNIOR *et al.*,

2011; MUSHTAQ; IBRAHIM; KHAM, 2012). Um outro modelo de estudo encontrado na literatura é o da penetração de instrumentos (WENNBERG; ØRSTAVIK, 1989; HUNTER; DOBLECKI; PELLEU, 1991; UEMURA *et al.*, 1997; HANSEN, 1998; OYAMA; SIQUEIRA; SANTOS, 2002). Porém, na realidade, esse tipo de avaliação estuda o amolecimento provocado pelos solventes e não a sua dissolução.

Devido ainda à falta de padronização nesse tipo de estudo, não há um consenso quanto ao tempo (período) em que são submetidos ou imersos os corpos de prova nos solventes. Alguns utilizaram mais de uma imersão entre os tempos de 30 seg e 10 min (WHITWORTH; BOURSIN, 2000), outros de 1 a 15 seg (MARTOS *et al.*, 2006; MAGALHÃES *et al.*, 2007; BODRUMLU; ER; KAYAOGLU, 2008; MARTOS *et al.*, 2011; BAYRAM; DALAT; BAYRAM, 2015), outros ainda, somente uma única imersão (TANOMARÚ-FILHO *et al.*, 2010; FARIA-JÚNIOR *et al.*, 2011; MUSHTAQ *et al.*, 2012). Nós optamos por utilizar os tempos de imersão de 2, 5 e 15 min, tanto para os cimentos quanto para os materiais sólidos, por considerarmos ser um tempo que condiz com a realidade clínica.

Os corpos de prova dos cimentos foram obtidos de acordo com a metodologia anteriormente utilizada (MARTOS *et al.*, 2011). A adaptação do uso de anéis menores em nosso estudo teve o intuito de economizar material, sem contudo causar prejuízos ao estudo. No caso dos corpos de prova dos cones de guta-percha DP, PT e Resilon, optamos por utilizar fragmentos das porções mais calibrosas desses cones. Outros autores plastificaram esses materiais e preencheram anéis (MAGALHÃES *et al.*, 2007; AZAR; KHOJASTEHPUR; IRANPOUR, 2011; FARIA-JÚNIOR *et al.*, 2011). Quando comparados o xilol, óleo de laranja e eucaliptol sobre a guta-percha termoplastificada e a guta-percha convencional, uma maior dissolução foi observada na termoplastificada (TANOMARÚ-FILHO *et al.*, 2010). Optamos por não plastificar os cones para evitar que este processo pudesse interferir nas características iniciais desses materiais.

6.1.1 Dos Cimentos endodônticos

Embora existam poucos relatos na literatura sobre a solubilidade de cimentos endodônticos pela técnica de imersão em solventes, a comparação dos efeitos em alguns grupos de cimentos endodônticos observadas neste estudo, foi interessante.

Os resultados do presente estudo, de forma geral, mostram uma baixa ação dos

solventes endodônticos na capacidade de dissolução dos diferentes tipos de cimentos. Porém todos os cimentos mostraram-se solúveis em algum grau. Este fato está de acordo com estudos anteriores (TANOMARÚ-FILHO *et al.*, 2010; MARTOS *et al.*, 2011; MUSHTAQ *et al.*, 2012). O Citrol, Eucaliptol, d-Limoneno, Xilol e Endosolv E não demonstraram ação solvente estatisticamente significativa, entre os períodos inicial e 2 min, bem como entre 2 e 5 min em nenhum dos cimentos avaliados ($P>0.05$).

O cimento de resina epóxica avaliado foi o AH Plus conforme tabela 2. Existe pouca informação na literatura para sugerir qual solvente é mais eficaz na dissolução deste cimento endodôntico. Estudos anteriores demonstraram que o Xileno apresentou a melhor capacidade de dissolução desse cimento. Além disso, o tetracloroetileno e óleo de laranja também apresentaram grande capacidade de solubilidade (MUSHTAQ *et al.*, 2012). Esses resultados estão de acordo com os do nosso estudo, onde, aos 15 min, o solvente que apresentou a maior capacidade de dissolução sobre o AH Plus, foi também o Xilol, seguido do Endosolv E, o qual é composto pelo tetracloroetileno. Ambos foram estatisticamente melhores que os demais solventes estudados por nós ($P<0.05$). Um outro solvente que apresentou boa ação sobre o AH Plus foi o d-Limoneno, um composto extraído do óleo de laranja. No entanto, sua capacidade solvente não foi significativa, quando comparado com o Citrol e o Eucaliptol ($P>0.05$). Esta baixa ação do Eucaliptol também foi relatada anteriormente (BAYRAM; DALAT; BAYRAM, 2015). No entanto, estes mesmos últimos autores, encontraram um baixo efeito solvente do Endosolv E comparado com o clorofórmio frente ao AH Plus.

O Acroseal e o Sealer 26 conforme tabelas 3 e 4, são caracterizados como cimentos de resina epóxica que contém hidróxido de cálcio em sua composição. Esses dois cimentos apresentaram baixos níveis de dissolução em todos os solventes testados, corroborando estudos anteriores (MARTOS *et al.*, 2006; 2011). Cimentos que contém hidróxido de cálcio apresentam uma solubilidade entre 5.3 e 7.3 % em relação ao seu peso inicial quando imersos em eucaliptol por 20 min (SHÄFER; ZANDBIGLARI, 2002). Essa afirmativa está plenamente de acordo com os resultados obtidos em nosso estudo, onde obtivemos 5.2% para o Sealer 26 e 7.2% para o Acroseal, ambos solubilizados pelo Eucaliptol em 15 min. As maiores variações de solubilidade no Acroseal foram encontradas pelo Citrol aos 2 min e pelo Eucaliptol e Xilol aos 5 min. O Citrol foi o que mais dissolveu o Acroseal, seguido pelo Eucaliptol. Estatisticamente não houve diferenças em nenhum dos períodos por nenhum dos solventes ($P>0.05$). No Sealer 26, a maior variação foi encontrada aos 5 min pelos Citrol, d-Limono e Eucaliptol. No entanto, as diferenças encontradas não foram estisticamente

significantes em nenhum dos períodos por nenhum dos solventes ($P>0.05$). Em estudo anterior, o xilol aos 5 min foi o mais eficaz sobre o Sealer 26, não sendo significativa a diferença entre ele e os demais solventes testados (MARTOS *et al.*, 2011). Em estudos anteriores, foram relatados que cimentos que contêm hidróxido de cálcio em sua composição apresentam baixa solubilidade aos solventes (BAYRAM; DALAT; BAYRAM, 2015).

Cimentos à base de óxido de zinco-eugenol têm sido, tradicionalmente, os selantes mais comumente empregados para a obturação dos canais radiculares. O Endofill (Tabela 5), foi o cimento à base de óxido de zinco-eugenol empregado no nosso estudo. De forma geral, nos primeiros períodos (2 e 5 min), com excessão do Xilol e Endosolv E, todos os solvente apresentaram uma baixa ação solvente sobre esse cimento. O Xilol e Endosolv E apresentaram uma ação solvente superior tanto aos 2 quanto aos 5 min, não sendo estatisticamente significativa ($P>0.05$). Resultados encontrados anteriormente, mostram que, na comparação entre os períodos testados de 2 e 10 min, os solventes Eucaliptol, Xilol e Óleo de laranja, apresentaram solubilidade do Endofill, porém não significativa estatisticamente (MARTOS *et al.*, 2006). Nossos resultados em parte estão de acordo com esse autor, onde vimos que o Eucaliptol, Citrol (óleo de laranja) e, adicionalmente, o d-Limoneno apresentaram resultados semelhantes a esses, no entanto, nos períodos de 2, 5 e 15 min, não foram estatisticamente significantes ($P>0.05$). Um outro estudo, em que se avaliou o Endomethasone, outro cimento à base de óxido de zinco-eugenol, quando exposto ao Eucaliptol apresentou dissolução significativamente maior que outros cimentos aos 5 e 10 min (MARTOS *et al.*, 2011). Adicionalmente, em nosso trabalho, o Endosolv E e Xilol foram estatisticamente mais solventes ao Endofill aos 15 min, tanto comparados com os demais solventes, quanto aos períodos. ($P<0.05$). Resultado similar foi encontrado na dissolução do Endoflas FS, um cimento também a base de óxido de zinco eugenol, que foi mais dissolvido pelo tetracloroetileno seguidos pelo óleo refinado laranja e o xileno (MUSHTAQ *et al.*, 2012).

O d-Limoneno (Tabela 6), de maneira geral foi o solvente que melhor atuou na dissolução do MTA Fillapex em todos períodos, seguido do Endosolv E, não apresentando significância estatística com os demais solventes ($P>0.05$). Essa boa ação do Endosolv E sobre o MTA Fillapex também foi encontrada anteriormente (BAYRAM; DALAT; BAYRAM, 2015). Com exceção do Endosolv E e d-Limoneno, os demais solventes apresentaram uma baixa ação sobre o MTA Fillapex no período de 2 min, porém não significativa ($P>0.05$). Para o d-Limoneno, a melhor ação foi aos 2 min e 15 min, e para o

Endosolv E essa boa ação foi observada em todos os períodos, não sendo essas diferenças significantes ($P>0.05$). A melhor ação do Xilol e Eucaliptol ocorreu aos 5 min e do Citrol aos 2 e 5 min, a demais foram mais baixas. Existem poucos trabalhos na literatura estudando este cimento em técnicas de retratamento ou comparando este com outros cimentos (NEELAKANTAM; GROTA; SHARMA, 2013; CARPENTER et al., 2014). No entanto, da mesma forma que nós encontramos, uma baixa ação solvente do Eucaliptol foi relatada anteriormente (BAYRAM; DALAT; BAYRAM, 2015).

O RealSeal SE é um cimento à base de resina de metacrilato autocondicionante com polimerização dual. Após a manipulação deste cimento, realizamos a foto-ativação de ambos os lados dos corpos de prova por 40 seg cada um, conforme a recomendação do fabricante. Todos os solventes avaliados neste estudo apresentaram uma ação extremamente baixa nesse cimento químico-foto ativado. A tabela 7, mostra que todos solventes apresentaram resultados bastante semelhantes, sem apresentar significância estatística entre eles, tão pouco entre os períodos ($P>0.05$). Nossos resultados estão de acordo com um recente trabalho que também observou uma quase nula ação do Eucaliptol, Óleo de laranja, Xilol e Clorofórmio na capacidade de dissolver o RealSeal SE (BAYRAM; DALAT; BAYRAM, 2015). Um outro estudo avaliou a capacidade de dissolução do Eucaliptol e o Clorofórmio ao cimento Ephiphany (MARTOS *et al.*, 2011). Da mesma forma que em nosso trabalho, esse cimento, que apresenta as mesmas características que o RealSeal SE, foi muito pouco dissolvido pelos solventes testados. Em nosso estudo, com exceção do Citrol, todos os solventes apresentaram ação solvente nos períodos de 2 e 15 min maiores que no de 5 min. Porém essas diferenças não foram significantes ($P>0.05$) No período de 5 min nenhum dos solventes apresentou qualquer ação solvente. O citrol somente apresentou ação solvente ao RealSeal SE aos 15 min, não sendo estatisticamente significativa com os demais períodos ($P>0.05$). Comparativamente, d-Limoneno e o Endosolv E foram o solventes que apresentaram os melhores resultados. Curiosamente, um estudo anterior demonstrou resultados opostos aos encontrados por nós, onde observaram uma maior capacidade de dissolução do Ephiphany quando comparado à outros cimentos frente ao Eucaliptol e ao Clorofórmio (BODRUMLU; ER; KAYAOGLU, 2008). Quimicamente o Epiphany e RealSeal SE, apresentam as mesmas características (RESENDE *et al.*, 2009), no entanto o RealSeal SE é a quarta geração destes materiais. Acreditamos que essa discrepância de resultado encontrada, deve estar fundamentada principalmente pela evolução do material obturador em questão.

6.1.2 Dos Cones de Guta-percha e Resilon

Na avaliação da dissolução dos materiais sólidos, obtivemos resultados menos esperados. Tamse *et al.* (1986), avaliaram a capacidade do Xileno, Clorofórmio Endosolv-E e Terpeno de laranja em dissolver cones de gutapercha de diferentes marcas comerciais. Como resultados, observaram que quando um mesmo solvente utilizado em marcas comerciais de gutapercha diferentes apresentaram capacidade de dissolução diferentes. Os autores alegam que esse fato ocorreu, pelas diferenças de composição dos cones de gutapercha. Os cones de gutapercha consistem aproximadamente de 20% de gutapercha, 66% de óxido de zinco, 10% de radiopacificadores e 4% de ceras e resinas (MARCIANO; MICHAILESCO, 1989). As alterações no conteúdo de resina ou cera podem resultar nas diferenças de solubilidade observadas pelo citado autor. Esses dados podem explicar a baixa solubilidade encontrada de forma geral, em nosso estudo dos cones PT (ProTaper) e DP (Dentsply), pelos solventes testados (Tabelas 8 e 10). A exceção foi o solvente Endosolv E, que apresentou a maior capacidade de dissolução dos cones PT e DP, em todos os períodos avaliados sendo maior aos 15 min. Esse resultado está de acordo com o de outro estudo, obtido anteriormente (FARIA-JÚNIOR *et al.*, 2011). No entanto, somente observamos diferença estatisticamente significativa, na dissolução dos cones DP pelo Endosolv E, no período de 15 min comparando-o com os demais períodos ($P < 0.05$) (Tabela 10). Aos 5 min o Endosolv E mostrou também uma melhor ação solvente sobre o cone DP, no entanto não significativa ($P > 0.05$). Esses resultados estão de acordo com os resultados de estudo anterior (MUSHTAQ *et al.*, 2012) no entanto, em outro estudo os autores observaram em um único período de avaliação, que a ação do Xilol foi melhor que o do Endosolv E de forma não significativa (TAMSE *et al.*, 1986). Outro dado importante encontrado por esse último autor, similar aos nossos, foi a melhor ação solvente do Xilol e Endosolv E, em relação ao óleo de laranja. Em outro estudo, esta ação superior do Xilol também foi demonstrada, principalmente em relação ao óleo de laranja, que pouco dissolveu a gutapercha (TANOMARÚ-FILHO *et al.*, 2010). Assim como em nosso trabalho, outros autores também encontraram similaridade estatística na ação solvente da gutapercha entre, Xilol e d-Limoneno (METZGER; MARIAN-KFIR; TAMSE, 2000), Eucaliptol e d-Limoneno (UEMURA *et al.*, 1997) e Eucaliptol e Citrol (HANSEN, 1998; MAGALHÃES *et al.*, 2007; TANOMARÚ-FILHO *et al.*, 2010). Todos esses solventes foram estatisticamente semelhantes na ação de dissolução dos cones de gutapercha ($P < 0.05$). Até o presente momento, estudos que avaliem a capacidade de dissolução dos cones PT por imersão em solventes não haviam sido realizados.

Quando analisado a capacidade de dissolução dos cone Resilon (Tabela 9), observamos que todos os solventes testados apresentaram atividade muito baixa, conforme resultados encontrados anteriormente (FARIA-JÚNIOR *et al.*, 2011; TANOMARÚ-FILHO *et al.*, 2010). Em um trabalho mais recente, uma melhor ação na dissolução do Resilon foi observada pelo Xilol, Tetracloroetileno, Oléo de laranja a 5 min de exposição, no entanto também não foram estatisticamente significante. (MUSHTAQ *et al.*, 2012). Em nosso estudo o Xilol e o Citrol não apresentam ação solvente significante sobre o Resilon e o Endosolv E somente apresentou alguma ação aos 15 min, porém muito pequena também não significante ($P>0.05$). Por fim, o Eucaliptol apresentou melhor dissolução do Resilon, sendo ela aos 2 e 15 min ($P>0.05$). Os resultados obtidos neste estudo não puderam definir claramente qual solvente apresentou melhor ação solvente ao Resilon.

6.2 Da ação Antimicrobiana

Esta avaliação teve por objetivo determinar a atividade antimicrobiana dos solventes endodônticos sobre biofilme misto formado *in situ*. Embora exista uma vasta literatura comparando os solventes endodônticos no processo de desobturação dos canais radiculares, há pouca informação disponível a respeito do efeito desses químicos sobre biofilmes polimicrobianos. O estudo da relação entre a endodontia e os biofilmes microbianos consiste principalmente na observação das condensações bacterianas no sistema de canais radiculares em dentes com ou sem tratamento endodôntico (NAIR *et al.*, 2005) e na habilidade das soluções irrigadoras ou procedimentos endodônticos para dissolvê-los (DISTEL; HATTON; GILLESPIE, 2002; WILLIAMSON; CARDON; DRAKE, 2009). Por outro lado, a persistência de infecção em canais tratados endodônticamente pode ocorrer devido à existência de bactérias intratubular (HAAPASALO *et al.*, 2000; LOVE, 2002), em regiões de complexidades anatômicas ou até por bactérias inadvertidamente levadas aos canais radiculares (RINGEL *et al.*, 1982). A grande implicação dos biofilmes residuais resistentes ao tratamento endodôntico é que estes podem atuar como um escudo protetor para as bactérias sobreviventes dentro dos túbulos dentinários (DEL CARPIO-PEROCHENA *et al.*, 2011).

Diversos estudos avaliaram e determinaram a morte bacteriana presente em dentina (PARMAR *et al.*, 2011; POGGIO *et al.*, 2012). Desde o trabalho de Haapasalo e Ørstavik (1987), o modelo de bloco de dentina bovina infectada por microrganismos, é comumente usado como referência para testar medicamentos endodônticos (EVANS *et al.*, 2003;

ROSENTHAL; SPANGBERG; SAFAVI, 2004). A estrutura da dentina bovina mostrou ser semelhante à dentina humana (CAMARGO *et al.*, 2007), apresentando, no entanto, número e diâmetro dos túbulos dentinários um pouco maiores (SCHILKE *et al.*, 2000). O uso de dentina como substrato permite a identificação da presença de células microbianas por alguns micrometros abaixo da superfície (7 μm). Porém a detecção de bactérias viáveis em camadas mais profundas é limitada, devido à baixa penetração do laser através da estrutura da dentina, por ela ser opaca (ORDINOLA-ZAPATA *et al.*, 2014).

Historicamente o efeito antimicrobiano dos solventes endodônticos foi estudado por métodos de difusão em ágar ou métodos de diluição (MOLANDER *et al.*, 1998; EDGAR; MARSHALL; BAUMGARTNER, 2006). Modelos de estudos *in vitro* são importantes para determinar a interação bacteriana que ocorre no biofilme, (STANDAR *et al.*, 2010). Não são, contudo, capazes de simular com precisão as condições de crescimento bacteriano na cavidade oral, tais como as diferentes variedades de nutrientes, saliva, alterações de pH e de temperatura (DEL CARPIO-PEROCHENA *et al.*, 2014). Neste estudo foi escolhido o biofilme oral polimicrobiano formado *in situ*. O uso de um biofilme misto formado intraoralmente foi anteriormente usado para testar curativos intracanal (BARTHEL *et al.*, 2002; VIRTEJ *et al.*, 2007) e soluções irrigadoras (DEL CARPIO-PEROCHENA *et al.*, 2011; ORDINOLA-ZAPATA *et al.*, 2013). No entanto, não haviam sido utilizados para avaliar a ação antimicrobiana dos solventes endodônticos até então.

Uma das limitações deste estudo é que um modelo misto de biofilme muitas vezes não condiz com a realidade presente em casos de retratamento. Em casos de insucesso do tratamento endodôntico, normalmente o que se vê é uma monoinfecção por *Enterococcus faecalis* (LIU *et al.*, 2010), em uma frequência que varia de 24 a 77% (ENGSTRÖM; FROSTELL, 1964; HANCOCK *et al.*, 2001). No entanto, em alguns casos, podem estar em simbiose com alguns outros microrganismos caracterizando um biofilme misto. Essa é a provável justificativa para que os demais estudos antimicrobianos utilizando solventes endodônticos terem sido feitos em biofilme de *E. faecalis* (SUBBIYA; PADMAVATHY; MAHALAKSMI, 2013).

Utilizamos a microscopia confocal de varredura a laser (CLSM) para o estudo por ser única tecnologia, até a presente data, que torna possível obter um valor aproximado do número de células bacterianas anexadas a uma superfície, e que ao mesmo tempo podem fornecer informações sobre sua viabilidade (WANG; SHEN; HAAPASALO, 2012).

Todos os solventes, com exceção do Citrol, mataram entre 70 e 80% do biofilme oral formado *in situ*, crescido sobre um substrato de dentina. O Citrol teve uma baixa ação sobre o biofilme, sendo em torno de 50% de efetividade. No entanto, todos os solventes foram estaticamente significantes quando comparados com o grupo controle ($P < 0.05$). Em um estudo anterior, em aproximadamente 60% dos casos em que se realizou a desobturação de dentes infectados por *Enterococcus faecalis* com o uso do clorofórmio como solvente foi observada uma redução significativa na quantidade desses microrganismos (EDGAR; MARSHALL; BAUMGARTNER, 2006).

Estudos mais recentes, utilizando métodos de difusão em ágar, avaliaram a ação dos solventes endodônticos em linhagem celular de *E. Faecalis* e bactérias isoladas (SUBBIYA; PADMAVATHY; MAHALAKSMI, 2013). Demonstraram que o RC Solve (óleo de laranja) apresentou uma excelente atividade antimicrobiana em ambas culturas, em torno de 90% de inibição, sendo similar a droga controle a Vancomicina. Observaram também que o Endosolv E e o Xilol apresentam atividade de 60 e 50% de inibição respectivamente. Um outro estudo avaliou a atividade antimicrobiana do Óleo de laranja e Óleo de eucalipto associados ou não a clorexidina em diversas concentrações, em cultura de *E. Faecalis* sobre substrato de dentina bovina (MARTOS et al., 2013). Como resultados, observaram que aos 5 min de exposição aos solventes, ocorreram inibições de 78% para o Óleo de eucalipto e 89% para o Óleo de laranja e observaram ainda 100% de inibição (erradicação), para a clorexidina e as associações dela com os solventes.

Por termos utilizado metodologias diferentes com microrganismos diferentes, obtivemos resultados interessantes que pouco se parecem com os obtidos pelos trabalhos citados na literatura. Em nossas comparações, observamos uma ação antimicrobiana dos solventes bem variada: Citrol, 42%; d-Limoneno, 69%; Eucaliptol, 73%; Xilol, 81% e Endosolv E, 71%. Poucas evidências, tem demonstrado que o uso do solvente pode auxiliar no controle microbiano confinado ao canal radicular nos casos de retratamento. Podem haver várias razões para a falta de tais estudos. A mais provável delas é o alto poder citotóxico apresentado por esses agentes químicos. Porém, nas porções cervical e média dos canais radiculares, onde uma reinfecção por infiltração coronária ocorreu, a indicação do solvente seria uma alternativa tanto para ação a que se destina, que é dissolver materiais obturadores mais rígidos, como também uma ação antimicrobiana limitada complementada pelas soluções irrigadoras.

6.3 Da citotoxicidade dos solventes

Existem muitos relatos quanto à efetividade dos solventes, porém a literatura é escassa quanto ao estudo de compatibilidade tecidual desses no uso endodôntico (HANSEN, 1998). A escolha do solvente deve também ser realizada em concordância como requisito fundamental de um material biologicamente compatível, ou seja, ser bem tolerado pelos tecidos do periápice, não retardando ou impedindo a esperada reparação tecidual (SCELZA *et al.*, 2006).

Para determinar a compatibilidade biológica dos materiais odontológicos, foram sugeridas várias técnicas, dentre elas destacam-se os testes de citotoxicidade *in vitro*, em cultura de células ou de tecidos (OKITA; HENSTEN-PETTERSEN, 1991; BARBOSA; BURKARD; SPÅNGBERG, 1994), *in vivo* nos testes subcutâneos ou implantes ósseos (GROSSMAN; LALLY, 1982; TORABINEJAD *et al.*, 1997) e testes de uso (CALLIS; SANTINI, 1987; ØRSTAVIK; MJÖR, 1992).

O teste de citotoxicidade é um dos testes *in vitro* mais comumente utilizados para avaliar a compatibilidade biológica dos materiais utilizados em endodontia (TORABINEJAD *et al.*, 1995). Este teste possibilita estudar o comportamento celular de animais, sem a interferência de variações sistêmicas que podem ocorrer nos modelos *in vivo*, como a homeostase normal e o estresse experimental. Nesse segundo modelo de estudo, as moléculas proteicas presentes na matriz extracelular dos tecidos, bem como, células fagocitárias, a circulação linfática e sanguínea, ajudariam a diluir e eliminar as substâncias químicas utilizadas nas avaliações influenciando nos resultados. Tudo isso serve de suporte para que as mesmas apresentem baixo efeito citotóxico e não sejam tão irritantes clinicamente (WANDER WALL *et al.*, 1972).

Nas avaliações citotóxicas dos materiais endodônticos, utilizaram-se culturas de fibroblastos como L929 e NIH3T3. (TRONSTAD; WENNBERG, 1980; PASCON; SPANBERG, 1990; BARBOSA; BURKARD; SPÅNGBERG, 1994; TORABINEJAD *et al.*, 1995; SCELZA *et al.*, 2006; OYAMA; SIQUEIRA; SANTOS, 2002), células HeLa (SPANBERG; LANGELAND, 1973; KETTERING; TORABINEJAD, 1984; MILETIC *et al.*, 2005) e macrófagos (KARMOVSKY, 1978; SEGURA *et al.*, 1997; SCELZA *et al.*, 2006). Santos (1998), utilizou tanto células NIH 3T3, quanto fibroblastos oriundos de tecido pulpar em seu estudo e observou que os dois tipos celulares apresentaram resposta citotóxica similar. Optamos por utilizar neste estudo as células NIH 3T3 imortalizadas, por ser uma

linhagem celular relativamente fácil de obtenção, manipulação, perpetuação (TRONSTAD; WENNERBERG, 1980) e por não envolver aspectos éticos em pesquisa de animais e seres humanos (BROWNE, 1988; FRESHNEY, 2000). Vale ressaltar que a primeira barreira encontrada, quando ocorre a difusão de substâncias químicas utilizadas intracanal através do tecido periapical, é formada principalmente por fibroblastos.

Em nosso estudo, a viabilidade celular foi determinada pelo método de MTT. Este ensaio colorimétrico quantifica a redução do reagente MTT em um composto amarelo a outro composto conhecido como formazan, pela ação de desidrogenases mitocondriais (EDMONDSON; ARMSTRONG; MARTINER, 1988). A presença de desidrogenases mitocondriais ativas é um indicativo de viabilidade celular, pois estão presentes somente nas células vivas. Os cristais do corante roxo formazan, formados pela redução do MTT, são quantificados por técnicas de espectrofotometria. Os resultados foram apresentados na forma de gráficos de absorbância em função da concentração dos químicos utilizados.

Os resultados obtidos em nosso estudo mostraram diferenças estatísticas significantes entre o grupo controle (concentração de solvente inicial 0%) e todos os solventes testados em todas concentrações, com exceção do Xilol ($P < 0.05$). O Xilol, nas concentrações 0.25 e 0.5, apresentou estatisticamente o maior número de células viáveis quando comparado com os demais solventes testados ($P < 0.05$). Esse resultado está parcialmente em concordância com estudos anteriores, onde, nas concentrações mais baixas dos solventes, o Xilol apresentou viabilidade celular similar ao Óleo de laranja, ambos, porém, estatisticamente menos citotóxico que os demais solventes estudados, dentre eles o Eucaliptol (OYAMA, 2003). Na concentração de 0.5% (Gráfico 1), o Citrol (óleo de laranja), apresentou uma alta citotoxicidade, estatisticamente similar ao Eucaliptol ($P < 0.05$). Esse resultado difere dos encontrados em outro estudo, onde o Eucaliptol foi estatisticamente mais citotóxico que o Óleo de Laranja nestas mesmas concentrações (SCELZA et al., 2006). O d-Limoneno (GP-Solvent) também foi avaliado anteriormente com relação a sua citotoxicidade. Como resultados, foram observados que, nas concentrações mais baixas, 1:800, ele apresentou uma viabilidade celular de 96%, e numa concentração de 1:400, 46%. (VAJRABHAYA et al., 2004). Devido às concentrações utilizadas pelos autores serem muito baixas, tornam-se difíceis as comparações. A 0.5%, o d-Limoneno foi estatisticamente o mais citotóxico ($P < 0.05$). Por fim, o Endosolv E apresentou uma ação menos citotóxica quando comparado com o Eucaliptol, d-Limoneno e Citrol, a partir de 0.5% de concentração, seguindo-se essa

diferença nos demais períodos. Na concentração de 1%, foi estatisticamente melhor que o Citrol e d-Limoneno ($P < 0.05$).

Na concentração de 0.25%, todos os solventes foram capazes de manter a viabilidade celular de mais de 50% do número de células. A 0.5% de concentração, somente o Xilol, Endosolv E e Eucaliptol foram capazes de manter os 50%. A partir da concentração de 1%, somente o Xilol manteve a viabilidade celular acima dos 50%. Da mesma forma que no estudo de Oyama (2003), o solvente encontrado como o menos citotóxico estatisticamente, foi o Xilol ($P < 0.05$).

6.4 Da microdureza dentinária

Neste estudo também avaliamos o efeito dos solventes endodônticos rotineiramente utilizados no processo de desobturação dos canais radiculares, sobre a estrutura dentinária. A dentina do canal radicular é exposta aos solventes durante o processo de desobturação associado a esses agentes químicos (KHEDMAT *et al.*, 2014). Comprovadamente esses solventes alteram as propriedades físicas e químicas da dentina (ROTSTEIN *et al.*, 1999). Este fato está de acordo com os resultados encontrados no presente estudo, onde observamos, que todos os solventes por nós testados tiveram alteração na microdureza dentinária (Tabela 13). Para Kaufman *et al.* (1997), esse efeito na dentina está relacionado com a variação dos níveis de cálcio e fósforo modificados pelo efeito químico produzido pelos solventes endodônticos.

A composição da dentina foi descrita com base em seus componentes orgânicos e inorgânicos. O Cálcio (Ca) e o fósforo (P), presentes nos cristais de hidroxiapatita, são os principais componentes inorgânicos dos tecidos duros encontrados no dente (BUTT; TALWAR, 2013). A avaliação na mudança dos níveis de Ca/P, presentes na dentina e no esmalte, foi estudada por diferentes métodos. Dentre eles, a microdureza, a avaliação micro-radiográfica, métodos de eleição por microscopia eletrônica de varredura e por espectrometria de energia dispersiva (ARENDS; TEN BOSCH, 1992). Também foram utilizadas análises histoquímicas e testes de rugosidade de superfície (ROTSTEIN *et al.*, 1996).

A microdureza dentinária depende da quantidade de matriz calcificada por mm^2 (PASHLEY; OKABE; PARHAM, 1985) e sua determinação fornece evidências indiretas de

perda ou ganho mineral nos tecidos duros dos dentes (ARENDS; TEN BOSCH, 1992). Além disso, existe uma correlação positiva direta entre os valores de microdureza e o conteúdo mineral dos dentes (PANIGHI; G'SELL, 1992).

A medição de microdureza foi caracterizada como um dos mais simples métodos não destrutivos (KHEDMAT *et al.*, 2014). Estudos anteriores mostraram a adequação e a praticidade do teste de microdureza para avaliar mudanças superficiais de tecidos duros dentários, tratados com agentes químicos (PASHLEY; OKABE; PARHAM, 1985; SALEH; ETTMAN, 1999). As avaliações de microdureza podem ser feitas por três métodos, denominados como teste de dureza de Knoop (KHN) (PASHLEY; OKABE; PARHAM, 1985; MEREDITH *et al.*, 1996; HOSOYA *et al.*, 2000), teste de dureza de Vickers (VHN) (LEWINSTEIN *et al.*, 1994; KURAMOTO *et al.*, 2001; ERDEMIR; ELDENIZ; BELL, 2004b; KHEDMAT *et al.*, 2014) e o teste de dureza de Brinell (BHN) (RAMAMOORTHY; NIVEDHITHA; VANAJAS-SUN, 2013).

Estudos anteriores confirmaram a adequação e a viabilidade do teste de Knoop para a avaliação de alterações dos tecidos duros dentários após a exposição à substâncias químicas (HOSOYA *et al.*, 2000). Dessa forma, optamos por utilizar o teste de dureza de Knoop no presente estudo.

A dureza da dentina tem relação direta com sua localização e o seu valor é diminuído à medida em que os testes de microdureza são feitos mais próximos da cavidade pulpar (FUSAYAMA; MAEDA, 1969). Pashley *et al.* (1985) relataram que a microdureza da dentina diminuiu quando os testes ocorreram de superficial para as regiões profundas. Como padronização, utilizamos em nosso estudo blocos de dentina bovina, obtidos da porção mais medial e superficial das raízes radiculares de incisivos inferiores bovinos.

Em um estudo anterior, Kaufman; Stabholz e Rotstein (1997) verificaram que o clorofórmio e xileno causaram apenas mínimas e não significantes mudanças nos níveis de cálcio e fósforo em blocos de dentina humana. Os resultados de nosso estudo indicam que o tratamento dos blocos de dentina com Citrol, Eucaliptol, d-Limoneno, Xilol e Endosolv E, reduziram significativamente a microdureza dentinária ($P < 0.05$). Esse resultado, esta de acordo com estudo anterior que apresentou resultado similar, também por todos solventes por ele avaliados (ROTSTEIN *et al.*, 1999).

Nossas avaliações foram feitas em dois períodos, aos 5 e 15 min, empregando 50µl de solvente em cada um dos tempos analisados. Aos 5 min, o Citrol e Xilol apresentaram uma diminuição na microdureza estatisticamente significativa, similar ao grupo controle positivo (ácido fosfórico 37%) ($P < 0.05$). Esse resultado está de acordo com estudo anterior, onde aos 5 min o Xilol também apresentou uma estatística redução na microdureza dentinária (ROTSTEIN *et al.*, 1999). Esse mesmo autor realizou idêntico teste em esmalte e como resultado também observou que o Xilol apresentou uma redução significativa na microdureza aos 5 min. Para justificar esses resultados, ele relatou ainda que provavelmente os solventes de guta-percha testados podem ter afetado os componentes orgânicos do esmalte e dentina, causando um alargamento dos espaços intercristalinos ou peritubulares e o aumento da porosidade e da permeabilidade desses tecidos. Aos 5 min ainda, nós observamos uma redução da microdureza produzida pelo Eucaliptol, Citrol e Endosolv E, porém não significativa ($P > 0.05$), corroborando com resultados de estudo anterior onde o Citrol e o Eucaliptol também não foram significantes (KHEDMAT *et al.*, 2014). Em nosso trabalho, aos 15 min todos solventes avaliados também reduziram a microdureza dentinária de forma estatisticamente significativa ($P < 0.05$). No entanto, essa redução foi estatisticamente menor à encontrada pelo grupo controle positivo ($P < 0.05$).

Sob condições *in vitro*, muitos fatores tais como a metodologia de estudo e variações entre os dentes podem afetar os resultados do teste (TAGAMI *et al.*, 1993; BURROW *et al.*, 1994. Nenhum estudo anterior tem investigado o efeito do Endosolv E e do d-Limoneno na microdureza dentinária, ambos foram os que menos reduziram esses valores de microdureza. Os solventes que apresentaram maior redução da microdureza dentinária foram o Xilol, seguidos do Citrol e Eucaliptol, respectivamente.

6.5 Da ação dos Solventes na desobturação dos Canais Radiculares

Diversas metodologias foram utilizadas para avaliar a qualidade e limpeza dos canais radiculares após a desobturação. Porém todas apresentam desvantagens ou limitações, dentre elas a destruição da amostra e impossibilidade de comparações entre os períodos pesquisados (SCHIRRMESTER *et al.*, 2006; GU *et al.*, 2008; SÓ *et al.*, 2008; TAKAHASHI *et al.*, 2009; VOET *et al.*, 2012) e a avaliação somente bidimensional ou por métodos qualitativos (GERGI; SABBAGH, 2007; TAŞDEMİR; YILDIRIM; ÇELİK, 2008; XU *et al.*, 2012). A

Micro-CT apresenta como principais vantagens em relação as demais técnicas, a obtenção de imagens detalhadas dos canais radiculares e a possibilidade de realizar análises volumétricas quantitativas sem a necessidade de destruir as amostras (HASSANLOO *et al.*, 2007; HAMMAD; QUALTROUGH; SILIKAS, 2009; METZGER *et al.*, 2010). Assim como em estudos anteriores, devido à limitações do software utilizado em dividir as raízes escaneadas em 3 secções iguais, realizamos a avaliação total da desobturação (HAMMAD; QUALTROUGH; SILIKAS, 2008; RÖDIG *et al.*, 2012; MA *et al.*, 2012).

A razão de termos utilizado como materiais obturadores o cimento de óxido de zinco-eugenol associado a guta-percha, foi devido a diferença de radiopacidade que ambos apresentam. No entanto o software utilizado apresentou dificuldade nesta diferenciação. Uma outra limitação nos estudos com avaliação em Micro-CT é a impossibilidade exata de diferenciação dos materiais obturadores (MA *et al.*, 2012). Essa afirmativa foi confirmada em nosso estudo, embora visualmente nas imagens obtidas essa diferença tenha sido nítida.

Na literatura não existe um consenso de qual tipo de instrumentos são mais eficientes no processo de desobturação do canal radicular (CAVENAGO *et al.*, 2014). Alguns estudos comparando instrumentos rotatórios de NiTi com instrumentos manuais verificaram uma melhor ação na desobturação pelos manuais (FERREIRA; RHODES; FORD, 2001), enquanto outros observaram pelos rotatórios (METZGER *et al.*, 2010; RÖDIG *et al.*, 2012), outros ainda encontraram resultados semelhantes entre as duas técnicas (HÜLSMANN; BLUHM, 2004; SIQUEIRA *et al.*, 2010; FENOUL *et al.*, 2010). No entanto, em termos de tempo de retratamento, os rotatórios provaram ser mais rápidos (SOMMA *et al.*, 2008). No presente estudo utilizamos o ProTaper Universal Retrato e ProTaper Universal para a desobturação dos canais radiculares, o que variou foram os solventes.

Alguns autores avaliaram também em técnicas de desobturação, o desvio proporcionado pelos instrumentos ao longo do canal radicular. As técnicas onde se utilizaram instrumentos de NiTi houve uma maior tendência de centralização por esses instrumentos (FERREIRA; RHODES; FORD, 2001). No presente estudo, por utilizarmos canais de dentes retos não nos preocupamos com essa variável.

O diâmetro apical final tanto no preparo prévio quanto na desobturação foi estabelecido pelo instrumento ProTaper F3. O objetivo da manutenção do diâmetro apical nessas duas etapas foi de na desobturação termos uma menor interferência do instrumento e uma maior ação dos solventes para uma melhor avaliação (WILCOX; SWIFT, 1991). O

instrumento menos (HAMMAD; QUALTROUGH; SILIKAS, 2008), ou mais calibroso como diâmetro pós-desobturação podem influenciar nos resultados (MA *et al.*, 2012).

Nenhuma das técnicas de retratamento usadas em estudos anteriores foram capazes de remover completamente os materiais obturadores do canal radicular (FRIEDMAN; MOSHONOV; TROPE, 1993; WILCOX, 1995; BRAMANTE; BETTI, 2000; SCELZA *et al.*, 2008; TAKAHASHI *et al.*, 2009; FERREIRA; RHODES; PITT FORD, 2001; ROGGENDORF *et al.*, 2010; RÖDIG *et al.*, 2012). Este fato foi confirmado pelas conclusões presentes do nosso estudo. Na análise de Micro-CT (Tabela 14), observamos que todos os grupos dos solventes apresentaram uma desobturação dos canais radiculares estatisticamente significativa em relação aos canais obturados ($P < 0.05$). No entanto nenhum dos solventes foi capaz de remover completamente esses materiais obturadores. Este resultado foi também encontrado no grupo controle onde utilizamos a solução fisiológica ($P < 0.05$). Demais estudos que compararam técnicas com e sem o auxílio dos solventes encontraram resultados similares (SAE-LIM *et al.*, 2000; KFIR *et al.*, 2011; KUMAR *et al.*, 2012).

Scelza *et al.* (2008), compararam o Cloroformio, Eucaliptol e Óleo de laranja associados a desobturação por instrumentação manual e concluíram que, todos os solventes apresentaram ação similar entre eles porém estatisticamente superior ao grupo controle. Em nosso estudo na comparação entre os grupos dos solventes (Tabela 14), não observamos diferença estatística significativa entre nenhum deles, inclusive quando comparados ao grupo controle ($P < 0.05$). O maior porcentual de desobturação por solvente encontrado foi de 90% no grupo do d-Limoneno seguido do Endosolv E, 85% e o menor foi de 67% para o Eucaliptol, enquanto que no grupo controle foi observado 69% de material removido. Kfir *et al.* (2014), compararam várias técnicas associadas ou não ao clorofórmio e observaram que a técnica rotatória associada a esse solvente permitiu menos de 1% de material obturador remanescente, sendo estatisticamente melhor que a mesma técnica sem solvente. Cavenago *et al.*, (2014), recentemente sugeriram que assim como no preparo do canal radicular, em retratamento a quantidade de material removido é em torno de 60%, baseando-se em estudo anterior (PAQUÉ *et al.*, 2009). No entanto eles estudaram a desobturação de canais mesiais de molares inferiores. Tal sugestão, faz sentido se tomarmos como base alguns dos resultados encontrados por nós, no entanto embora não tenha sido estatisticamente significativa ($P < 0.05$), foi nítida a maior capacidade de desobturação observada por alguns dos solventes estudados quando comparados com o grupo controle.

6.6 Do efeito da agitação ultrassônica dos solventes

Alguns autores buscaram alternativas para a remoção dos restos de materiais obturadores presentes ao longo dos canais radiculares após a desobturação (STAMOS et al., 1985; WILCOX, 1989; VIDUČIĆ et al., 2003; CAVENAGO et al., 2014). Estudos recentes têm demonstrado que o alargamento apical por instrumentos de 2 calibres imediatamente maiores que o do preparo inicial, reduziu significativamente a quantidade de material obturador ao longo dos canais radiculares (HASSANLOO et al., 2007; ROGGENDORF et al., 2010; RÖDIG et al., 2012). Esses dados, são relevantes em parte, pois clinicamente raramente sabe-se qual o diâmetro apical do preparo e obturação anterior.

Solomonov et al. (2012), observaram que o uso do SAF (*Self-Adjusting File*) após a desobturação dos canais radiculares, removeu muito mais material obturador que somente a ampliação por instrumentação rotatória. No entanto, nenhuma das técnicas removeu todo material obturador, mas o SAF foi significativamente mais eficaz.

O uso do ultrassom mostrou ser uma boa alternativa como técnica de retratamento do canal radicular (STAMOS; STAMOS; PERKINS, 1988). Diversos estudos demonstraram que com o seu uso necessitavam de menos tempo para o processo desobturação do canal radicular quando comparado com técnica manual (KRELL; NEO, 1985; MEIDINGER; KABES, 1985). Esta melhor ação foi relacionada à fricção e o aquecimento gerado pelas pontas ultrassônicas que quando utilizadas com solventes podem aumentar sua ação, reduzindo assim o tempo necessário para a remoção da guta-percha.

No presente estudo, utilizamos o ultrassom com o objetivo de promover uma maior limpeza dos canais desobturados. Wilcox em 1989, após a desobturação dos canais radiculares comparou a irrigação final pela agitação do NaOCl e o Clorofórmio. Como resultado, ela observou uma maior limpeza dos canais dos dentes em que foi agitado o Clorofórmio e NaOCl, no entanto não sendo estatisticamente significante. Esse resultado esta de acordo com o encontrado em nosso estudo, porém todos os solventes estudados por nós apresentaram resultados estatisticamente significantes ($P < 0.05$). Os resultados (Tabela 14) variaram entre 60 e 77% de material obturador removido a mais pela agitação ultrassônica após a desobturação dos canais radiculares, enquanto que no grupo controle (solução fisiológica) somente 35% dos materiais foram removidos. Recentemente um outro trabalho avaliou a agitação ultrassônica do Endosolv R em dentes desobturados e observaram uma

baixa ação de limpeza pós-ultrassom (MÜLLER et al., 2013). No resultado de nosso estudo, quando comparados os solventes com o grupo controle, todos foram estatisticamente melhores ($P < 0.05$), no entanto entre os solventes não observamos diferenças estatisticamente significantes ($P > 0.05$). Porém mesmo após a agitação ultrassônica, todos os grupos apresentaram materiais obturadores remanescentes nos canais radiculares.

Baseado nos resultados obtidos em nosso estudo, sugerimos que mais trabalhos devem ser realizados afim de elucidar alguns questionamentos levantados. Dentre eles observamos uma baixa ação dos solventes de forma geral em alguns tipos de cimentos e materiais sólidos. Nos questionamos se caso utilizados esses mesmos solventes por tempos mais prolongados ou aquecidos não apresentariam melhores resultados. Outro questionamento foi, se agitados os solventes por ultrassom em canais infectados por biofilme organizado apresentariam resultados satisfatórios. Por fim, baseado nos resultados no teste de citotoxicidade recomendamos o uso dos solventes com cautela.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos com as metodologias aplicadas neste estudo, foi possível concluir que:

- O Xilol e o Endosolv E foram mais efetivos na dissolução dos cimentos AH Plus e Endofill no período de 15 minutos em relação aos demais solventes. O Endosolv E apresentou capacidade de dissolução mais efetiva sobre os cones de Guta-percha estandardizados (DP) no período de 15 minutos em relação aos outros solventes estudados. Nos demais cimentos, materiais sólidos e nos outros períodos, os solventes apresentaram capacidade de dissolução semelhantes.
 - O Xilol e Eucaliptol foram os solventes que apresentam a melhor ação antimicrobiana enquanto que o Citrol mostrou a pior.
 - Todos solventes foram citotóxicos, no entanto somente o Xilol foi capaz de manter mais de 50% de células viáveis.
 - Todos solventes causaram alterações físicas na dentina e foram capaz de comprometer a microdureza dentinária, sendo que esta ação foi aumentada quanto maior o tempo de contato.
 - Todos solventes foram capazes de remover as obturações dos canais radiculares inclusive o grupo controle, porém nenhum foi capaz de remover os materiais obturadores completamente.
 - O uso da agitação ultrassônica dos solventes favoreceu a remoção do material obturador, porém não proporcionou a remoção completa do material.
-

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- Abramovitz I, Relles-Bonar S, Baransi B, Kfir A. The effectiveness of a self-adjusting file to remove residual gutta-percha after retreatment with rotary files. *Int Endod J*. 2012;45(4):386-92.
- Arends J, ten Bosch JJ. Demineralization and remineralization evaluation techniques. *J Dent Res*. 1992;71 Spec No:924-8.
- Azar M, Khojastehpour L, Iranpour N. A comparison of the effectiveness of chloroform in dissolving resilon and gutta-percha. *J Dent (Tehran)*. 2011;8(1):19-24.
- Barbosa SV, Burkard DH, Spangberg LS. Cytotoxic effects of gutta-percha solvents. *J Endod*. 1994;20(1):6-8.
- Barletta FB, de Sousa Reis M, Wagner M, Borges JC, Dall'Agnol C. Computed tomography assessment of three techniques for removal of filling material. *Aust Endod J*. 2008;34(3):101-5.
- Barrieshi-Nusair KM. Gutta-percha retreatment: effectiveness of nickel-titanium rotary instruments versus stainless steel hand files. *J Endod*. 2002;28(6):454-6.
- Barthel CR, Zimmer S, Zilliges S, Schiller R, Gobel UB, Roulet JF. In situ antimicrobial effectiveness of chlorhexidine and calcium hydroxide: gel and paste versus gutta-percha points. *J Endod*. 2002;28(6):427-30.
- Bayram E, Dalat D, Bayram M. Solubility evaluation of different root canal sealing materials. *J Contemp Dent Pract*. 2015;16(2):96-100.
- Betti LV, Bramante CM. Quantec SC rotary instruments versus hand files for gutta-percha removal in root canal retreatment. *Int Endod J*. 2001;34(7):514-9.
- Bodrumlu E, Er O, Kayaoglu G. Solubility of root canal sealers with different organic solvents. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008;106(3):e67-9.
- Bodrumlu E, Uzun O, Topuz O, Semiz M. Efficacy of 3 techniques in removing root canal filling material. *J Can Dent Assoc*. 2008;74(8):721.
- Bramante CM, Betti LV. Comparative analysis of curved root canal preparation using nickel-titanium instruments with or without EDTA. *J Endod*. 2000a;26(5):278-80.
-

Bramante CM, Betti LV. Efficacy of Quantec rotary instruments for gutta-percha removal. *Int Endod J*. 2000b;33(5):463-7.

Bramante CM, Silva RM. Retratoamento endodôntico: quando e como fazer. Santos. 2009, 1ed, 250p.

Brilliant JD, Christie WH. A taste of endodontics. *J Acad Gen Dent*. 1975;23(3):29-36.

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;35(9):1243-8.

Bueno CES, Valdrighi L. Efetividade de solventes e de técnicas na desobturação dos canais radiculares: estudo *in vitro*. *Rev Bras Odontol*. 1998;55(4):251-5.

Bueno CE, Delboni MG, de Araujo RA, Carrara HJ, Cunha RS. Effectiveness of rotary and hand files in gutta-percha and sealer removal using chloroform or chlorhexidine gel. *Braz Dent J*. 2006;17(2):139-43.

Browne RM. The in vitro assessment of cytotoxicity of dental materials-does it have a role?. *Int Endod J*. 1988;21(2):50-58

Burrow MF, Takakura H, Nakajima M, Inai N, Tagami J, Takatsu T. The influence of age and depth of dentin on bonding. *Dent Mater*. 1994;10(4):241-6.

Butt N, Talwar S. In-vitro evaluation of various solvents for retrieval of mineral trioxide aggregate and their effect on microhardness of dentin. *J Conserv Dent*. 2013;16(3):199-202.

Callis PD, Santini A. Tissue response to retrograde root fillings in the ferret canine: a comparison of a glass ionomer cement and gutta-percha with sealer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1987;64(4):475-9.

Camargo CH, Siviero M, Camargo SE, de Oliveira SH, Carvalho CA, Valera MC. Topographical, diametral, and quantitative analysis of dentin tubules in the root canals of human and bovine teeth. *J Endod*. 2007;33(4):422-6.

Carpenter MT, Sidow SJ, Lindsey KW, Chuang A, McPherson JC, Regaining apical patency after obturation with gutta-percha and sealer containing mineral trioxide aggregate. *J Endod*. 2014;40(4):588-590.

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

Cavenago BC, Ordinola-Zapata R, Duarte MA, del Carpio-Perochena AE, Villas-Boas MH, Marciano MA, et al. Efficacy of xylene and passive ultrasonic irrigation on remaining root filling material during retreatment of anatomically complex teeth. *Int Endod J.* 2014;47(11):1078-83.

Chávez de Paz LE, Bergenholtz G, Dahlen G, Svensater G. Response to alkaline stress by root canal bacteria in biofilms. *Int Endod J.* 2007;40(5):344-55.

Costerton W, Veeh R, Shirtliff M, Pasmore M, Post C, Ehrlich G. The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. *J Clin Invest.* 2003;112(10):1466-77.

Cruz-Filho AM, Sousa-Neto MD, Saquy PC, Pecora JD. Evaluation of the effect of EDTAC, CDTA, and EGTA on radicular dentin microhardness. *J Endod.* 2001;27(3):183-4.

Cunha RS, De Martin AS, Barros PP, da Silva FM, Jacinto RC, Bueno CE. In vitro evaluation of the cleansing working time and analysis of the amount of gutta-percha or Resilon remnants in the root canal walls after instrumentation for endodontic retreatment. *J Endod.* 2007;33(12):1426-8.

de Oliveira DP, Barbizam JV, Trope M, Teixeira FB. Comparison between gutta-percha and resilon removal using two different techniques in endodontic retreatment. *J Endod.* 2006;32(4):362-4.

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.

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

Della Nina L, Ether S, Oliveira E, Paulo S. Avaliação das propriedades de solventes de gutta-percha. *Quintessence.* 1980;7:27-32.

Distel JW, Hatton JF, Gillespie MJ. Biofilm formation in medicated root canals. *J Endod.* 2002;28(10):689-93.

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.

Edgar SW, Marshall JG, Baumgartner JC. The antimicrobial effect of chloroform on *Enterococcus faecalis* after gutta-percha removal. *J Endod.* 2006;32(12):1185-7.

Edmondson JM, Armstrong LS, Martiner AO. A rapid and simple MTT-based spectrophotometric assay for determining drug sensitivity in mono-layer cultures. *J Tissue Cult Meth* 1988;11:15-7.

Eldeniz AU, Erdemir A, Belli S. Effect of EDTA and citric acid solutions on the microhardness and the roughness of human root canal dentin. *J Endod.* 2005;31(2):107-10.

Engstrom B, Frostell G. Experiences of Bacteriological Root Canal Control. *Acta Odontol Scand.* 1964;22:43-69.

Erdemir A, Adanir N, Belli S. In vitro evaluation of the dissolving effect of solvents on root canal sealers. *J Oral Sci.* 2003;45(3):123-6.

Erdemir A, Eldeniz AU, Belli S. Effect of gutta-percha solvents on mineral contents of human root dentin using ICP-AES technique. *J Endod.* 2004a;30(1):54-6.

Erdemir A, Eldeniz AU, Belli S. Effect of the gutta-percha solvents on the microhardness and the roughness of human root dentine. *J Oral Rehabil.* 2004b;31(11):1145-8.

Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *Int Endod J.* 2002;35(3):221-8.

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

Ezzie E, Fleury A, Solomon E, Spears R, He J. Efficacy of retreatment techniques for a resin-based root canal obturation material. *J Endod.* 2006;32(4):341-4.

Fachin EV, Wenckus CS, Aun CE. Retreatment using a modified-tip instrument. *J Endod.* 1995;21(8):425-8.

Faria-Júnior NB, Loiola LE, Guerreiro-Tanomaru JM, Berbert FL, Tanomaru-Filho M. Effectiveness of three solvents and two associations of solvents on gutta-percha and resilon. *Braz Dent J.* 2011;22(1):41-4.

Farzanah M, Abitbol S, Friedman S. Treatment outcome in endodontics: the Toronto study. Phases I and II: Orthograde retreatment. *J Endod*. 2004; 30: 627–633.

Fenoul G, Meless GD, Perez F. The efficacy of R-Endo rotary NiTi and stainless-steel hand instruments to remove gutta-percha and Resilon. *Int Endod J*. 2010;43(2):135-41.

Ferreira JJ, Rhodes JS, Ford TR. The efficacy of gutta-percha removal using ProFiles. *Int Endod J*. 2001;34(4):267-74.

Freshney RI. Culture of animal cells: a manual of basic technique. 2000; 4 ed: Wiley Liss: Estados Unidos.

Friedman S, Moshonov J, Trope M. Efficacy of removing glass ionomer cement, zinc oxide eugenol, and epoxy resin sealers from retreated root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1992;73(5):609-12.

Friedman S, Moshonov J, Trope M. Residue of gutta-percha and a glass ionomer cement sealer following root canal retreatment. *Int Endod J*. 1993;26(3):169-72.

Friedman S, Rotstein I, Shar-Lev S. Bypassing gutta-percha root fillings with an automated device. *J Endod*. 1989;15(9):432-7.

Friedman S, Stabholz A. Endodontic retreatment--case selection and technique. Part 1: Criteria for case selection. *J Endod*. 1986;12(1):28-33.

Friedman S, Stabholz A, Tamse A. Endodontic retreatment--case selection and technique. 3. Retreatment techniques. *J Endod*. 1990;16(11):543-9.

Fruchi Lde C, Ordinola-Zapata R, Cavenago BC, Hungaro Duarte MA, Bueno CE, De Martin AS. Efficacy of reciprocating instruments for removing filling material in curved canals obturated with a single-cone technique: a micro-computed tomographic analysis. *J Endod*. 2014;40(7):1000-4.

Fusayama T, Maeda T. Effect of pulpectomy on dentin hardness. *J Dent Res*. 1969;48(3):452-60.

Gergi R, Sabbagh C. Effectiveness of two nickel-titanium rotary instruments and a hand file for removing gutta-percha in severely curved root canals during retreatment: an ex vivo study. *Int Endod J*. 2007;40(7):532-7.

Gilbert BO, Jr., Rice RT. Re-treatment in endodontics. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1987;64(3):333-8.

Giuliani V, Cocchetti R, Pagavino G. Efficacy of ProTaper universal retreatment files in removing filling materials during root canal retreatment. *J Endod.* 2008;34(11):1381-4.

Gorduysus MO, Tasman F, Tuncer S, Etikan I. Solubilizing efficiency of different gutta-percha solvents: a comparative study. *J Nihon Univ Sch Dent.* 1997;39(3):133-5.

Grossman LI, Lally ET. Assessment of irritation potential of essential oils for root canal cement. *J Endod.* 1982;8(5):208-12.

Gu LS, Ling JQ, Wei X, Huang XY. Efficacy of ProTaper Universal rotary retreatment system for gutta-percha removal from root canals. *Int Endod J.* 2008;41(4):288-95.

Haapasalo HK, Siren EK, Waltimo TM, Orstavik D, Haapasalo MP. Inactivation of local root canal medicaments by dentine: an in vitro study. *Int Endod J.* 2000;33(2):126-31.

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

Hammad M, Qualtrough A, Silikas N. Three-dimensional evaluation of effectiveness of hand and rotary instrumentation for retreatment of canals filled with different materials. *J Endod.* 2008;34(11):1370-3.

Hammad M, Qualtrough A, Silikas N. Evaluation of root canal obturation: a three-dimensional in vitro study. *J Endod.* 2009;35(4):541-4.

Hancock HH, Sigurdsson A, Trope M, Moiseiwitsch J. Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North Am population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001;91:579-86

Hansen MG. Relative efficiency of solvents used in endodontics. *J Endod.* 1998;24(1):38-40.

Hassanloo A, Watson P, Finer Y, Friedman S. Retreatment efficacy of the Epiphany soft resin obturation system. *Int Endod J.* 2007;40(8):633-43.

Hennequin M, Pajot J, Avignant D. Effects of different pH values of citric acid solutions on the calcium and phosphorus contents of human root dentin. *J Endod.* 1994;20(11):551-4.

Hosoya Y, Marshall SJ, Watanabe LG, Marshall GW. Microhardness of carious deciduous dentin. *Oper Dent*. 2000;25(2):81-9.

Hubscher W, Barbakow F, Peters OA. Root-canal preparation with FlexMaster: canal shapes analysed by micro-computed tomography. *Int Endod J*. 2003;36(11):740-7.

Hulsmann M, Stotz S. Efficacy, cleaning ability and safety of different devices for gutta-percha removal in root canal retreatment. *Int Endod J*. 1997;30(4):227-33.

Hunter KR, Doblecki W, Pelleu GB, Jr. Halothane and eucalyptol as alternatives to chloroform for softening gutta-percha. *J Endod*. 1991;17(7):310-1.

Imura N, Zuolo ML, Ferreira MO, Novo NF. Effectiveness of the Canal Finder and hand instrumentation in removal of gutta-percha root fillings during root canal retreatment. *Int Endod J*. 1996;29(6):382-6.

International Agency for Research of Cancer. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. 1987;7:152-4.

Kalembe D, Kunicka A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr Med Chem*. 2003;10(10):813-29.

Kaplowitz GJ. Evaluation of the ability of essential oils to dissolve gutta-percha. *J Endod*. 1991;17(9):448-9.

Kaplowitz GJ. Effect of temperature on rectified turpentine oil as a gutta-percha solvent. *J Endod*. 1994;20(4):173.

Karmovsky ML. Biochemical criteria for activated macrophage. *J Immunol* 1978;121:809-13.

Kaufman D, Mor C, Stabholz A, Rotstein I. Effect of gutta-percha solvents on calcium and phosphorus levels of cut human dentin. *J Endod*. 1997;23(10):614-5.

Kettering JD, Torabinejad M. Cytotoxicity of root canal sealers: a study using HeLa cells and fibroblasts. *Int Endod J* 1984;17:60-6.

Kfir A, Tsesis I, Yakirevich E, Matalon S, Abramovitz I. The efficacy of five techniques for removing root filling material: microscopic versus radiographic evaluation. *Int Endod J*. 2012;45(1):35-41.

Khedmat S, Dehghan S, Hadjati J, Masoumi F, Nekoofar MH, Dummer PM. In vitro cytotoxicity of four calcium silicate-based endodontic cements on human monocytes, a colorimetric MTT assay. *Restor Dent Endod*. 2014;39(3):149-54.

Kosti E, Lambrianidis T, Economides N, Neofitou C. Ex vivo study of the efficacy of H-files and rotary Ni-Ti instruments to remove gutta-percha and four types of sealer. *Int Endod J*. 2006;39(1):48-54.

Krell KV, Neo J. The use of ultrasonic endodontic instrumentation in the re-treatment of a paste-filled endodontic tooth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1985;60(1):100-2.

Kuramoto M Jr, Matson E, Turbino ML, Marques RA. Microhardness of Nd:YAG laser irradiated enamel surfaces. *Braz Dent J*. 2001;12:31. □

Jacob S, Narayann LL. Effect of Chloroform, Xylene and halothane on enamel and dentin micro-hardness of human teeth. *Endodontol*; 2000;12:3-6.

Jung IY, Seo MA, Fouad AF, Spangberg LS, Lee SJ, Kim HJ, et al. Apical anatomy in mesial and mesiobuccal roots of permanent first molars. *J Endod*. 2005;31(5):364-8.

Ladley RW, Campbell AD, Hicks ML, Li SH. Effectiveness of halothane used with ultrasonic or hand instrumentation to remove gutta-percha from the root canal. *J Endod*. 1991;17(5):221-4.

Lewinstein I, Hirschfeld Z, Stabholz A, Rotstein I. Effect of hydrogen peroxide and sodium perborate on the microhardness of human enamel and dentin. *J Endod*. 1994;20(2):61-3.

Liu H, Wei X, Ling J, Wang W, Huang X. Biofilm formation capability of *Enterococcus faecalis* cells in starvation phase and its susceptibility to sodium hypochlorite. *J Endod*. 2010;36(4):630-5.

Lopes HP, Gahyva, SMM. Retratamento endodôntico: Avaliação da quantidade apical de resíduos de material obturador após a reinstrumentação. *RGO*. 1992;40(3) :181-4.

Lopes HP, Siqueira Jr, JF. *Endodontia. Biologia e Técnica*: Rio de Janeiro: Medsi; 2010.

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

Love RM, Jenkinson HF. Invasion of dentinal tubules by oral bacteria. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2002;13(2):171-83.

Ma J, Al-Ashaw AJ, Shen Y, Gao Y, Yang Y, Zhang C, et al. Efficacy of ProTaper Universal Rotary Retreatment system for gutta-percha removal from oval root canals: a micro-computed tomography study. *J Endod*. 2012;38(11):1516-20.

Magalhaes BS, Johann JE, Lund RG, Martos J, Del Pino FA. Dissolving efficacy of some organic solvents on gutta-percha. *Braz Oral Res*. 2007;21(4):303-7.

Mandel E, Friedman S. Endodontic retreatment: a rational approach to root canal reinstrumentation. *J Endod*. 1992;18(11):565-9.

Marques da Silva B, Baratto-Filho F, Leonardi DP, Henrique Borges A, Volpato L, Branco Barletta F. Effectiveness of ProTaper, D-RaCe, and Mtwo retreatment files with and without supplementary instruments in the removal of root canal filling material. *Int Endod J*. 2012;45:927-32.

Marciano J, Michalesco PM. Dental gutta-percha: chemical composition, X-ray identification, enthalpic studies, and clinical implications. *J Endod*. 1989;15(4):149-53.

Martos J, Bassotto AP, Gonzalez-Rodriguez MP, Ferrer-Luque CM. Dissolving efficacy of eucalyptus and orange oil, xylol and chloroform solvents on different root canal sealers. *Int Endod J*. 2011;44(11):1024-8.

Martos J, Ferrer Luque CM, Gonzalez-Rodriguez MP, Arias-Moliz MT, Baca P. Antimicrobial activity of essential oils and chloroform alone and combined with cetrimide against *Enterococcus faecalis* biofilm. *Eur J Microbiol Immunol (Bp)*. 2013;3(1):44-8.

Martos J, Gastal MT, Sommer L, Lund RG, Del Pino FA, Osinaga PW. Dissolving efficacy of organic solvents on root canal sealers. *Clin Oral Investig*. 2006;10(1):50-4.

Masiero AV, Barletta FB. Effectiveness of different techniques for removing gutta-percha during retreatment. *Int Endod J*. 2005;38(1):2-7.

McDonald MN, Vire DE. Chloroform in the endodontic operator. *J Endod*. 1992;18(6):301-3.

Mead C, Javidan-Nejad S, Mego ME, Nash B, Torabinejad M. Levels of evidence for the outcome of endodontic surgery. *J Endod*. 2005;31(1):19-24.

Meidinger DL, Kabes BJ. Foreign object removal utilizing the Cavi-Endo ultrasonic instrument. *J Endod*. 1985;11(7):301-4.

Meredith N, Sherriff M, Setchell DJ, Swanson SA. Measurement of the microhardness and Young's modulus of human enamel and dentine using an indentation technique. *Arch Oral Biol*. 1996;41(6):539-45.

Metzger Z, Marian-Kfir V, Tamse A. Gutta-percha softening: "Hemo-De" as a xylene substitute. *J Endod*. 2000;26(7):385-8.

Metzger Z, Teperovich E, Zary R, Cohen R, Hof R. The self-adjusting file (SAF). Part 1: respecting the root canal anatomy--a new concept of endodontic files and its implementation. *J Endod*. 2010;36(4):679-90.

Miletic I, Devcic N, Anic I, Borcic J, Karlovic Z, Osmak M. The cytotoxicity of RoekoSeal and AH plus compared during different setting periods. *J Endod*. 2005;31(4):307-9.

Molander A, Reit C, Dahlen G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J*. 1998;31(1):1-7.

Moshonov J, Trope M, Friedman S. Retreatment efficacy 3 months after obturation using glass ionomer cement, zinc oxide-eugenol, and epoxy resin sealers. *J Endod*. 1994;20(2):90-2.

Mounce R. Endodontic retreatment possibilities: evaluation, limitations, and considerations. *Compend Contin Educ Dent*. 2004;25(5):364-6, 8.

Muller GG, Schonhofen AP, Mora PM, Grecca FS, So MV, Bodanezi A. Efficacy of an organic solvent and ultrasound for filling material removal. *Braz Dent J*. 2013;24(6):585-90.

Mushtaq M, Masoodi A, Farooq R, Yaqoob Khan F. The dissolving ability of different organic solvents on three different root canal sealers: in vitro study. *Iran Endod J*. 2012;7(4):198-202.

Naenni N, Thoma K, Zehnder M. Soft tissue dissolution capacity of currently used and potential endodontic irrigants. *J Endod*. 2004;30(11):785-7.

Nair PN. Neural elements in dental pulp and dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1995;80(6):710-9.

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.

Nair PN, Sjogren U, Krey G, Kahnberg KE, Sundqvist G. Intraradicular bacteria and fungi in root-filled, asymptomatic human teeth with therapy-resistant periapical lesions: a long-term light and electron microscopic follow-up study. *J Endod.* 1990a;16(12):580-8.

Nair PN, Sjogren U, Krey G, Sundqvist G. Therapy-resistant foreign body giant cell granuloma at the periapex of a root-filled human tooth. *J Endod.* 1990b;16(12):589-95.

Nair PN, Sjogren U, Schumacher E, Sundqvist G. Radicular cyst affecting a root-filled human tooth: a long-term post-treatment follow-up. *Int Endod J.* 1993;26(4):225-33.

National Institutes of Health. NIH Technical Report No. 88-2802. Toxicology and carcinogenesis studies of d-limonene in F344 rats and B6C3PF1 mice. Bethesda, MD National Institutes of Health, 1998.

Neelakantan P, Grotra D, Sharma S. Retreatability of 2 mineral trioxide aggregate-based root canal sealers: a cone-beam computed tomography analysis. *J Endod* 2013;39(7):893-896.

Okita N, Hensten-Pettersen A. In vitro cytotoxicity of tissue conditioners. *J Prosthet Dent.* 1991;66(5):656-9.

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;47(7):659-66.

Ordinola-Zapata R, Bramante CM, Villas-Boas MH, Cavenago BC, Duarte MH, Versiani MA. Morphologic micro-computed tomography analysis of mandibular premolars with three root canals. *J Endod.* 2013;39(9):1130-5.

Orstavik D, Mjor IA. Usage test of four endodontic sealers in *Macaca fascicularis* monkeys. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1992;73(3):337-44.

Oyama KO, Siqueira EL, Santos M. In vitro study of effect of solvent on root canal retreatment. *Braz Dent J.* 2002;13(3):208-11.

Oyama KON Avaliação comparativa da citotoxicidade *in vitro* dos solventes utilizados no retratamento endodôntico. (Dissertação de Mestrado), Universidade de São Paulo, São Paulo, (2003) 111 p.

Paik S, Sechrist C, Torabinejad M. Levels of evidence for the outcome of endodontic retreatment. *J Endod.* 2004;30(11):745-50.

Panighi M, G'Sell C. Influence of calcium concentration on the dentin wettability by an adhesive. *J Biomed Mater Res*. 1992;26(8):1081-9.

Paqué F, Ganahl D, Peters OA. Effects of root canal preparation on apical geometry assessed by micro-computed tomography. *J Endod*. 2009;35(7):1056-9.

Parmar D, Hauman CH, Leichter JW, McNaughton A, Tompkins GR. Bacterial localization and viability assessment in human ex vivo dentinal tubules by fluorescence confocal laser scanning microscopy. *Int Endod J*. 2011;44(7):644-51.

Pascon EA, Wourms gberg LS. In vitro cytotoxicity of root canal filling materials: 1. Gutta-percha. *J Endod*. 1990;16(9):429-33.

Pashley D, Okabe A, Parham P. The relationship between dentin microhardness and tubule density. *Endod Dent Traumatol*. 1985;1(5):176-9.

Pécora JD, Costa WF, Filho DS, Sarti SJ. Apresentação de um óleo essencial, obtido de *Citrus aurantium*, eficaz na desintegração do cimento de óxido de zinco-eugenol do interior do canal radicular. *Odonto*. 1992;1(5):130-2.

Pécora JD, Spano JC, Barbin EL. In vitro study on the softening of gutta-percha cones in endodontic retreatment. *Braz Dent J*. 1993;4(1):43-7.

Pécora JD, Cruz-Filho AM, Sousa-Neto MD, Silva RG. *In vitro* action of various bleaching agents on the microhardness of human dentin. *Braz Dent J*. 1994;5:129-34.□

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.

Peters OA, Peters CI, Schonenberger K, Barbakow F. ProTaper rotary root canal preparation: effects of canal anatomy on final shape analysed by micro CT. *Int Endod J*. 2003;36(2):86-92.

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

Poggio C, Colombo M, Scribante A, Sforza D, Bianchi S. In vitro antibacterial activity of different endodontic irrigants. *Dental traumatology*. *Dent Traumatol*. 2012;28(3):205-9.

Portenier I, Walimo TMT, Haapasalo M. *Enterococcus faecalis* the root canal survivor and 'star' in post-treatment disease. *Endod Topics* 2003;6:135-59.□

Ramamoorthi S, Nivedhitha MS, Vanajassun PP. Effect of two different chemomechanical caries removal agents on dentin microhardness: An in vitro study. *J Conserv Dent*. 2013;16(5):429-33.

Resende LM, Rached-Junior FJ, Versiani MA, Souza-Gabriel AE, Miranda CE, Silva-Sousa YT, et al. A comparative study of physicochemical properties of AH Plus, Epiphany, and Epiphany SE root canal sealers. *Int Endod J*. 2009;42(9):785-93.

Ribeiro DA, Matsumoto MA, Marques ME, Salvadori DM. Biocompatibility of gutta-percha solvents using in vitro mammalian test-system. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2007;103(5):e106-9.

Ring J, Murray PE, Namerow KN, Moldauer BI, Garcia-Godoy F. Removing root canal obturation materials: a comparison of rotary file systems and re-treatment agents. *J Am Dent Assoc*. 2009;140(6):680-8.

Ringel AM, Patterson SS, Newton CW, Miller CH, Mulhern JM. In vivo evaluation of chlorhexidine gluconate solution and sodium hypochlorite solution as root canal irrigants. *J Endod*. 1982;8(5):200-4.

Rodig T, Hausdorfer T, Konietschke F, Dullin C, Hahn W, Hulsmann M. Efficacy of D-RaCe and ProTaper Universal Retreatment NiTi instruments and hand files in removing gutta-percha from curved root canals - a micro-computed tomography study. *Int Endod J*. 2012;45(6):580-9.

Roggendorf MJ, Legner M, Ebert J, Fillery E, Frankenberger R, Friedman S. Micro-CT evaluation of residual material in canals filled with Activ GP or GuttaFlow following removal with NiTi instruments. *Int Endod J*. 2010;43(3):200-9.

Rosenthal S, Spangberg L, Safavi K. Chlorhexidine substantivity in root canal dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2004;98(4):488-92.

Rotstein I, Cohenca N, Teperovich E, Moshonov J, Mor C, Roman I, et al. Effect of chloroform, xylene, and halothane on enamel and dentin microhardness of human teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1999;87(3):366-8.

Rotstein I, Dankner E, Goldman A, Heling I, Stabholz A, Zalkind M. Histochemical analysis of dental hard tissues following bleaching. *J Endod*. 1996;22(1):23-5.

Saad AY, Al-Hadlaq SM, Al-Katheeri NH. Efficacy of two rotary NiTi instruments in the removal of Gutta-Percha during root canal retreatment. *J Endod*. 2007;33(1):38-41.

Sae-Lim V, Rajamanickam I, Lim BK, Lee HL. Effectiveness of ProFile .04 taper rotary instruments in endodontic retreatment. *J Endod*. 2000;26(2):100-4.

Saleh AA, Ettman WM. Effect of endodontic irrigation solutions on microhardness of root canal dentine. *J Dent*. 1999;27(1):43-6.

Santos EM. Análise da citotoxicidade in vitro de fármacos utilizados na terapia endodôntica de dentes decíduos. Estudo comparativo da ação da pasta Guedes-Pinto, formocresol, glutaraldeído e ácido fosfórico sobre cultura de fibroblastos. 1998. 153f. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Scelza MFZ, Lima Oliveira LR, Carvalho FB, Corte-Real Faria S. *In vitro* evaluation of macrophage viability after incubation in orange oil, eucalyptol, and chloroform. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;102:e24-27.

Scelza MFZ, Coil JM, Maciel ACC, Oliveira LRL, Scelza P. Comparative SEM evaluation of three solvents used in endodontic retreatment: an *ex vivo* study. *J Appl Oral Sci*. 2008;16(1):24-9.

Schafer E, Zandbiglari T. A comparison of the effectiveness of chloroform and eucalyptus oil in dissolving root canal sealers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2002;93(5):611-6.

Scholz Z, Molnar J, Hohmann J. Antimicrobial and antiplasmodial activities of essential oils. *Fitoterapia*. 2006;77(4):279-85.

Schilke R, Lisson JA, Bauss O, Geurtsen W. Comparison of the number and diameter of dentinal tubules in human and bovine dentine by scanning electron microscopic investigation. *Arch Oral Biol*. 2000;45(5):355-61.

Schirrmeister JF, Wrbas KT, Meyer KM, Altenburger MJ, Hellwig E. Efficacy of different rotary instruments for gutta-percha removal in root canal retreatment. *J Endod*. 2006b;32(5):469-72.

Schuurs AH, Moorer WR, Wesselink PR. [Solvents for the removal of gutta-percha from root canals. 1. Efficacy]. *Ned Tijdschr Tandheelkd*. 2004;111(7):271-5.

Segura JJ, Calvo JR, Guerrero JM, Jimenez Planas A, Sampedro C, Llamas R. EDTA inhibits in vitro substrate adherence capacity of macrophages: endodontic implications. *J Endod* 1997;23:205-8.

Shipper G, Orstavik D, Teixeira FB, Trope M. An evaluation of microbial leakage in roots filled with a thermoplastic synthetic polymer-based root canal filling material (Resilon). J Endod. 2004;30(5):342-7.

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

Siqueira JF Jr, Alves FR, Almeida BM, et al. Ability of chemomechanical preparation with either rotary instruments or self-adjusting file to disinfect oval-shaped root canals. J Endod 2010;36:1860-5. ■

Skucaite N, Peculiene V, Vitkauskiene A, Machiulskiene V. Susceptibility of endodontic pathogens to antibiotics in patients with symptomatic apical periodontitis. J Endod. 2010;36(10):1611-6.

So MV, Saran C, Magro ML, Vier-Pelisser FV, Munhoz M. Efficacy of ProTaper retreatment system in root canals filled with gutta-percha and two endodontic sealers. J Endod. 2008;34(10):1223-5.

Solomonov M, Paque F, Kaya S, Adiguzel O, Kfir A, Yigit-Ozer S. Self-adjusting files in retreatment: a high-resolution micro-computed tomography study. J Endod. 2012;38(9):1283-7.

Somma F, Cammarota G, Plotino G, Grande NM, Pameijer CH. The effectiveness of manual and mechanical instrumentation for the retreatment of three different root canal filling materials. J Endod. 2008;34(4):466-9.

Souter NJ, Messer HH. Complications associated with fractured file removal using an ultrasonic technique. J Endod. 2005;31(6):450-2.

Spanberg L, Langeland K. Biologic effects of dental materials. 1. Toxicity of root canal filling materials on HeLa cells *in vitro*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1973;35(3):402-14.

Spanó JCE, Barbin EL, Bonini A, Pécora JD. Eficácia dos óleos essenciais na desobturação dos canais radiculares. ROBRAC. 1995;5(14):25-8.

Stabholz A, Friedman S. Endodontic retreatment--case selection and technique. Part 2: Treatment planning for retreatment. J Endod. 1988;14(12):607-14.

Stamos DE, Stamos DG, Perkins SK. Retreatodontics and ultrasonics. J Endod. 1988;14(1):39-42.

Stamos DG, Haasch GC, Chenail B, Gerstein H. Endosonics: clinical impressions. J Endod. 1985;11(4):181-7.

Standar K, Kreikemeyer B, Redanz S, Munyer WL, Laue M, Podbielski A, Setup an *in vitro* test system for basic studies on biofilm behavior of mixed-species cultures with dental and periodontal pathogens. PLoS One. 2010;5(10):e13135.

Subbiya A, Padmavathy K, Mahalakshmi K. Evaluation of the antibacterial activity of three gutta-percha solvents against *Enterococcus faecalis*. Int J Artif Organs. 2013;36(5):358-62.

Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjogren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1998;85(1):86-93.

Tagami J, Nakajima M, Shono T, Takatsu T, Hosoda H. Effect of aging on dentin bonding. Am J Dent. 1993;6(3):145-7.

Taintor JF, Ingle JI, Fahid A. Retreatment versus further treatment. Clin Prev Dent. 1983;5(5):8-14.

Takahashi CM, Cunha RS, de Martin AS, Fontana CE, Silveira CF, da Silveira Bueno CE. In vitro evaluation of the effectiveness of ProTaper universal rotary retreatment system for gutta-percha removal with or without a solvent. J Endod. 2009;35(11):1580-3.

Tamse A, Unger U, Metzger Z, Rosenberg M. Gutta-percha solvents--a comparative study. J Endod. 1986;12(8):337-9.

Tanomaru-Filho M, Oricchio GJAR, Martins LP, Berbert FLCV. Avaliação da capacidade solvente de algumas substâncias empregadas no retratamento endodôntico. Rev Faculdade Odontol Lins. 1997;10(2):48-50.

Tanomaru-Filho M, Orlando T, Bortoluzzi EA, Silva GF, Tanomaru JM. Solvent capacity of different substances on gutta-percha and Resilon. Braz Dent J. 2010;21(1):46-9.

Tasdemir T, Er K, Yildirim T, Celik D. Efficacy of three rotary NiTi instruments in removing gutta-percha from root canals. Int Endod J. 2008;41(3):191-6.

Tasdemir T, Yildirim T, Celik D. Comparative study of removal of current endodontic fillings. J Endod. 2008;34(3):326-9.

Torabinejad M, Hong CU, Pitt Ford TR, Kettering JD. Cytotoxicity of four root end filling materials. *J Endod.* 1995;21(10):489-92.

Torabinejad M, Pitt Ford TR, McKendry DJ, Abedi HR, Miller DA, Kariyawasam SP. Histologic assessment of mineral trioxide aggregate as a root-end filling in monkeys. *J Endod.* 1997;23(4):225-8.

Tronstad L, Wennberg A. In vitro assessment of the toxicity of filling materials. *Int Endod J.* 1980;13(3):131-8.

Uemura M, Hata G, Toda T, Weine FS. Effectiveness of eucalyptol and d-limonene as gutta-percha solvents. *J Endod.* 1997;23(12):739-41.

Vajrabhaya LO, Suwannawong SK, Kamolroongwarakul R, Pewklieng L. Cytotoxicity evaluation of gutta-percha solvents: Chloroform and GP-Solvent (limonene). *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004;98(6):756-9.

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

Viducic D, Jukic S, Karlovic Z, Bozic Z, Miletic I, Anic I. Removal of gutta-percha from root canals using an Nd:YAG laser. *Int Endod J.* 2003;36:670-3.

Virtej A, MacKenzie CR, Raab WH, Pfeffer K, Barthel CR. Determination of the performance of various root canal disinfection methods after in situ carriage. *J Endod.* 2007;33(8):926-9.

Walton RE. Current concepts of canal preparation. *Dent Clin North Am.* 1992;36(2):309-26.

Wander Wall GL, Dowson J, Shipman Jr C, Arbor A. Antibacterial efficacy and cytotoxicity of three endodontic drugs. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1972;33(2):230-234.

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.

Wennberg A, Orstavik D. Evaluation of alternatives to chloroform in endodontic practice. *Endod Dent Traumatol.* 1989;5(5):234-7.

Whitworth JM, Boursin EM. Dissolution of root canal sealer cements in volatile solvents. *Int Endod J.* 2000;33(1):19-24.

Wilcox LR. Endodontic retreatment: ultrasonics and chloroform as the final step in reinstrumentation. *J Endod.* 1989;15(3):125-8.

Wilcox LR. Endodontic retreatment with halothane versus chloroform solvent. *J Endod.* 1995;21(6):305-7.

Wilcox LR, Juhlin JJ. Endodontic retreatment of Thermafil versus laterally condensed gutta-percha. *J Endod.* 1994;20(3):115-7.

Wilcox LR, Krell KV, Madison S, Rittman B. Endodontic retreatment: evaluation of gutta-percha and sealer removal and canal reinstrumentation. *J Endod.* 1987;13(9):453-7.

Wilcox LR. Endodontic retreatment: ultrasonics and chloroform as the final step in reinstrumentation. *J Endod.* 1989;15(3):125-8.

Wilcox LR, Swift ML. Endodontic retreatment in small and large curved canals. *J Endod.* 1991;17(7):313-5.

Williamson AE, Cardon JW, Drake DR. Antimicrobial susceptibility of monoculture biofilms of a clinical isolate of *Enterococcus faecalis*. *J Endod.* 2009;35(1):95-7.

Wiseman A, Cox TC, Paranjpe A, Flake NM, Cohenca N, Johnson JD. Efficacy of sonic and ultrasonic activation for removal of calcium hydroxide from mesial canals of mandibular molars: a microtomographic study. *J Endod.* 2011;37(2):235-8.

Wolcott JF, Himel VT, Hicks ML. Thermafil retreatment using a new "System B" technique or a solvent. *J Endod.* 1999;25(11):761-4.

Xu LL, Zhang L, Zhou XD, Wang R, Deng YH, Huang DM. Residual filling material in dentinal tubules after gutta-percha removal observed with scanning electron microscopy. *J Endod.* 2012;38(3):293-6.

Zakariasen KL, Brayton SM, Collinson DM. Efficient and effective root canal retreatment without chloroform. *J Can Dent Assoc.* 1990;56(6):509-12.

Zanettini PR, Barletta FB, de Mello Rahde N. In vitro comparison of different reciprocating systems used during endodontic retreatment. *Aust Endod J.* 2008;34(3):80-5.

Zmener O, Pameijer CH, Banegas G. Retreatment efficacy of hand versus automated instrumentation in oval-shaped root canals: an ex vivo study. *Int Endod J.* 2006;39(7):521-6.

ANEXOS

ANEXO 1 - APROVAÇÃO CEP

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU-
USP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise das propriedades químicas, biológicas e antimicrobianas de solventes endodônticos

Pesquisador: Marcelo Haas Villas Bôas

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 43941415.4.0000.5417

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Nenhuma no momento.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Esse projeto foi considerado APROVADO na reunião ordinária do CEP de 20.05.2015, com base nas normas éticas da Resolução CNS 466/12. Ao término da pesquisa o CEP-FOB/USP exige a apresentação de relatório final. Os relatórios parciais deverão estar de acordo com o cronograma e/ou parecer emitido pelo CEP. Alterações na metodologia, título, inclusão ou exclusão de autores, cronograma e quaisquer outras mudanças que sejam significativas deverão ser previamente comunicadas a este CEP sob risco de não aprovação do relatório final. Quando da apresentação deste, deverão ser incluídos todos os TCLEs e/ou termos de doação assinados e rubricados, se pertinentes.

BAURU, 22 de Maio de 2015

Assinado por:
Izabel Regina Fischer Rubira Bullen
(Coordenador)

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

ANEXO 2 - Parâmetros de aquisição no escaneamento dos dentes (Testes de desobturação e agitação ultrassônica)

```
[System]
Scanner=Skyscan1076
Instrument SN=09G02060
Hardware=C
Secure mode=OFF
Software=Version 3. 2 (build 2)
Home Directory=C:\SkyScan
Tube=Hamamatsu 100/250
Camera=Princeton Instruments
Camera Pixel Size (um)= 12.56
Camera X/Y Ratio=1.0073
[Acquisition]
Data Directory=C:\RESULTS\microCT\Solvente\Grupo 5\Dente 6
Filename Prefix=Dente 6_
Source Voltage (kV)= 100
Source Current (uA)= 100
Filter=Al 1.0 mm
Object to Source (mm)=121.000
Camera to Source (mm)=165.000
Number Of Files= 0
Number Of Rows= 2672
Number Of Columns= 4000
Optical Axis (line)=1260
Image Pixel Size (um)= 9.0510
Image Format=TIFF
Depth (bits)=16
Data Offset (bytes)= 264
Horizontal overlap (pixel)=0
Camera horizontal position=Center
Visual Camera=OFF
Screen LUT=0
Exposure (ms)= 1600
Rotation Step (deg)=0.300
Frame Averaging=On (4)
Scanning position=133.575 mm
Suggested beam-hardening correction=10
Suggested HU-Calibration=246000
Number of connected scans=1
Use 360 Rotation=NO
Rotation Direction=CC
Scanning Trajectory=ROUND
Type Of Motion=STEP AND SHOOT
Camera Offset=OFF
Scanning Start Angle=197.400
Study Date and Time=Jun 08, 2013 08:06:12
Scan duration=01:49:44
```

ANEXO 3 - Parâmetros de reconstrução dos dentes (Testes de desobturação e agitação ultrassônica)

Reconstruction Program=NRecon
Program Version=Version: 1.6.9.4
Program Home Directory=C:\SkyScan
Reconstruction engine=NReconServer
Engine version=Version: 1.6.9
Reconstruction from batch=Yes
Postalignment=-5.50
Reconstruction servers= NRECON4-PC NRECON1-PC NRECON2-PC NRECON3-PC
Option for additional F4F float format=OFF
Reconstruction mode=Standard
Dataset Origin=Skyscan1076
Dataset Prefix=Dente 6_
Dataset Directory=C:\RESULTS\microCT\Solvente\Grupo 5\Dente 6
Output Directory=C:\RESULTS\microCT\Solvente\Grupo 5\Dente 6\
Dente 6_Rec
Time and Date=Jun 08, 2013 22:49:24
First Section=162
Last Section=2668
Reconstruction duration per slice (seconds)=3.213004
Total reconstruction time (2507 slices) in seconds=8055.000000
Section to Section Step=1
Sections Count=2507
Result File Type=JPG
Result File Header Length (bytes)=Unknown: compressed JPG format (100%)
Result Image Width (pixels)=1316
Result Image Height (pixels)=1168
Pixel Size (um)=9.05207
Reconstruction Angular Range (deg)=197.70
Use 180+=OFF
Angular Step (deg)=0.3000
Smoothing=2
Smoothing kernel=0 (Asymmetrical boxcar)
Ring Artifact Correction=9
Draw Scales=OFF
Object Bigger than FOV=OFF
Reconstruction from ROI=ON
ROI Top (pixels)=2928
ROI Bottom (pixels)=1760
ROI Left (pixels)=1310
ROI Right (pixels)=2628
ROI reference length=4000
Filter cutoff relative to Nyquist frequency=100
Filter type=0
Filter type meaning(1)=0: Hamming (Ramp in case of optical scanner); 1: Hann; 2: Ramp; 3: Almost Ramp;
Filter type meaning(2)=11: Cosine; 12: Shepp-Logan; [100,200]: Generalized Hamming, alpha=(iFilter-100)/100
Undersampling factor=1
Threshold for defect pixel mask (%)=0
Beam Hardening Correction (%)=46
CS Static Rotation (deg)=0.00
Minimum for CS to Image Conversion=0.000000
Maximum for CS to Image Conversion=0.220000
HU Calibration=OFF
BMP LUT=0
Cone-beam Angle Horiz.(deg)=17.019047
Cone-beam Angle Vert.(deg)=11.415150