**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA RESTAURADORA**

**ESTUDO DO EFEITO DA QUITOSANA UTILIZADA NO PREPARO
BIOMECÂNICO SOBRE AS PAREDES DOS CANAIS RADICULARES MEDIANTE
AVALIAÇÃO POR ESPECTROSCOPIA E MICROSCOPIA CONFOCAL A LASER**

VANESSA LESSA CAVALCANTI DE ARAÚJO

**Ribeirão Preto
2017**

VANESSA LESSA CAVALCANTI DE ARAÚJO

**ESTUDO DO EFEITO DA QUITOSANA UTILIZADA NO PREPARO
BIOMECÂNICO SOBRE AS PAREDES DOS CANAIS RADICULARES MEDIANTE
AVALIAÇÃO POR ESPECTROSCOPIA E MICROSCOPIA CONFOCAL A LASER**

Tese de Doutorado apresentado à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para a obtenção do grau de Doutor em Ciências – Programa: Odontologia Restauradora - Área de Concentração: Odontologia Restauradora (Opção: Endodontia).

“Versão corrigida”

**Ribeirão Preto
2017**

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Assinatura do autor: _____

Data: ____/____/2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Araújo, Vanessa Lessa Cavalcanti de

Estudo do efeito da quitosana utilizada no preparo biomecânico sobre as paredes dos canais radiculares mediante avaliação por espectroscopia e microscopia confocal a laser.

“Versão corrigida da Tese. A versão original se encontra disponível na Unidade que se aloja o Programa”

148p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP/USP). Área de concentração: Odontologia Restauradora - Endodontia.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Gariba Silva.

FOLHA DE APROVAÇÃO

ARAÚJO, V. L. C. **Estudo do efeito da quitosana utilizada no preparo biomecânico sobre as paredes dos canais radiculares mediante avaliação por espectroscopia e microscopia confocal a laser.** 2017. 148p. Tese (doutorado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. Ricardo Gariba Silva (Orientador)

Instituição: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof(a).Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof(a).Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof(a).Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof(a).Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Este trabalho de pesquisa foi realizado no Laboratório de Pesquisa em Endodontia do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Dedicatória

Dedico especialmente este trabalho...

À **Deus**, por sempre me iluminar e me permitir chegar até aqui;

Aos meus pais, **Augusto César Cavalcanti de Araújo** e **Maria Aparecida Ferreira Lessa**, por sempre me apoiarem e me darem força em todos os momentos. Devo a eles todo o meu crescimento, tanto profissional como moral. Saibam que este trabalho também é resultado do esforço de vocês. Muito obrigada por tudo que vocês fizeram e fazem por mim. Amo muito vocês.

Ao meu irmão, amigo, cúmplice e confidente, **Vítor Lessa Cavalcanti de Araújo**, que sempre está na torcida e confiante do meu futuro. Pessoa maravilhosa e de bom coração, a quem quero todo o bem e sempre por perto de mim.

À minha Tia, **Maria Aúrea Cavalcanti de Araújo**, que eu tenho como uma segunda mãe e sempre esteve do meu lado, e me incentivava desde o sempre nos meus estudos.

Desculpem-me a minha ausência na maior parte do tempo dessa trajetória. A parte mais difícil foi ficar longe de vocês. Sou muito grata por tê-los em minha vida. Amo todos!

Agradecimientos

Agradeço

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Ricardo Gariba Silva**, por ter me ajudado, mais uma vez, na construção dessa nova etapa da minha formação acadêmica e pelos conhecimentos repassados durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

À **Profª Dr. Regina Palma-Dibb Guenka**, por toda orientação, contribuição, discussões, ajudas, pelos constantes ensinamentos transmitidos durante essa longa caminhada e conselhos em todos os momentos que precisei. Obrigada por ser um exemplo de dedicação à docência e à pesquisa.

Ao **Prof. Dr. Manoel Damião de Sousa Neto**, pelos ensinamentos transmitidos com dedicação e profissionalismo. Agradeço pela confiança e pelas oportunidades.

Ao **Prof Dr. Luiz Pascoal Vansan**, pela agradável convivência, e pelo constante aprendizado em endodontia a mim proporcionado durante o Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE).

Ao **Prof Dr. Jesus Djalma Pécora**, pelos ensinamentos de amor pela pesquisa e ética em sua execução. Exemplo de pesquisador, visionário da ciência e da vida. Admiração por sua sabedoria e cultura.

Ao **Prof. Dr. Antônio Miranda da Cruz Filho**, muito obrigada por todo o conhecimento transmitido ao longo desses anos, sempre disposto a ajudar. Sua competência e dedicação são uma inspiração.

Aos técnicos de laboratório, **Patrícia Marchi, Dra Débora Fernandes Costa Guedes, Dra Juliana Jendiroba Faraoni Romano, Reginaldo Santana**, pela ajuda e disponibilidade para a execução deste trabalho, pela alegria e palavras de conforto.

Ao secretário, **Carlos Feitosa dos Santos**, sempre prestativo, atencioso e sorridente. Obrigada pela ajuda durante todo o curso, pelas palavras de conforto, risadas e lembretes diários.

Às funcionárias, **Luiza Pitol** e **Rosângela Angelini**, pelo carinho, atenção e inúmeros cafezinhos.

Às secretárias da pós graduação **Regiane Moi Sacilotto**, **Isabel Cristina Sola** e **Mary Possani Carmessano**, pela atenção e disponibilidade quando solicitados.

Aos meus amigos da pós-graduação, **Amanda Buosi Biagi**, **Graziela Bianchi Leoni**, **Jardel Mazzi**, **Fabiane Lopes**, **Fernanda Ploteger**, **Rodrigo Dantas**, **Luis Eduardo Souza Flamini**, **Bruno Crozeta**, **Isadora Soares**, **Isabela Lima**, **Reinaldo Dias Neto**, pelo convívio diário agradável e por todo apoio em todos os momentos.

À minha amiga **Giovanna Rocha de Medeiros** e **Keila de Almeida Franceschini** que, mesmo distantes, estão sempre presentes na minha vida, me ajudando com palavras de apoio em todos os momentos. Obrigada por poder sempre contar com vocês.

À toda minha **Família**, que está sempre torcendo por mim, me dando todo incentivo possível e me fazendo presente em todas às reuniões familiares de todas as maneiras.

À **CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior**, pela ajuda financeira.

À **Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto**, que colaborou com mais um grande passo no meu crescimento profissional.

À todos, meus sinceros agradecimentos!

Sumário

Resumo

Abstract

Introdução	31
Objetivos	43
Materiais e Métodos	47
Resultados	77
Discussão	109
Conclusões	123
Referências	127
Apêndices	143
Anexo	147

ARAÚJO, V.L.C. **Estudo do efeito da quitosana utilizada no preparo biomecânico sobre as paredes dos canais radiculares mediante avaliação por espectroscopia e microscopia confocal a laser.** 148p. Tese (Doutorado em Odontologia Restauradora) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

O objetivo deste estudo foi avaliar, *in vitro*, o efeito das soluções irrigadoras quitosana a 0,2%; hipoclorito de sódio a 1% e EDTA a 17% na superfície dentinária e na interface de união da dentina/material obturador resinoso. Sessenta fragmentos de dentina, obtidos de 10 caninos superiores humanos, com 4 mm² de área foram distribuídos em quatro grupos (n=15) de acordo com o tratamento: G1 – NaOCl + EDTA + NaOCl, G2 – NaOCl + Quitosana + NaOCl, G3– Quitosana + Quitosana + Quitosana, G4 – Quitosana + EDTA + Quitosana. As amostras foram imersas por 6 minutos na primeira solução irrigadora (Tempo 1), 3 minutos na segunda (Tempo 2) e 1 minuto na terceira (Tempo 3), simulando o tratamento endodôntico. Foi analisada a composição orgânica e inorgânica das amostras por meio da Espectroscopia Infravermelha por Transformada de Fourier (FTIR) após cada etapa de irrigação. Para segunda fase, 24 caninos superiores humanos, divididos em 4 grupos (n=6), tiveram suas coroas cortadas e as raízes instrumentadas mecanicamente com instrumentos K3 até o instrumento 60.04, irrigados com NaOCl a 1% e Quitosana a 0,2% durante o preparo e EDTA a 17% e Quitosana a 0,2% como irrigação final. As amostras foram cortadas longitudinalmente para análise do número e do perímetro dos túbulos expostos nos diferentes tempos e a rugosidade da superfície antes (*baseline*) e após cada fase do tratamento, além da penetração do cimento endodôntico, e avaliação da interface material obturador/dentina, após a obturação (Tempo 3), por meio de microscopia confocal a laser. Os dados foram analisados pela ANOVA e pós-teste de Tukey ($p<0,05$). Por meio do FTIR, constatou-se que o G4 apresentou maiores valores de matéria orgânica quando comparado aos outros grupos ($p<0,05$), e foram observados maiores valores para o T3 quando comparado ao T0. Quanto aos valores de matéria inorgânica, o G1 apresentou valores superiores ($p<0,05$) aos G2 e G3. Não houve diferença quando comparado os tempos para o conteúdo inorgânico ($p>0,05$). O terço apical apresentou maior valores de conteúdo inorgânico quando comparado aos demais ($p<0,05$). Por meio do confocal, observou-se que apenas o G3 apresentou maiores valores de perímetro dos túbulos com diferença em relação ao G1, ($p<0,05$), que o T2 apresentou valores semelhantes ao T1 ($p>0,05$), e não houve diferença entre os terços radiculares. Na análise da contagem dos túbulos dentinários, observa-se que o G4 apresentou maiores valores, semelhantes ao G3 ($p>0,05$). O T2 apresentou os maiores valores e o T0 os menores ($p<0,05$), e o terço cervical apresentou maiores valores em relação aos demais ($p<0,05$). Na análise da rugosidade, não houve diferença entre os grupos, e nem entre os terços radiculares ($p>0,05$), sendo que o T0 apresentou maiores valores, com diferença em relação ao T1 e T2 ($p<0,05$). Na análise da interface material obturador/dentina, não houve diferença entre os grupos, e o terço apical apresentou menor extensão de tags formados ($p<0,05$). A Quitosana como solução irrigadora produziu efeitos favoráveis na dentina radicular sem afetar a interação do substrato com o cimento endodôntico.

Palavras-chave: Quitosana, soluções irrigadoras, FTIR, Confocal a laser.

Abstract

ARAÚJO, V.L.C. **The effects of chitosan on root canal walls in the different stages of the biomechanical preparation: a spectroscopy and laser confocal microscopy study.** 148p. Tese (Doutorado em Odontologia Restauradora) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

The aim of this study was to evaluate, in vitro, the influence of irrigation solutions, used during instrumentation of root canals - chitosan at 0.2%; 1% sodium hypochlorite and 17% EDTA - on dentin, by means of Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and laser confocal microscopy. Sixty dentin fragments, obtained from 10 human canines, with 4 mm² area were distributed in four groups (n = 15) according to the treatment: G1 – NaOCl + EDTA + NaOCl, G2 – NaOCl + Chitosan + NaOCl, G3– Chitosan + Chitosan + Chitosan, G4 – Chitosan + EDTA + Chitosan. The samples were immersed for 6 minutes in the first irrigation solution (Time 1), 3 minutes in the second (Time 2) and 1 minute in the third (Time 3), simulating the endodontic treatment. The organic and inorganic composition of the samples were analyzed by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) after each irrigation step. In a second phase, 24 teeth were divided into 4 groups (n = 6), cut longitudinally to analyze the number and perimeter of the exposed tubules at different times, the surface roughness before and after each treatment phase. The penetration of the endodontic sealer, and evaluation of the dentin interface, after the obturation (Time 3), by laser confocal microscopy. Data were analyzed by ANOVA and Tukey post hoc test (p<0.05). Using FTIR, G4 presented higher values of organic content when compared to the others groups (p <0.05), and higher values were observed for T3 when compared to T0. There was no difference when comparing the times for the inorganic content (p> 0.05). The apical third had higher values of inorganic content when compared to the others (p <0.05). With the aid of the confocal analysis, it was observed that only G3 presented higher values of tubule perimeter with difference in relation to the G1, (p <0.05), that T2 presented values similar to T1 (p> 0.05), And there was no difference between the root thirds. In the analysis of the dentinal tubule count, it was observed that G4 presented higher values, similar to G3 (p> 0.05). The T2 presented the highest values and T0 the lowest (p <0.05), and the cervical third had higher values compared with the others (p <0.05). Regarding the analysis of roughness, there was no difference between the groups, nor between the root thirds (p> 0.05), and the T0 presenting higher values compared with T1 and T2 (p <0.05). In the analysis of the dentin interface, there was no difference between the groups, and the apical third had a smaller extension of the formed tags (p <0.05). Chitosan produced less chemical changes in root dentin when compared to the other solutions.

Key- words: Chitosan, irrigating solutions, FTIR, laser confocal microscopy.

Introdução

O tratamento endodôntico tem como objetivo instrumentar, irrigar e obturar o sistema de canais radiculares (SCR) (MOELLER et al., 2013), e assim promover boa assepsia e permitir bom selamento desse sistema, de modo a prevenir a proliferação de micro-organismos residuais e evitar a colonização de novos invasores (LUCCY et al., 1990; PABLO et al., 2010; LI et al., 2014).

Assim, uma obturação, para ser considerada satisfatória, deve propiciar o preenchimento de todo o espaço preparado, modelado e limpo do canal radicular, de forma tridimensional, para facilitar o reparo biológico do periápice (SCHILDER, 1967). A obturação tridimensional dos canais radiculares, bem compactada, previne a percolação e a microinfiltração de exsudatos periapicais para o interior do espaço dos canais, e também a reinfecção, bem como cria ambiente biológico favorável para a cura (WU; DUMMER; WESSELINK, 2006; MINER; BERZINS; BABCALL, 2006; ARI; BELL; GUNES, 2010).

A eficiência de um material para vedar adequadamente o espaço do canal radicular é estabelecida por suas propriedades físico-químicas e características de manipulação. Nenhum material foi tão bem sucedido e amplamente aceito como a guta-percha como material de preenchimento, pois possui muitas propriedades favoráveis, tais como biocompatibilidade, plasticidade, compatibilidade, radiopacidade e fácil introdução e remoção quando necessário (DEITCH et al., 2002; LEA et al., 2005; MINER; BERZINS; BABCALL, 2006; GULSAHI et al., 2007; JAMES et al., 2007). Porém, a guta-percha não tem capacidade de adesão às paredes dentinárias, resultando assim na formação de lacunas entre os cones e as paredes do canal. Portanto, o seu uso associado ao cimento endodôntico deve ser empregado na obturação do SCR para todas as técnicas, e tem permanecido o padrão de atendimento na endodontia (CHANDRASEKBAR et al., 2011; CHENG et al., 2012).

A adaptação do material obturador às paredes dentinárias é importante para o sucesso do tratamento endodôntico em longo prazo, que depende não só da influência das

características físico-químicas das soluções irrigadoras sob o substrato dentinário, mas também de eficiente obturação dos canais radiculares (FAHMY, EL GENDY, EL ASHRY, 2015). O melhor contato das soluções irrigadoras com as paredes dentinárias do canal radicular pode favorecer a melhor limpeza e preenchimento do espaço radicular pelos materiais obturadores, além de favorecer a penetração dos cimentos nos túbulos dentinários, o que é clinicamente importante (TUNCER; TUNCER 2012).

A qualidade de preenchimento tridimensional do cimento é um pré-requisito para a vedação do SCR. O cimento tem como função essencial impermeabilizar o sistema de canais radiculares, agrupar a massa obturadora facilitando a sua adaptação à superfície dentinária, como também função lubrificante, que facilita o movimento do cone de guta-percha e preenche as irregularidades dos canais, onde a guta-percha não consegue alcançar (GROSSMAN, 1958; SILVA et al., 2013). Entre os cimentos endodônticos, o AH Plus mostrou os melhores resultados tanto em relação às suas propriedades físico-químicas quanto ao seu adequado desempenho biológico, além de bom selamento apical e microrretenção. Esta ocorre devido à maior quantidade de *tags* formados pelo cimento endodôntico nos túbulos dentinários, além da ligação dos anéis epóxicos ao colágeno presente na dentina (HASHEM et al. 2009; TUNCER & TUNCER 2012).

A dentina é composta por cerca de 70% de matéria inorgânica, principalmente hidroxiapatita, que lhe confere rigidez, 20% de matéria orgânica, e cerca de 10% de água (HABELITZ et al., 2002; KISHEN, 2006; TJÄDERHANE et al., 2012).

O colágeno Tipo 1 é a proteína principal (90%) da estrutura da matriz orgânica dentinária e contribui para a sua viscoelasticidade, estabilidade ultraestrutural, resistência à tração e tenacidade (RIVERA; YAMAUCHI, 1993; HABELITZ et al., 2002; SHRESTA; FRIEDMAN; KISHEN, 2011). Os outros 10% da matriz orgânica são constituídos por proteoglicanos e outras proteínas não colagenosas, distribuídas entre as fibrilas de colágeno, e importantes para a mineralização da matriz. A integridade das fibrilas de

colágeno depende em parte da formação de ligações cruzadas intermoleculares, que, uma vez aumentadas, proporcionará maior resistência do colágeno à degradação enzimática e melhores propriedades mecânicas da dentina afetada pela infecção endodôntica (SHRESTA; FRIEDMAN; KISHEN, 2011; PEERSADMEHR et al., 2014).

Consequentemente, uma vez que a matriz de colágeno está relacionada à tenacidade de fatura e resistência à tração da dentina, a desinfecção do canal radicular com produtos químicos pode levar ao enfraquecimento da estrutura dentinária, o que enfatiza a importância do uso de recursos terapêuticos que preservem a estrutura dental (MELLO et al., 2010).

Soluções irrigadoras com propriedades antimicrobianas são utilizadas no tratamento endodôntico para eliminar ou reduzir a infecção presente nos canais radiculares, (VIOLANTE; HAASE; VICKERMAN, 2013), e o hipoclorito de sódio (NaOCl) é a mais empregada, que, por suas características, é referido como a principal solução para limpeza e desinfecção do sistema de canais radiculares (ZENDER, 2006; MACEDO et al., 2014).

No entanto, o NaOCl é incapaz de dissolver as partículas inorgânicas de dentina e de evitar a formação da camada de *smear* após a instrumentação (PAQUE; RECHEMBERG; ZEHNDER, 2012; PLOTINO et al., 2016), que age como barreira física que impede o íntimo contato do cimento endodôntico com a parede do canal radicular, além de limitar a penetração dos cimentos nos túbulos dentinários (SALEH et al., 2002). Muitos autores (CLARKSON et al., 2006; ROSSI-FEDELE; DE FIGUEIREDO, 2008; ARSLAN et al., 2015; PLOTINO et al., 2016) reportam que a sua capacidade de dissolução da matéria orgânica depende da concentração, volume, temperatura, pH e do tempo de contato com a solução; porém, altas concentrações são citotóxicas ao tecido perirradicular. Além disso, pode promover redução da elasticidade e da resistência mecânica da dentina (NIU et al., 2002), devido à dissolução dos seus componentes orgânicos (BARÓN et al., 2013),

independentemente da concentração utilizada e do tempo de contato com a dentina (PASCON et al., 2009).

Para complementação da limpeza dos canais radiculares, agentes quelantes, como solução de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), são utilizados como solução irrigadora final para limpar as paredes do canal radicular e desmineralizar a dentina, de forma a complementar à ação do NaOCl. Assim, aumenta o contato desse material com as paredes de dentina e melhora a penetração do material obturador no interior dos túbulos dentinários, o que pode resultar na sua melhor vedação (TEIXEIRA; FELIPPE; FELIPPE, 2005; KARIM; KENNEDY; HUSSEY, 2007). O EDTA possui capacidade antisséptica limitada, e não é biodegradável nem biocompatível (SPANÓ et al., 2009). Essa forte desmineralização da dentina causa o alargamento dos túbulos dentinários, o seu amolecimento e a desnaturação das fibrilas de colágeno (ÇALT; SERPER, 2002; TAY et al., 2006; CARRILHO et al., 2009).

Portanto, para dissolver a matéria orgânica, utiliza-se o NaOCl (SPANÓ et al., 2001), e para facilitar na remoção dos componentes inorgânicos presentes na camada de *smear*, utiliza-se o EDTA como solução irrigadora final (KURUVILLA et al., 2015; MELLO et al., 2010). Porém, a utilização do NaOCl como solução irrigadora durante a instrumentação e do EDTA como solução irrigadora final após a instrumentação, ao mesmo tempo em que promove a remoção da camada de *smear* e aumento da permeabilidade, potencializa a formação de irregularidades nas paredes dentinárias em virtude do processo de desmineralização (NIU et al., 2002) que decorre da remoção exagerada de íons cálcio (ÇALT; SERPER, 2002; MELLO et al., 2010), além de induzir mudanças físicas, químicas (VIRE, 1991; KISHEN, 2006; TAY et al., 2006) e mecânicas na dentina radicular (GRIGORATOS et al., 2001; SLUTZKY-GOLBERG et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2007; MARENDING et al., 2007).

A sequência de irrigação NaOCl-EDTA-NaOCl destrói a cápsula protetora de hidroxiapatita das fibrilas de colágeno. Por este motivo, esse protocolo de irrigação dos

canais radiculares mostra influência negativa na adesão dos cimentos endodônticos resinosos à dentina (NEELAKANTAN et al., 2011), além de reduzir a adesão de alguns materiais à coroa dental (PASCON et al., 2009), pois os anéis epóxicos ligam-se quimicamente aos grupos aminos do colágeno (NEELAKANTAN et al., 2015).

Várias soluções também foram investigadas como possíveis irrigadoras dos canais radiculares, para limpeza e remoção da camada de *smear*. O Etidronate é um quelante biocompatível que, combinado ao NaOCl, tem sua capacidade quelante potencializada (TARTARI et al., 2013). Ballal; Mala; Bhat (2011) demonstraram que o uso de ácido maléico a 7% apresentou grande capacidade de remoção da camada de *smear* das paredes dentinárias do canal radicular e apresentou mais eficiência no terço apical quando comparado ao EDTA. Outros estudos propuseram o uso do ácido cítrico e do ácido peracético como agentes quelantes, pois modificam o conteúdo mineral da dentina radicular (COBANKARA; ERDOGAN; HAMURKU, 2011). A clorexidina teve sua capacidade comprovada como solução irrigadora, pois além de possuir propriedade antimicrobiana, suas moléculas são absorvidas pela hidroxiapatita presente no dente, devido à natureza catiônica (ARSLAN et al., 2015; KOLOSOWSKI et al., 2015).

Contudo, observa-se que 35% das paredes do canal radicular permanecem intocadas pelos instrumentos durante o preparo biomecânico, o que enfatiza a necessidade de que a irrigação seja eficiente para que o sucesso do tratamento endodôntico seja alcançado (MENDONÇA et al., 2015).

A complexidade do sistema de canais radiculares, bem como a dificuldade de os instrumentos endodônticos alcançarem toda a parede dentinária fazem com que o uso das soluções irrigadoras torne-se essencial durante o preparo biomecânico para a completa sanificação desse espaço (PETERS; WESSELINK, 2002; VAN DER SLUIS et al., 2007), principalmente no terço apical, que é a região mais difícil de ser limpa devido à sua dimensão mais estreita e morfologia complexa (PAUL et al., 2013).

Algumas soluções irrigadoras são capazes de alterar a composição química da superfície dentinária por meio da remoção de íons cálcio (Ca^{+2}) e fósforo (PO_4^{3-}) presentes na hidroxiapatita, que são os principais componentes do tecido dentinário (HENNEQUIN; PAJOT; AVIGNANT, 1994; TARTARI, et al 2013; NIKHIL et al. 2016). Qualquer mudança na razão $\text{Ca}^{+2}/\text{PO}_4^{3-}$ pode modificar a proporção original dos componentes orgânicos e inorgânicos, que, por sua vez, pode alterar a permeabilidade, a microdureza, a rugosidade e a solubilidade da dentina radicular e, conseqüentemente, afetar a capacidade de selamento e adesão dos cimentos resinosos à dentina (DOGAN; QUALT, 2001; SALEH et al., 2002; HASHEM et al., 2009; COBANKARA; ERDOGAN; HAMURKU, 2011). A adesão à dentina depende da presença de Ca^{+2} residual na superfície; portanto, a diminuição de Ca^{+2} na superfície pode significar redução na capacidade adesiva de certos materiais (BALLAL; MALA; BHAT, 2011). Estudos demonstraram que o uso do EDTA como solução irrigadora final diminuiu a razão de $\text{Ca}^{+2}/\text{PO}_4^{3-}$ na dentina radicular de forma significativa (SAYIN et al., 2007), pois é capaz de desmineralizar a dentina superficialmente por meio da ligação dos íons de cálcio (GALLER et al., 2015).

Todas essas alterações à dentina podem comprometer a higidez dos dentes tratados endodonticamente em longo prazo, o que determina a necessidade da adoção de novas estratégias para o manejo clínico de dentes com infecções endodônticas para, além de desinfetar os canais radiculares, preservar e possivelmente melhorar a estabilidade mecânica e biológica da dentina (PERSADMEHR et al., 2014).

Vários agentes de ligação químicos sintéticos e naturais têm sido estudados para aumentar as ligações cruzadas de colágeno inter e intra-moleculares e neutralizar as MMPs (metaloproteínas) para estabilizar o colágeno da dentina (BEDRAN-RUSSO et al., 2007; BRESCHI et al., 2010) e, assim, melhorar as propriedades mecânicas e biológicas do colágeno e lhe fornecer maior resistência à degradação enzimática das suas fibrilas (HAN et al., 2003). Conseqüentemente, melhorar as propriedades mecânicas e aumentar a

resistência do colágeno da dentina à degradação enzimática (BEDRAN-RUSSO et al., 2007; BEDRAN-RUSSO et al., 2011).

Outro reforço para a matriz de colágeno pode ser encontrado nas soluções irrigadoras que melhorem essas ligações cruzadas com as fibrilas colágenas (EVERAERTS et al., 2004; MADHAVAN et al., 2010). Tem-se buscado melhorar as propriedades biológicas e mecânicas do colágeno com o reforço da sua matriz, mediante o uso de substâncias como a Quitosana (SHRESTHA; FRIEDMAN; KISHEN, 2011). Essa substância é derivada da desacetilação da quitina obtida das cascas de crustáceos (SHI et al., 2006). É um biopolímero hidrofílico com grande número de grupos hidroxila e amino livres (RABEA et al., 2003), não tóxico, antifúngico, antioxidante, anti-inflamatório, cicatrizante, biocompatível e biodegradável (WANG et al., 2003; MADHAVAN et al., 2010; TAVARIA et al., 2013). Apresenta largo espectro antimicrobiano (LIU et al., 2001; RAAFAT; SAHL, 2009), e pode aumentar a resistência do colágeno frente à degradação enzimática pelas MMPs (RABEA et al., 2003; KISHEN; SHRESTHA; NEOH, 2008; SHRESTHA et al., 2010; PERSADMEHR et al., 2014; DEL CARPIO-PEROCHENA et al., 2015) e age como quelante (RABEA et al., 2003). Possui capacidade de se ligar com as fibrilas de colágeno por meio de atração eletrostática, envolvendo-as, o que aumenta a resistência do colágeno exposto e o protege da ação das collagenases (SILVA et al., 2012; PERSADMEHR et al., 2014), ação esta importante na preservação do colágeno, que é fator determinante na imbricação mecânica do cimento endodôntico à dentina radicular (NEELAKANTAN et al., 2011; NEELAKANTAN et al., 2015).

A propriedade antibacteriana da quitosana é atribuída à sua natureza policatiónica, que faz com que interaja com a parede carregada negativamente da bactéria, altera a sua permeabilidade celular e resulta na saída dos seus componentes intracelulares (DEL CARPIO-PEROCHENA et al., 2015).

De acordo com Persadmehr et al. (2014), existe afinidade entre a quitosana e a colagenase, que faz com que proteja as fibrinas de colágeno ao bloquear o acesso às MMPs, como também ao dificultar as suas ações. Atualmente, existem algumas aplicações da quitosana na Odontologia, como em dentifrícios (EFSTRATIOU et al., 2007; VERKAİK et al., 2011), cimentos endodônticos (KISHEN et al., 2008; LI et al., 2010) e também em cones de guta-percha (JIA; ALPERT, 2007), com eficácia comprovada (TAVARIA et al., 2013). Esse biopolímero é capaz de melhorar as propriedades mecânicas da dentina radicular (DEL CARPIO-PEROCHENA et al., 2015).

Além destas inúmeras propriedades, a quitosana é o polieletrólito policatiônico que tem uma forte carga positiva com pH baixo, e por apresentar um forte potencial zeta positivo que adsorve facilmente as superfícies com forte potencial zeta negativo em relação à estrutura dentária, possui a capacidade de formar uma camada aderida à dentina, que a protegerá contra os ataques ácidos (GANSS et al., 2011).

Ballal; Mala; Bhat (2011) utilizaram o biopolímero como veículo junto à pasta de hidróxido de cálcio, na medicação intracanal, o que promoveu a liberação prolongada de íons cálcio. Como solução irrigadora durante a irrigação final do canal radicular, a quitosana a 0,2% mostrou-se eficiente na remoção da camada de *smear*, na desobstrução dos túbulos dentinários, com efeito erosivo praticamente desprezível (SILVA et al., 2012). Apesar de demonstrar bons resultados, não existe estudo que elucide a sua atuação como solução irrigadora na dentina durante o preparo biomecânico e sua relação com o material obturador.

Soluções irrigadoras que degradam o colágeno, como o NaOCl, devem ser estudadas, acompanhando assim a evolução dos cimentos endodônticos (PASCON et al., 2009).

Diante das questões expostas, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência das soluções irrigadoras utilizadas durante a instrumentação dos canais radiculares quitosana a

0,2%; hipoclorito de sódio a 1% e EDTA a 17% sobre a dentina, por meio da Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) e, microscopia confocal a laser.

Objetivos

2. Objetivo Geral:

Analisar a influência das soluções irrigadoras Quitosana a 0,2%, Hipoclorito de sódio a 1% e EDTA a 17% nos componentes orgânicos e inorgânicos da superfície dentinária radicular nas diferentes etapas do tratamento endodôntico, por meio da Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) e microscopia confocal a laser.

2.1 Objetivos específicos:

2.1.1- Avaliar, por meio da Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), o efeito das seguintes soluções irrigadoras utilizadas durante o tratamento endodôntico em diferentes intervalos de tempo, sob o conteúdo orgânico e inorgânico das paredes dentinárias dos canais radiculares: 1- Quitosana a 0,2%; 2-Hipoclorito de sódio a 1% e 3-EDTA a 17%.

2.1.2- Analisar os efeitos das soluções irrigadoras Quitosana a 0,2% e Hipoclorito de sódio a 1%, utilizadas durante o preparo biomecânico dos canais radiculares, e EDTA a 17% e Quitosana a 0.2% empregadas durante a irrigação final, sobre a dentina radicular (número de túbulos abertos e seus respectivos perímetros e rugosidade da superfície dentinária), além de suas influências sob a interface material obturador/dentina após a obturação dos canais radiculares (penetração do cimento endodôntico no interior dos túbulos dentinários) por meio de microscopia confocal a laser.

Materiais e Métodos

Delineamento experimental

O presente estudo foi fatorial (2x3x3), tendo como o fator grupo das soluções irrigadoras em dois níveis (Quitosana a 0,2%, Hipoclorito de sódio a 1%), o fator tempo em três níveis, ou seja, *baseline* - antes do início do tratamento endodôntico; após a irrigação durante o preparo biomecânico com a primeira solução (Quitosana a 0,2%, Hipoclorito de sódio a 1%); e após a irrigação final com a segunda solução (EDTA a 17%, Quitosana a 0,2%) e lavagem com a primeira solução utilizada (Quitosana a 0,2%, Hipoclorito de sódio a 1%); e fator terço (cervical, médio e apical).

Os corpos de prova foram raízes de caninos superiores humanos (n=34), sendo separadas 10 para o FTIR e 24 para as outras análises no microscópio confocal a laser.

Os fatores foram avaliados quantitativamente quanto aos aspectos moleculares por meio da Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (Fase 1), sendo que, nessa fase, o fator tempo foi dividido em 4 níveis. Foram analisadas as paredes dentinárias, quantitativamente, em cada etapa do tratamento endodôntico por meio da microscopia confocal, em relação à abertura e perímetro dos túbulos dentinários, rugosidade da superfície, além da sua interface material obturador/dentina após obturação (Fase 2).

Seleção da amostra

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (CEP/FORP-USP) pelo CAAE nº 39629314.0.0000.5419 (Anexo 1).

Foram obtidos, do biobanco de dentes da FORP-USP, 34 caninos superiores humanos hígidos, mantidos em solução de timol a 0,1%. Em seguida, os dentes foram lavados em água corrente por 24 horas e com o auxílio do ultrassom (Profi II Ceramic, Dabi Atlante Ltda, Ribeirão Preto, SP, Brasil) tiveram suas superfícies radiculares externas limpas. Cada espécime ficou imerso em tubo de ensaio com soro fisiológico e foram armazenados em estufa (ECB 1.2 Odontobrás, Ribeirão Preto, SP, Brasil) a 37° C, 100% de umidade relativa, por 72 horas, visando à sua reidratação.

Com a finalidade de padronizar a amostra, os dentes foram radiografados individualmente, nos sentidos orto e méso-radial com filme Ektaspeed EP (Kodak Brasileira Comércio e Indústria Ltda, São José dos Campos, SP, Brasil), tempo de exposição de 0,5 segundos e distância objeto-filme de 10 cm. As radiografias foram avaliadas com auxílio de negatoscópio (Konex, Konex Ind. e Com. de Metais LTDA, São Paulo, SP, Brasil).

Dessa forma foram selecionados dentes unirradiculares, com raízes completamente formadas, com ausência de calcificações, reabsorções, trincas e fraturas, sem achatamentos e curvatura acentuados.

Preparo das soluções

As soluções empregadas foram produzidas no Laboratório de Gerenciamento de Resíduos da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, e preparadas com reagentes de grau analítico e água purificada por meio de sistema de Osmose Reversa com Luz Ultravioleta (Quimis, Diadema, SP, Brasil), com condutividade elétrica inferior a 1 μ S.

Hipoclorito de sódio 1% (NaOCl)

A concentração da solução de NaOCl foi determinada pelo método de titulação iodométrica indireta, e mantida a 1,0 %.

Determinação do Teor de Hipoclorito de Sódio

Com uma pipeta, foram transferidos 5 mL de volume da solução de hipoclorito de sódio preparada a 1,0 % para um balão volumétrico de capacidade 100 mL, com 50 mL de água deionizada no seu interior, e se completou o volume até o menisco, após o que se homogeneizou o conteúdo.

Em um *erlenmeyer* de 125 mL, com uma pipeta volumétrica, foram adicionados 30 mL de água deionizada, 10 mL de iodeto de potássio (KI), 10% (m/v) e 10 mL da solução da amostra.. Foram acrescentados 5 mL de ácido acético glacial com uma pipeta graduada. Em seguida, foi realizada a titulação da amostra com tiossulfato de sódio $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$. Quando a solução ficou quase incolor, adicionou-se o indicador amido a 1,0 %, deixando a solução azul para facilitar a visualização da mudança de cor, e se titulou novamente até que a solução ficasse totalmente incolor. O volume de equivalência foi anotado para o cálculo do teor percentual de cloro-ativo nas amostras de hipoclorito de sódio.

Solução de ácido etilenodiaminotetraacético dissódico (EDTA 17%)

Em um béquer para 200 mL, pesaram-se 17 gramas de EDTA (Merck) e adicionaram-se 100 mL de água deionizada. A solução formada, com coloração branca, foi agitada por meio de um agitador magnético e, em seguida, gotejou-se lentamente o hidróxido de sódio 5 mol.L^{-1} , até que se obtivesse pH 7,25. Nesse momento, a solução que se encontrava com coloração branca, tornou-se límpida e

transparente. O pH da solução foi aferido por meio de um pHmetro Analion®. O EDTA, após ser aviado, foi colocado em recipiente plástico âmbar, dotado de batoque e tampa.

Quitosana 0,2%

Em um béquer para 200 mL, foi pesado 0,2 grama de quitosana (ACROS Organics) e adicionaram-se 100 mL de ácido acético 1,0 %. A mistura, que inicialmente é heterogênea, foi agitada por meio de agitador mecânico por 2 horas, aproximadamente. Ao final, obteve-se mistura homogênea cristalina, com pH 3,2.

PRIMEIRA FASE

Preparo das amostras

Para a primeira fase desse estudo, foram utilizados 10 caninos superiores humanos hígidos. Cada dente foi fixado em uma base de acrílico (lâmina de plexiglass) com auxílio de cera para escultura (Kota Ind. e Com. Ltda, São Paulo-SP, Brasil), aquecida em gotejador elétrico (Guelfi Equipamentos, Ribeirão Preto-SP, Brasil).

Foi realizado a princípio um corte longitudinal do dente, de modo a obter uma secção de 2 mm de largura de todo comprimento do dente da região do canal radicular, com o auxílio de dois discos diamantados de 0,3 mm de espessura (South Bay Technology, San Clement, CA, EUA), separados por um espaçador de 2mm entre eles, em baixa rotação, montados na máquina de corte (Minitrom, Struers A/S, Copenhagen, DK-2610, Dinamarca), sob constante irrigação (Figura 1A). Em seguida, o fragmento obtido foi fixado em uma base de acrílico com o auxílio de cera

para escultura (Figura 1B) e foram feitos cortes no sentido sagital para obtenção de fragmentos dos três terços do canal radicular (Figura 1C). Por fim, esses fragmentos foram divididos ao meio na região do canal (Figura 1D), de modo a adquirir 6 fragmentos de dentina do canal radicular com área de 4 mm² de cada dente, sendo dois fragmentos de cada terço do canal (cervical, médio e apical), totalizando 60 fragmentos. Os fragmentos foram planificados nas faces correspondentes ao canal radicular e parede externa do dente, com lixas de granulação 1200 e máquina politriz giratória (APL-4, Arotec S/A Ind. E Comércio, São Paulo, SP, Brasil) (Figura 1E), tomando-se o cuidado para remover a menor quantidade de dentina radicular interna, de forma que a superfície dentinária ficasse o mais paralela possível à parede externa da amostra e apresentasse espessura de 2mm. Os fragmentos foram armazenados em *eppendorf* (Micro Test Tubes 3810X standard; Eppendorf do Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil) com água destilada a 4º C (Figura 1F) até o momento da análise pelo FTIR.

Figura 1. (A) Corte longitudinal do dente para obtenção da secção de 2 mm de largura de todo comprimento do dente da região do canal radicular, com o auxílio de dois discos flexíveis diamantados separados por um espaçador de 2mm entre eles, em baixa rotação, montados na máquina de corte, sob constante irrigação; (B) Fixação do fragmento cortado para posicionamento na máquina de corte novamente; (C) Fragmentos referentes aos três terços do canal radicular; (D) Divisão dos fragmentos de cada terço ao meio, na região do canal radicular; (E) Planificação das faces correspondentes ao canal radicular e parede externa do fragmento com lixas de granulação 1200 (politriz); (F) Armazenamento em tubo *ependorf* com água destilada.

As unidades experimentais foram 60 espécimes de dentina radicular, sendo 15 destinadas para cada protocolo de irrigação e, por fim, foram subdivididos aleatoriamente em 3 subgrupos, de acordo com cada terço radicular ($n=5$) (Figura 2). As variáveis de resposta quantitativa para o estudo foram as razões carbonato/fosfato (componente inorgânico) e amida/fosfato (componente orgânico)

presentes nos diferentes tempos pré-determinados, analisadas por meio de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).

Figura 2. Fluxograma da distribuição dos grupos e subgrupos experimentais.

Sequência de irrigação para cada grupo

Cada fragmento foi colocado em contato com as soluções correspondentes a cada grupo de sequência de irrigação de acordo com o tempo pré-determinado, simulando o tempo em que ocorreria a irrigação durante todas as fases do preparo químico-mecânico no tratamento endodôntico convencional, para cada solução como descrito na Tabela 1. Os tempos foram determinados em um estudo piloto, no qual foi cronometrado o tempo de irrigação para reprodução no projeto.

Em seguida, a porção correspondente à dentina radicular foi submetida à análise da razão do carbonato/fosfato (matéria inorgânica) e amida/fosfato (matéria orgânica), empregando-se a reflexão totalmente atenuada (ATR) acoplada ao Espectrômetro de FTIR (Nicolet-380 FT-IR Spectrometer) (Figura 3A). Esta medida foi realizada antes e após contato com cada solução, totalizando quatro medidas por

fragmento, conforme detalhado a seguir na Tabela 1. A primeira medida foi realizada no fragmento sem nenhum tratamento (*baseline* – Tempo 0). A segunda, depois de imerso por 6 minutos na primeira solução irrigadora, simulando o contato da solução irrigadora durante a irrigação na instrumentação do canal radicular (Tempo 1). A cada 1 minuto, a solução foi trocada para simulação da irrigação após cada troca de instrumento durante o preparo biomecânico. A terceira foi obtida após imersão por 3 minutos na segunda solução, simulando a irrigação final com a segunda solução feita antes da obturação dos canais radiculares (Tempo 2). E, por fim, a última medida foi realizada após contato novamente com a primeira solução irrigadora utilizada, por 1 minuto, simulando a lavagem final como é feito durante o tratamento endodôntico após a irrigação com a segunda solução (Tempo 3).

Tabela 1. Divisão dos grupos experimentais conforme a sequência das soluções irrigadoras utilizadas durante o preparo biomecânico dos canais radiculares estudados.

Grupos	Exposição à primeira solução irrigadora (6 min) – Tempo 1	Exposição à segunda solução irrigadora (3min) – Tempo 2	Exposição à primeira solução irrigadora utilizada, para lavagem final (1 min) – Tempo 3
H+E+H	Hipoclorito de sódio a 1%	EDTA a 17%	Hipoclorito de sódio a 1%
H+Q+H	Hipoclorito de sódio a 1%	Quitosana a 0.2%	Hipoclorito de sódio a 1%
Q+Q+Q	Quitosana a 0.2%	Quitosana a 0.2%	Quitosana a 0.2%
Q+E+Q	Quitosana a 0.2%	EDTA a 17%	Quitosana a 0.2%

Para simulação do efeito físico da solução irrigadora durante o preparo biomecânico, o fragmento foi colocado dentro de um *ependorf* (Micro Test Tubes 3810X standard; Eppendorf do Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil), imerso na solução indicada para cada etapa, e o conjunto permaneceu numa lavadora ultrassônica (USC-700, Unique Indústria e Comércio de Produtos Eletrônicos Ltda, São Paulo, SP, Brasil) preenchida até a marcação recomendada pelo fabricante com água, a qual foi ligada 15 segundos a cada 1 minuto (Figura 3B). Após cada tempo pré-determinado, as amostras foram secas com lençóis absorventes e posicionadas no aparelho FTIR para o início da medição.

Figura 3 (A) Espectrômetro de FTIR (Nicolet-380 FT-IR Spectrometer); **(B)** Lavadora ultrassônica

Análise pela Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

As mudanças químicas promovidas pelas soluções irrigadoras na dentina foram avaliadas pela Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).

Para cada medição, o fragmento foi posicionado sobre uma janela de diamante, num acessório de reflexão totalmente atenuada – ATR (Attenuated Total Reflectance) com diâmetro de 2 mm (DuraScopeTM: Smiths Detection, Danbury-CT,

EUA), acoplado ao Espectrômetro de Infravermelho por Transformada de Fourier (Nicolet-380 FT-IR Spectrometer: Nicolet, Vernon Hills-II, EUA).

Para mensurar a matéria inorgânica, calculou-se a razão do carbonato/fosfato e, para a matéria orgânica, a razão amida/fosfato dos fragmentos de cada grupo experimental (Figura 4).

Figura 4. Espectro de absorvância da dentina, com destaque para as bandas de Amida III, Carbonato (CO₃²⁻) e Fosfato (PO₄³⁻), utilizados para determinar a quantidade de matéria orgânica e inorgânica.

Após mensuração de cada fragmento de dentina, foi gerado um espectro de absorvância, no qual foi possível observar as bandas do carbonato, da amida III e do fosfato em cada tempo, o que possibilitou a visualização do comportamento de cada uma (Figuras 5,6,7).

Figura 5. Espectro de absorvância da banda de Carbonato (CO_3^{2-}) utilizado para determinar a quantidade de matéria inorgânica, nos diferentes tempos analisados.

Figura 6. Espectro de absorvância da banda de Fosfato (PO_4^{3-}) utilizado para determinar a quantidade de matéria orgânica e inorgânica, nos diferentes tempos analisados.

Figura 7. Espectro de absorvância da banda de Amida III utilizado para determinar a quantidade de matéria orgânica, nos diferentes tempos analisados.

SEGUNDA FASE

Distribuição dos grupos

As unidades experimentais foram 24 dentes, divididos aleatoriamente em 4 grupos (n=6) (Figura 8A). As variáveis de resposta quantitativa para o estudo foram o número e perímetro dos túbulos expostos nos diferentes tempos e a rugosidade da superfície antes (*baseline*) e após cada fase do tratamento, além da penetração do cimento endodôntico, avaliada na interface material obturador/dentina, após a obturação dos espécimes (Tempo 3), por meio de microscopia confocal a laser.

Preparo das amostras

Cada dente foi fixado com cera utilidade (Wilson, Polidental, Cotia, SP, Brasil) em um delineador, de forma que ficasse centralizado nas matrizes de silicone, que foram preenchidas pela resina acrílica autopolimerizável (Jet Clássico, São Paulo, SP, Brasil), a fim de realizar a inclusão dos dentes em blocos de resinas transparentes.

Após a polimerização do material, o conjunto do dente incluído na resina acrílica foi fixado em base de acrílico (lâmina de *plexiglass*) com auxílio de cera para escultura (Kota Ind. E Com. Ltda, São Paulo, SP, Brasil) aquecida em gotejador elétrico (Guelfi Equipamentos, Ribeirão Preto, SP, Brasil) e tiveram suas coroas cortadas na junção cimento-esmalte (Figura 8B) e descartadas. Um segundo corte foi feito axialmente (Figura 8C) separando o conjunto na área de maior diâmetro do canal radicular com auxílio do disco diamantado de 0,3 mm de espessura (South Bay Technology, San Clement, CA, EUA) montado em máquina de corte (Minitrom, Struers A/S, Copenhagen, DK-2610, Dinamarca), obtendo-se duas hemi raízes (Figura 8D).

Foi então realizada a primeira captura de imagem por meio da microscopia confocal de uma hemi raiz de cada corpo de prova (*baseline – T0*). Para isso, cada corpo de prova foi posicionado paralelamente à mesa do microscópio confocal a laser 3D (Ixt ols4000, Olympus Corporation, Japão) para obtenção das duas imagens de cada terço do canal radicular com aumento da lente objetiva de 216x e 430x de magnificação. O ponto inicial para marcação de cada corpo de prova foi a partir do canto superior direito do bloco de resina visualizado pela imagem gerada na tela do monitor acoplado ao microscópio confocal a laser. A partir desse ponto, foi percorrida verticalmente uma distância até o meio do canal radicular e

horizontalmente até o centro do canal (individualmente de acordo com o tamanho da raiz). No centro do canal radicular, na metade da raiz, foi feita a primeira imagem (terço médio) e, a partir dessa medida, foi percorrido, em direção apical, mais $\frac{1}{4}$ da distância radicular e, na região central do canal radicular, foi realizada outra imagem (terço apical). A imagem do terço cervical foi realizada na distância de $\frac{1}{4}$ a partir da região central da metade da raiz em direção a cervical (Figura 9). Todas essas medidas entre os pontos foram anotadas para cada corpo de prova, a fim de que as demais imagens fossem capturadas nas próximas etapas do tratamento endodôntico no mesmo ponto, para posteriores comparações.

Figura 8. Preparo dos espécimes: **(A)** Seleção dos dentes e armazenamento em potes de acrílico numerados e dispostos sequencialmente; **(B)** Máquina de corte Isomet® 1000 com espécime adaptado ao dispositivo de fixação na máquina de corte (corte das coroas na junção cimento-esmalte); **(C)** Corte axialmente separando o conjunto na área de maior diâmetro do canal radicular; **(D)** Visualização das hemi raízes após o corte; **(E)** Conjunto encaixado em sua posição original com o auxílio da fita adesiva dupla face VHB da 3M na base e nos dois lados que foram seccionados.

Figura 9. Esquema dos pontos de captura das imagens em cada terço avaliado. No centro do canal radicular, na metade da raiz, foi feita a primeira imagem (terço médio) e, a partir dessa medida, foi percorrido, em direção apical, mais $\frac{1}{4}$ da distância radicular e, na região central do canal radicular, foi realizada outra imagem (terço apical). A imagem do terço cervical foi realizada na distância de $\frac{1}{4}$ a partir da região central da metade da raiz em direção a cervical.

Em seguida, o conjunto foi encaixado em sua posição original com o auxílio da fita adesiva dupla face VHB da 3M na base e nos dois lados que foram seccionados (Figura 8E), e presos por uma morsa pelos dois outros lados sem a fita, para o início da instrumentação (Figura 10A).

Com o corpo de prova posicionado, o canal radicular foi irrigado e inundado com 2 mL da solução irrigadora de acordo com cada grupo e a cada troca de instrumento, usando-se seringa plástica descartável (Ultradent Products Inc., South Jordan, UT, EUA) e agulha NaviTip 30ga (Ultradent Products Inc., South Jordan, UT, EUA). A exploração do canal foi realizada com lima manual #10 tipo K de aço inox (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça) seguida do preparo com brocas LA Axxess 20.06, 35.06, 45.06 (Sybron Endo, Orange, CA, EUA) montadas em micromotor, em baixa rotação e sem irrigação. Essas brocas foram introduzidas uma única vez no sentido do longo eixo do canal até a profundidade correspondente a um terço do comprimento do dente, para remoção do ombro palatino e preparo da região cervical.

O canal radicular foi novamente irrigado com 2 mL da solução correspondente, e uma lima manual #10 tipo K de aço inox (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça) foi cuidadosamente introduzida no interior do canal até que sua ponta coincidisse com o forame apical, alcançando o comprimento real do dente (CRD). Em seguida, foi subtraído 1 mm do CRD, e estabelecido o comprimento de trabalho (CT). Foram selecionados 24 caninos superiores que apresentassem diâmetro anatômico na extremidade apical do comprimento de trabalho determinado clinicamente em 250 µm.

O preparo biomecânico dos canais radiculares foi realizado com sistema rotatório K3 (Sybronendo, Orange, CA, USA), acionados por motor elétrico (VDW Silver, VDW GmbH, Munique, Alemanha), com velocidade de 350 rpm e torque de 2 Ncm, na sequência: 30/.04, 30/.06, 35/.04, 40/.04, 45/.04, 50.04, 55.04 e por fim 60.04 (Figura 10B). Os instrumentos com *taper* .04 foram introduzidos até o CT, e os instrumentos com *taper* .06 apenas no terço médio/cervical do canal, afim de

remover alguma interferência cervical que impedisse que os demais instrumentos percorressem todo o CT. Todas as limas foram descartadas a cada 3 dentes instrumentados.

Figura 10. (A) Fixação do conjunto na morsa; **(B)** Instrumentação do corpo de prova.

Durante a fase de instrumentação, os dentes foram divididos aleatoriamente em dois grupos e irrigados com 2 mL das diferentes soluções pré-estabelecidas para cada grupo, sendo elas o hipoclorito de sódio a 1% e Quitosana a 0,2%, a cada troca do instrumento, como apresentado na Figura 11, totalizando volume aproximadamente de 18 mL.

Figura 11. Esquema dos grupos experimentais.

Finalizada a fase de instrumentação e irrigação de acordo com o estabelecido para cada grupo experimental, foram realizadas novamente as imagens pela microscopia confocal nas mesmas marcações feitas anteriormente para cada corpo de prova (T1).

Novamente, o corpo de prova foi posicionado na morsa como descrito anteriormente e realizada a irrigação com 5 mL com a segunda solução correspondente ao grupo experimental, por 3 minutos. Em seguida, foi realizada a aspiração do canal radicular e lavagem com 5 mL da primeira solução irrigadora utilizada na fase de instrumentação. Os canais foram secos com pontas de papel absorventes #60.04 (Dentsply Maillefer, Petrópolis, Brasil) e foram capturadas as imagens pela microscopia confocal, nas mesmas posições (T2).

Essas imagens capturadas até o presente momento (T0, T1 e T2) foram analisadas quanto ao número e perímetro de túbulos abertos e também foi quantificada a rugosidade das superfícies.

Para a etapa de obturação, uma metade do corpo de prova foi isolada com vaselina líquida aplicada com um *microbrush*; e novamente posicionado da mesma forma na morsa. Em seguida, os espécimes foram obturados pela técnica de condensação lateral ativa utilizando cone principal de guta-percha de tamanho correspondente ao diâmetro cirúrgico (#60.04) da extremidade apical do comprimento de trabalho (Dentsply Maillefer, Baillagues, Suíça), e cones acessórios R8 (Dentsply Maillefer, Baillagues, Suíça), associados ao cimento AH Plus (Dentsply, De Trey, Konstanz, Alemanha), manipulado de acordo com as recomendações do fabricante.

Finalizada a obturação, o excesso de material obturador foi cortado com instrumento hollembach aquecido e, em seguida, a condensação vertical foi realizada com auxílio de condensador de Paiva a frio, com pressão leve e firme em direção apical. Em seguida, foram vedados com cimento de óxido de zinco e eugenol (Cimpat, Septodont Brasil Ltda., Barueri, SP, Brasil), e armazenados na estufa (ECB 1.2 Odontobrás, Ribeirão Preto, SP, Brasil) a 37° C e 100% de umidade relativa, devidamente separados e etiquetados de acordo com a sequência de soluções irrigadoras utilizadas, pelo tempo de 24 horas, correspondente a 3 vezes o tempo de endurecimento do cimento endodôntico utilizado de acordo com o fabricante. Em seguida, o corpo de prova foi aberto, e a hemi raiz que não foi isolada teve a superfície polida, por meio da máquina politriz giratória (APL-4, Arotec S/A Ind. E Comércio, São Paulo, SP, Brasil), com discos de feltro de 0,3 e 0,5 µm, juntamente com os líquidos para preparação metalográfica de alumina (Arotec

Sj685/A Ind. E Comércio, São Paulo, SP, Brasil) (Figura 12A). No momento da análise da interface material obturador/dentina pelo microscópio confocal a laser, as superfícies foram submetidas ao condicionamento com ácido fosfórico 37% por 10 segundos, lavadas com água destilada e secas com papel toalha absorvente (T3) (Figura 12B).

Figura 12. (A) Polimento da hemi raiz por meio da máquina politriz giratória (APL-4, Arotec S/A Ind. E Comércio, São Paulo, SP, Brasil), com discos de feltro de 0,3 e 0,05 μm , juntamente com os líquidos para preparação metalográfica de alumina (Arotec Sj685/A Ind. E Comércio, São Paulo, SP, Brasil); **(B)** Hemi raiz após polimento.

Na sequência, foram novamente posicionados paralelamente à mesa do Microscópio Confocal de Varredura a Laser (LEXT, 3D Measuring Laser Microscope OLS 4000, Olympus Corporation) para obtenção de imagens da interface material obturador/dentina, por meio do *software* OLS4000.

O corpo de prova foi posicionado junto ao aparelho, que permitiu a obtenção de imagens fornecida pela objetiva de 430x e 1074x de magnificação da interface material obturador/dentina. Foram capturadas as imagens correspondentes aos três terços do canal radicular, para possibilitar a visualização da profundidade de penetração do cimento no interior dos túbulos dentinários (*tags*) em cada terço.

O ponto inicial da marcação foi 1 mm a partir do início da obturação do corpo de prova para captura da imagem com aumento de 430x e 1074x (Figura 13A,B).

Figura 13. Imagens do terço cervical da amostra com magnificação por meio do Microscópio confocal **(A)** Visualização da interface material obturador/dentina do terço cervical e captura da imagem no aumento de 430x; **(B)** Visualização da interface material obturador/dentina do terço cervical e captura da imagem com a função Laser no aumento de 1074x.

A partir desse ponto; foi percorrida horizontalmente a distância até a metade da raiz (individualmente de acordo com o tamanho da raiz). No meio da raiz, foi feita a primeira imagem (terço médio) da interface material obturador/dentina. A partir dessa medida, foi percorrido, em direção apical, mais $\frac{1}{4}$ da distância radicular e realizada outra imagem (terço apical). Para a medida do terço cervical, foi distanciado $\frac{1}{4}$ a partir do meio da raiz em direção a cervical, correspondendo ao terço cervical (Figura 14).

Figura 14. Esquema dos pontos de captura das imagens em cada terço avaliado. Foi percorrida horizontalmente a distância até a metade da raiz (individualmente de acordo com o tamanho da raiz). No meio da raiz, foi feita a primeira imagem (terço médio) da interface material obturador/dentina. A partir dessa medida, foi percorrido, em direção apical, mais $\frac{1}{4}$ da distância radicular e realizada outra imagem (terço apical). Para a medida do terço cervical, foi distanciada $\frac{1}{4}$ a partir do meio da raiz em direção a cervical, correspondendo ao terço cervical.

Obtidas todas as imagens, foi mensurada a extensão linear da penetração do cimento endodôntico através dos túbulos dentinários (*tags*). As mensurações foram realizadas por meio do mesmo programa de aquisição das imagens (LEXT, 3D Measuring Laser Microscope OLS 4000, Olympus Corporation), utilizando-se uma régua de medida digital.

Todas as etapas do tratamento endodôntico foram realizadas por um único operador com experiência clínica e especialista em endodontia. Foram instrumentados e obturados apenas 2 dentes por dia. A cada fase do tratamento, os dentes eram avaliados pela microscopia confocal.

Análise da rugosidade, perímetro e contagem de túbulos em microscopia confocal a laser.

Durante cada etapa na fase 2 (antes da instrumentação – T0, depois da instrumentação –T1 e após a irrigação final -T2), os espécimes foram posicionados paralelamente à mesa do microscópio confocal a laser 3D (LEXT OLS4000, Olympus Corporation, Japão) para obtenção das imagens da dentina radicular nas diferentes regiões com aumento de 216x e 430x, por meio do *software* OLS4000. Foi tomado o cuidado para que todas as imagens fossem realizadas na mesma região para as diferentes etapas avaliadas, como já foi mencionado anteriormente.

A partir das imagens com 430x de magnificação obtidas, foi analisado o número e o perímetro dos túbulos abertos para determinar se as soluções irrigadoras influenciam na desobliteração dos túbulos dentinários. Para isso, as imagens obtidas foram realizadas com o ROI de 0,71 mm² de cada terço da dentina radicular e, por meio do *software* OLS 4000, foram localizados os túbulos em cada imagem. Uma vez localizados os túbulos, o *software* calculou o número de túbulos, e o perímetro (µm) do lúmen dos túbulos (Figura 15).

Figura 15. Determinação do perímetro e número dos túbulos por meio da microscopia confocal a laser 3D (LEXT OLS4000, Olympus Corporation, Japão). As imagens obtidas foram realizadas com o ROI (quadro amarelo) de 0,71 mm² de cada terço da dentina radicular e, por meio do *software* OLS 4000, foram localizados os túbulos (correspondentes aos pontos azuis) em cada imagem. Uma vez localizados os túbulos, o *software* calculou o número de túbulos (números em vermelho), e o perímetro (μm) do lúmen dos túbulos.

Para análise da rugosidade da superfície, foram obtidas imagens com 216x de aumento de cada região avaliada, e sempre na mesma localização nas diferentes etapas do tratamento endodôntico. A rugosidade foi determinada para verificar se as soluções irrigadoras promoveram distintos padrões de texturas na superfície. Em cada imagem, foi calculada a rugosidade de superficial Sa (μm) de toda a região avaliada (Figura 16).

Figura 16. Determinação da rugosidade da superfície por meio da microscopia confocal a laser 3D (LEXT OLS4000, Olympus Corporation, Japão). Imagens com 216x de aumento das regiões que tiveram suas imagens capturadas correspondentes aos três terços radiculares.

Análise da interface material obturador/dentina pela Microscopia Confocal

A partir das imagens obtidas após a obturação do canal radicular (T3) por meio do Microscópio Confocal de Varredura a Laser (LEXT, 3D Measuring Laser Microscope OLS 4000, Olympus Corporation), com auxílio do *Software* OLS 4000, foi avaliada a penetração do cimento no interior dos túbulos dentinários da dentina radicular nos diferentes terços.

Para a avaliação da penetração do cimento, foram realizadas 30 medidas em cada imagem de cada terço, no aumento de 1074x, a partir da parede do canal radicular, seguindo a trajetória dos túbulos dentinários até o ponto mais distante dos

tags, das quais obteve-se uma média. A partir dos valores de cada terço, foi determinada a média de penetração do cimento nos túbulos dentinários em cada hemi raiz (Figura 17).

Figura 17. Ilustração da mensuração das 30 medidas nas imagens capturadas dos terços radiculares das amostras após a obturação, para determinação da penetração do cimento com auxílio do microscópio confocal a laser. As medidas (traços azuis) foram realizadas a partir da parede do canal radicular, seguindo a trajetória dos túbulos dentinários até o ponto mais distante dos tags.

Análise dos dados

Uma vez que os dados da razão da composição inorgânica e orgânica da primeira fase apresentaram distribuição normal (Shapiro-Wilk, $p > 0,05$) e homogeneidade de variância (teste de Levene, $p > 0,05$), foram utilizados testes paramétricos para a análise estatística destes dados. A análise de variância

ANOVA a dois critérios com repetições foi utilizada para avaliar a influência do tratamento de superfície (G1 - NaOCl + EDTA + NaOCl; G2 - NaOCl + Quitosana + NaOCl; G3 - Quitosana+ Quitosana + Quitosana; G4 - Quitosana + EDTA + Quitosana) nos diferentes tempos (T0 – *baseline*; T1 – após contato com a primeira solução durante 6 minutos, T2 - após contato com a segunda solução durante 3 minutos, T3 - após contato com a primeira solução utilizada anteriormente durante 1 minuto) e terços radiculares (cervical, médio e apical) nos valores de razão da composição inorgânica e orgânica. Foi utilizado o teste de Tukey para comparações múltiplas entre os grupos.

Para fase 2, todos os dados foram tabulados para investigação estatística a fim de determinar: 1) a influência da quitosana 0,2% e do hipoclorito de sódio a 1% como solução irrigadora 2) a influência da quitosana a 0,2% e do EDTA a 17% como solução utilizada no tratamento final antes da obturação, nos diferentes terços radiculares. Os dados obtidos foram submetidos aos testes Shapiro-Wilk ($p>0,05$) e teste de Levene ($p>0,05$) para analisar a distribuição normal dos valores e a homogeneidade de variância, respectivamente. De acordo com o resultado (paramétricos ou não paramétricos), foram determinados os testes para a comparação entre os grupos. O nível de significância foi de 5% ($p<0,05$).

Resultados

Espectroscopia de Infravermelho transformada de Fourier (FTIR)

Análise do conteúdo orgânico (razão amida / fosfato)

Os valores originais, médias e desvios padrão relacionados ao conteúdo orgânico dos fragmentos de dentina radicular estudados, expressos em cm^{-1} , submetidos à variação dos grupos de soluções irrigadoras, tempos utilizados e terços radiculares avaliados estão descritos no Apêndice A e compilados na Tabela 2.

Tabela 2. Valores originais, médias e desvios padrão ($\text{cm}^{-1} \cdot 10^{-2}$) do conteúdo orgânico, nos terços cervical, médio e apical dos fragmentos de dentina radicular, submetidos aos diferentes tratamentos e tempos utilizados.

Solução irrigadora	Terço radicular	Tempos				$\bar{x}t \pm DP \text{ total}$
		T0	T1	T2	T3	
H+E+H	Cervical	$1,3 \pm 0,4$	$0,9 \pm 0,1$	$4,1 \pm 0,2$	$1,5 \pm 0,4$	$2,0 \pm 1,5$
	Médio	$1,9 \pm 1,0$	$0,9 \pm 0,3$	$3,7 \pm 0,3$	$1,4 \pm 0,6$	$2,0 \pm 1,2$
	Apical	$1,6 \pm 0,3$	$0,9 \pm 0,2$	$4,3 \pm 1,3$	$1,7 \pm 0,5$	$2,1 \pm 1,5$
	$\bar{x}t \pm DP \text{ total}$	$1,6 \pm 0,3$	$0,9 \pm 0,02$	$4,0 \pm 0,3$	$1,5 \pm 0,2$	
H+Q+H	Cervical	$1,1 \pm 0,2$	$0,6 \pm 0,07$	$3,3 \pm 1,5$	$0,9 \pm 0,3$	$1,5 \pm 1,3$
	Médio	$1,1 \pm 0,2$	$0,8 \pm 0,05$	$2,5 \pm 0,07$	$1,0 \pm 0,2$	$1,3 \pm 0,8$
	Apical	$1,3 \pm 0,4$	$0,8 \pm 0,2$	$2,6 \pm 1,2$	$0,8 \pm 0,6$	$1,4 \pm 0,8$
	$\bar{x}t \pm DP \text{ total}$	$1,2 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,1$	$2,8 \pm 0,5$	$0,9 \pm 0,1$	
Q+Q+Q	Cervical	$1,0 \pm 0,1$	$3,2 \pm 0,7$	$4,6 \pm 0,7$	$5,2 \pm 1,0$	$3,5 \pm 1,9$
	Médio	$1,3 \pm 0,4$	$4,1 \pm 1,7$	$8,3 \pm 4,1$	$8,1 \pm 1,6$	$5,5 \pm 3,4$
	Apical	$1,33 \pm 0,3$	$7,0 \pm 2,1$	$10,8 \pm 4,9$	$16,2 \pm 4,3$	$8,8 \pm 6,3$
	$\bar{x}t \pm DP \text{ total}$	$1,2 \pm 0,2$	$4,8 \pm 2,0$	$7,9 \pm 3,1$	$9,8 \pm 5,7$	
Q+E+Q	Cervical	$1,1 \pm 0,2$	$6,6 \pm 2,1$	$84,8 \pm 17,9$	$86,0 \pm 70,4$	$44,6 \pm 47,1$
	Médio	$1,1 \pm 0,3$	$3,7 \pm 0,8$	$16,4 \pm 11,3$	$15,9 \pm 1,72$	$9,3 \pm 7,9$
	Apical	$1,2 \pm 0,2$	$4,8 \pm 0,8$	$21,2 \pm 12,5$	$43,9 \pm 40,9$	$17,8 \pm 19,5$
	$\bar{x}t \pm DP \text{ total}$	$1,1 \pm 0,03$	$5,1 \pm 1,4$	$40,8 \pm 38,2$	$48,6 \pm 35,3$	

H = hipoclorito de sódio 1 %; E = EDTA a 17 %; Q = Quitosana 0,2%; T0 = Inicial; T1 = Após instrumentação; T2 = Após irrigação com a segunda solução; T3 = após lavagem com a primeira solução utilizada.

Na análise do componente orgânico, pode-se observar que, para o fator Grupo, ocorreu diferença estatisticamente significativa entre os vários tipos de protocolos de irrigação dos canais radiculares avaliados ($p < 0,05$), tendo o Grupo Q+E+Q apresentado maiores valores de conteúdo orgânico encontrado na dentina e diferença estatisticamente significativa em relação aos demais ($p < 0,05$), os quais foram estatisticamente semelhantes entre si ($p > 0,05$) (Tabela 3).

Tabela 3. Médias $\pm$ desvios-padrão ($\text{cm}^{-1} \cdot 10^{-2}$) do conteúdo orgânico para os Grupos de soluções irrigadoras utilizadas durante o tratamento endodôntico.

Grupos de soluções irrigadoras	Média $\pm$ desvio padrão
H+E+H	2,0 $\pm$ 1,2 B
H+Q+H	1,4 $\pm$ 0,9 B
Q+Q+Q	5,9 $\pm$ 4,5 B
Q+E+Q	23,9 $\pm$ 31,2 A

H = hipoclorito de sódio 1 %; E = EDTA a 17 %; Q = Quitosana 0,2%.
Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Na análise dos tempos, observou-se que o Tempo 3 apresentou maior quantidade de amida, com diferença estatisticamente significativa em relação ao Tempo 0 ($p < 0,05$), sendo que os tempos intermediários, ou seja, Tempos 1 e 2, não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre os extremos, v.g., T0 e T3 ($p > 0,05$) (Tabela 4).

Tabela 4. Médias $\pm$ desvios-padrão ($\text{cm}^{-1} \cdot 10^{-2}$) do conteúdo orgânico para os Tempos utilizados durante o tratamento endodôntico.

Tempos	Média $\pm$ desvio padrão
T0	1,3 $\pm$ 0,3 B
T1	2,9 $\pm$ 2,4 AB
T2	13,9 $\pm$ 23,1 AB
T3	15,2 $\pm$ 25,5 A

T0 = Inicial; T1 = Após instrumentação; T2 = Após irrigação com a segunda solução; T3 = após lavagem com a primeira solução utilizada. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Quando se analisou o componente orgânico, verificou-se que não houve diferença estatisticamente significativa quando comparado os Terços radiculares ($p>0,05$) (Tabela 5).

Tabela 5. Médias $\pm$ desvios-padrão ($\text{cm}^{-1} \cdot 10^{-2}$) do conteúdo orgânico para os Terços radiculares

Terços radiculares	Média $\pm$ desvio padrão
Cervical	12,9 $\pm$ 28,3 A
Médio	4,5 $\pm$ 5,1 A
Apical	7,5 $\pm$ 11,4 A

Letras iguais indicam que não houve diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$).

Na interação dos fatores no terço cervical, observou-se que o comportamento foi semelhante ao encontrado nos grupos em geral, nos quais o Grupo Q+E+Q apresentou resultados superiores e com diferenças estatisticamente significantes em relação aos demais grupos ($p<0,05$), que não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre si ($p>0,05$), apenas nos Tempos 2 e 3, sendo que, nos demais tempos, não houve diferença estatisticamente significativa entre eles ($p>0,05$). (Tabela 6).

Tabela 6. Médias $\pm$ desvios-padrão (cm^{-1}) do conteúdo orgânico para os Grupos de soluções irrigadoras utilizadas durante o tratamento endodôntico sob o terço cervical da dentina radicular nos diferentes Tempos.

	T0	T1	T2	T3
H+E+H	0,014 $\pm$ 0,004 B	0,009 $\pm$ 0,001 B	0,041 $\pm$ 0,002 B	0,015 $\pm$ 0,004 B
H+Q+H	0,011 $\pm$ 0,002 B	0,006 $\pm$ 0,001 B	0,033 $\pm$ 0,015 B	0,009 $\pm$ 0,003 B
Q+Q+Q	0,010 $\pm$ 0,001 B	0,031 $\pm$ 0,007 B	0,046 $\pm$ 0,007 B	0,052 $\pm$ 0,010 B
Q+E+Q	0,011 $\pm$ 0,002 B	0,066 $\pm$ 0,021 B	0,848 $\pm$ 0,179 A	0,859 $\pm$ 0,704 A

H = hipoclorito de sódio 1 %; E = EDTA a 17 %; Q = Quitosana 0,2%; T0 = Inicial; T1 = Após instrumentação; T2 = Após irrigação com a segunda solução; T3 = após lavagem com a primeira solução utilizada. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$).

No terço médio, evidenciou-se que em relação aos Grupos, o Q+E+Q apresentou os maiores valores de quantidade de amida exposta – reveladora de maior conteúdo orgânico do tecido - com diferenças estatisticamente significantes em relação ao Grupo Q+Q+Q quando analisado no T2 e T3 ($p<0,05$). Também apresentaram diferenças estatisticamente significantes em relação aos demais grupos, exceção feita ao Grupo H+E+H no T2 ($p<0,05$) (Tabela 7).

Tabela 7. Médias $\pm$ desvios-padrão ($\text{cm}^{-1} \cdot 10^{-2}$) do conteúdo orgânico para os Grupos de soluções irrigadoras utilizadas durante o tratamento endodôntico sob o terço médio da dentina radicular nos diferentes Tempos.

	T0	T1	T2	T3
H+E+H	1,9 $\pm$ 0,9 E	0,9 $\pm$ 0,3 E	3,7 $\pm$ 0,3 CDE	1,4 $\pm$ 0,6 E
H+Q+H	1,1 $\pm$ 0,2 E	0,7 $\pm$ 0,1 E	2,5 $\pm$ 0,1 DE	1,0 $\pm$ 0,2 E
Q+Q+Q	1,3 $\pm$ 0,4 E	4,1 $\pm$ 1,8 CDE	8,4 $\pm$ 4,1 BC	8,1 $\pm$ 1,6 BCD
Q+E+Q	1,1 $\pm$ 0,3 E	3,7 $\pm$ 0,8 CDE	16,4 $\pm$ 11,3 A	15,8 $\pm$ 1,7 AB

H = hipoclorito de sódio 1 %; E = EDTA a 17 %; Q = Quitosana 0,2%; T0 = Inicial; T1 = Após instrumentação; T2 = Após irrigação com a segunda solução; T3 = após lavagem com a primeira solução utilizada. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significante ($p<0,05$).

No terço apical, no T3, verificou que o Grupo Q+E+Q apresentou os maiores valores de quantidade de amida exposta, com diferença estatisticamente significante em relação aos Grupos H+E+H e H+Q+H ($p<0,05$), e o Grupo Q+Q+Q apresentou resultados intermediários, ou seja, sem diferença estatisticamente significante com os demais grupos. Na interação dos fatores observa-se que os grupos H+E+H e H+Q+H não alteraram o comportamento em relação ao tempo ($p>0,05$). No Tempo 3 o Grupo Q+E+Q teve aumento exacerbado em relação a todos os tempos e diferentes grupos/tempo ($p<0,05$) (Tabela 8).

Tabela 8. Médias $\pm$ desvios-padrão (cm^{-1}) do conteúdo orgânico para os Grupos de soluções irrigadoras utilizadas durante o tratamento endodôntico sob o terço apical da dentina radicular nos diferentes Tempos.

	T0	T1	T2	T3
H+E+H	1,6 $\pm$ 0,3 C	0,9 $\pm$ 0,2 C	4,3 $\pm$ 1,3 BC	1,7 $\pm$ 0,5 C
H+Q+H	1,3 $\pm$ 0,4 C	0,8 $\pm$ 0,2 C	2,6 $\pm$ 1,2 BC	0,8 $\pm$ 0,6 C
Q+Q+Q	1,3 $\pm$ 0,3 C	7,0 $\pm$ 2,1 B	10,8 $\pm$ 4,9 B	16,2 $\pm$ 4,3 B
Q+E+Q	1,2 $\pm$ 0,2 C	4,8 $\pm$ 0,8 BC	21,2 $\pm$ 12,5 B	43,9 $\pm$ 40,9 A

H = hipoclorito de sódio 1 %; E = EDTA a 17 %; Q = Quitosana 0,2%; T0 = Inicial; T1 = Após instrumentação; T2 = Após irrigação com a segunda solução; T3 = após lavagem com a primeira solução utilizada. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Na figura 18, é possível visualizar o comportamento representativo de todos os grupos em cada terço. Ao analisar o comportamento de todos os Grupos nos três terços, o Grupo Q+E+Q destaca-se com os maiores valores de amida principalmente no tempo Tempo 2 e Tempo 3. Em relação aos terços, é possível observar que o cervical apresentou maior quantidade de amida exposta. No Grupo Q+Q+Q verifica-se um comportamento crescente em relação ao tempos.

Figura 18. Gráfico representativo do comportamento de todos os grupos nos diferentes tempos em cada terço para o componente orgânico.

Análise do conteúdo inorgânico (carbonato / fosfato)

Os valores originais, médias e desvios padrão relacionados ao conteúdo inorgânico dos fragmentos de dentina radicular estudados, expressos em cm^{-1} , submetidos à variação dos grupos de soluções irrigadoras, tempos utilizados e terços radiculares avaliados, estão descritos no Apêndice B e compilados na Tabela 9.

Tabela 9. Valores originais, médias e desvios padrão ($\text{cm}^{-1} \cdot 10^{-2}$) da razão carbonato/fosfato, nos terços cervical, médio e apical dos fragmentos de dentina radicular, submetidos aos diferentes tratamentos e tempos utilizados.

Solução irrigadora	Terço radicular	Tempos				$\bar{x}t \pm DP \text{ total}$
		T0	T1	T2	T3	
H+E+H	Cervical	2,0 $\pm$ 0,4	2,1 $\pm$ 0,4	2,0 $\pm$ 0,5	1,8 $\pm$ 0,4	2,0 $\pm$ 0,1
	Médio	2,1 $\pm$ 0,3	2,1 $\pm$ 0,2	2,1 $\pm$ 0,3	1,8 $\pm$ 0,2	2,0 $\pm$ 0,2
	Apical	2,3 $\pm$ 0,3	2,3 $\pm$ 0,3	2,2 $\pm$ 0,3	2,0 $\pm$ 0,4	2,2 $\pm$ 0,1
	$\bar{x}t \pm DP \text{ total}$	2,1 $\pm$ 0,1	2,2 $\pm$ 0,1	2,1 $\pm$ 0,1	1,9 $\pm$ 0,1	
H+Q+H	Cervical	1,9 $\pm$ 0,03	1,7 $\pm$ 0,03	1,5 $\pm$ 0,04	1,5 $\pm$ 0,1	1,6 $\pm$ 0,2
	Médio	2,0 $\pm$ 0,1	1,9 $\pm$ 0,1	1,9 $\pm$ 0,3	1,5 $\pm$ 0,5	1,8 $\pm$ 0,2
	Apical	2,0 $\pm$ 0,3	2,1 $\pm$ 0,4	2,0 $\pm$ 0,4	1,9 $\pm$ 0,3	2,0 $\pm$ 0,1
	$\bar{x}t \pm DP \text{ total}$	2,0 $\pm$ 0,1	1,9 $\pm$ 0,2	1,8 $\pm$ 0,2	1,6 $\pm$ 0,2	
Q+Q+Q	Cervical	2,1 $\pm$ 0,3	1,5 $\pm$ 0,1	1,4 $\pm$ 0,1	1,4 $\pm$ 0,2	1,6 $\pm$ 0,3
	Médio	2,2 $\pm$ 0,1	1,9 $\pm$ 0,03	1,7 $\pm$ 0,3	1,9 $\pm$ 0,2	1,9 $\pm$ 0,2
	Apical	1,9 $\pm$ 0,2	1,8 $\pm$ 0,2	1,9 $\pm$ 0,2	1,9 $\pm$ 0,3	1,9 $\pm$ 0,05
	$\bar{x}t \pm DP \text{ total}$	2,1 $\pm$ 0,1	1,7 $\pm$ 0,2	1,7 $\pm$ 0,2	1,7 $\pm$ 0,3	
Q+E+Q	Cervical	1,8 $\pm$ 0,09	1,4 $\pm$ 0,06	3,4 $\pm$ 0,3	2,3 $\pm$ 0,4	2,2 $\pm$ 0,9
	Médio	2,1 $\pm$ 0,2	1,2 $\pm$ 0,6	2,3 $\pm$ 1,0	1,1 $\pm$ 0,9	1,7 $\pm$ 0,6
	Apical	1,9 $\pm$ 0,2	1,6 $\pm$ 0,3	1,9 $\pm$ 0,4	2,2 $\pm$ 0,6	1,9 $\pm$ 0,2
	$\bar{x}t \pm DP \text{ total}$	1,9 $\pm$ 0,1	1,4 $\pm$ 0,2	2,5 $\pm$ 0,8	1,9 $\pm$ 0,7	

H = hipoclorito de sódio 1 %; E = EDTA a 17 %; Q = Quitosana 0,2%; T0 = Inicial; T1 = Após instrumentação; T2 = Após irrigação com a segunda solução; T3 = após lavagem com a primeira solução utilizada.

A análise da quantidade de carbonato demonstra diferença estatisticamente significativa para o fator Grupo ($p < 0,05$), em que o Grupo H+E+H apresentou resultado com diferença estatisticamente significativa dos Grupos H+Q+H e Q+Q+Q ($p < 0,05$). O Grupo Q+E+Q apresentou resultados intermediários ($p > 0,05$), sem diferenças estatisticamente significantes em relação àqueles que apresentaram resultados de menor valor (H+Q+H e Q+Q+Q), e com igual ausência em relação ao de maior valor (H+E+H) (Tabela 10)

Tabela 10. Médias $\pm$ desvios-padrão ($\text{cm}^{-1} \cdot 10^{-2}$) da razão carbonato/fosfato para os Grupos de soluções irrigadoras utilizadas durante o tratamento endodôntico.

Grupos de soluções irrigadoras	Média $\pm$ desvio padrão
H+E+H	2,1 $\pm$ 0,2 A
H+Q+H	1,8 $\pm$ 0,2 B
Q+Q+Q	1,8 $\pm$ 0,2 B
Q+E+Q	1,9 $\pm$ 0,6 AB

H = hipoclorito de sódio 1 %; E = EDTA a 17 %; Q = Quitosana 0,2%. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os Tempos ($p > 0,05$). (Tabela 11).

Tabela 11. Médias $\pm$ desvios-padrão ($\text{cm}^{-1} \cdot 10^{-2}$) da razão carbonato/fosfato para os Tempos utilizados durante o tratamento endodôntico.

Tempos	Média $\pm$ desvio padrão
T0	2,1 $\pm$ 0,2 A
T1	1,8 $\pm$ 0,4 A
T2	2,1 $\pm$ 0,5 A
T3	1,8 $\pm$ 0,3 A

T1 = Após instrumentação; T2 = Após irrigação com a segunda solução; T3 = após lavagem com a primeira solução utilizada. Letras iguais indicam que não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$).

Ao comparar os Terços radiculares, foi possível observar que o apical apresentou maior razão do componente inorgânico com diferença estatisticamente significativa em relação ao médio e ao cervical ($p < 0,05$) (Tabela 12).

Tabela 12. Médias $\pm$ desvios-padrão ($\text{cm}^{-1} \cdot 10^{-2}$) da razão carbonato/fosfato para os Terços radiculares.

Terços radiculares	Média $\pm$ desvio padrão
Cervical	1,9 $\pm$ 0,5 B
Médio	1,9 $\pm$ 0,4 B
Apical	2,0 $\pm$ 0,2 A

Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Na interação dos fatores para os terços cervical e médio, observou-se que o Grupo Q+E+Q, no Tempo 2, apresentou maiores valores de conteúdo inorgânico, com diferença estatisticamente significativa em relação a todos os outros grupos/tempo ($p < 0,05$). À exceção do grupo Q+E+Q, observa-se comportamento semelhante entre os tempos/grupos ($p > 0,05$). (Tabela 13 e 14).

Tabela 13. Médias $\pm$ desvios-padrão ($\text{cm}^{-1} \cdot 10^{-2}$) da razão carbonato/fosfato para os Grupos de soluções irrigadoras utilizadas durante o tratamento endodôntico sob o terço cervical da dentina radicular nos diferentes Tempos.

	T0	T1	T2	T3
H+E+H	2,0 $\pm$ 0,4 BC	2,1 $\pm$ 0,5 BC	2,0 $\pm$ 0,5 BC	1,8 $\pm$ 0,4 BC
H+Q+H	1,9 $\pm$ 0,03 BC	1,7 $\pm$ 0,03 BC	1,5 $\pm$ 0,03 C	1,5 $\pm$ 0,1 C
Q+Q+Q	2,1 $\pm$ 0,3 BC	1,5 $\pm$ 0,1 C	1,4 $\pm$ 0,1 C	1,4 $\pm$ 0,2 C
Q+E+Q	1,8 $\pm$ 0,1 BC	1,4 $\pm$ 0,1 C	3,4 $\pm$ 0,3 A	2,3 $\pm$ 0,4 BC

H = hipoclorito de sódio 1 %; E = EDTA a 17 %; Q = Quitosana 0,2%; T0 = Inicial; T1 = Após instrumentação; T2 = Após irrigação com a segunda solução; T3 = após lavagem com a primeira solução utilizada. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Tabela 14. Médias $\pm$ desvios-padrão ($\text{cm}^{-1} \cdot 10^{-2}$) da razão carbonato/fosfato para os Grupos de soluções irrigadoras utilizadas durante o tratamento endodôntico sob o terço médio da dentina radicular nos diferentes Tempos.

	T0	T1	T2	T3
H-E+H	2,1 $\pm$ 0,3 AB	2,1 $\pm$ 0,2 AB	2,1 $\pm$ 0,3 AB	1,8 $\pm$ 0,1 AB
H+Q+H	2,0 $\pm$ 0,1 AB	1,9 $\pm$ 0,1 AB	1,9 $\pm$ 0,3 AB	1,5 $\pm$ 0,5 B
Q+Q+Q	2,2 $\pm$ 0,1 AB	1,8 $\pm$ 0,03 AB	1,7 $\pm$ 0,3 AB	1,9 $\pm$ 0,2 AB
Q+E+Q	2,1 $\pm$ 0,2 AB	1,2 $\pm$ 0,6 B	2,3 $\pm$ 1,0 A	1,1 $\pm$ 1,0 B

H = hipoclorito de sódio 1 %; E = EDTA a 17 %; Q = Quitosana 0,2%; T0 = Inicial; T1 = Após instrumentação; T2 = Após irrigação com a segunda solução; T3 = após lavagem com a primeira solução utilizada. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Para o terço apical, observou-se que, de modo geral, os grupos/tempo comportaram-se de maneira semelhante ($p>0,05$), com pouca variação do conteúdo inorgânico (Tabela 15).

Tabela 15. Médias $\pm$ desvios-padrão ($\text{cm}^{-1} \cdot 10^{-2}$) da razão carbonato/fosfato para os Grupos de soluções irrigadoras utilizadas durante o tratamento endodôntico sob o terço apical da dentina radicular nos diferentes Tempos.

	T0	T1	T2	T3
H+E+H	2,3 $\pm$ 0,3 A	2,3 $\pm$ 0,3 A	2,2 $\pm$ 0,3 A	2,0 $\pm$ 0,4 AB
H+Q+H	2,0 $\pm$ 0,3 AB	2,1 $\pm$ 0,4 AB	2,0 $\pm$ 0,4 AB	1,9 $\pm$ 0,3 AB
Q+Q+Q	1,9 $\pm$ 0,2 AB	1,8 $\pm$ 0,3 AB	1,9 $\pm$ 0,2 AB	1,9 $\pm$ 0,3 AB
Q+E+Q	1,9 $\pm$ 0,2 AB	1,6 $\pm$ 0,3 B	1,9 $\pm$ 0,4 AB	2,2 $\pm$ 0,6 AB

H = hipoclorito de sódio 1 %; E = EDTA a 17 %; Q = Quitosana 0,2%; T0 = Inicial; T1 = Após instrumentação; T2 = Após irrigação com a segunda solução; T3 = após lavagem com a primeira solução utilizada. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significante ($p<0,05$).

Na Figura 19 é possível observar o comportamento comparativo de todos os grupos nos diferentes tempos em cada terço.

Figura 19. Gráfico representativo do comportamento de todos os grupos nos diferentes tempos em cada terço para o componente inorgânico.

Microscopia Confocal a laser

Análise do perímetro dos túbulos dentinários

As médias e desvios-padrões relacionados à análise dos perímetros dos túbulos dentinários estudados, expressos em μm , submetidos à variação dos grupos de soluções irrigadoras, tempos utilizados e terços radiculares avaliados, estão descritos na Tabela 16.

Tabela 16. Valores originais, médias e desvio padrão (μm) do perímetro dos túbulos dentinários, nos terços cervical, médio e apical das hemi raízes, submetidas aos diferentes tratamentos e tempos utilizados.

Solução irrigadora	Terço radicular	Tempos		
		T0	T1	T2
H+E+H	Cervical	19,12 $\pm$ 0,56	19,39 $\pm$ 1,47	34,44 $\pm$ 21,96
	Médio	18,40 $\pm$ 2,16	19,07 $\pm$ 4,96	26,02 $\pm$ 8,14
	Apical	19,21 $\pm$ 1,29	18,94 $\pm$ 1,60	19,64 $\pm$ 5,06
H+Q+H	Cervical	19,27 $\pm$ 3,42	19,81 $\pm$ 2,31	27,63 $\pm$ 8,32
	Médio	19,25 $\pm$ 1,10	18,99 $\pm$ 1,63	21,75 $\pm$ 7,24
	Apical	18,47 $\pm$ 1,34	19,15 $\pm$ 2,72	26,65 $\pm$ 6,24
Q+Q+Q	Cervical	19,10 $\pm$ 2,52	22,38 $\pm$ 3,97	26,05 $\pm$ 5,70
	Médio	18,66 $\pm$ 3,36	25,75 $\pm$ 7,25	26,24 $\pm$ 3,57
	Apical	18,62 $\pm$ 2,16	22,87 $\pm$ 4,97	25,35 $\pm$ 3,08
Q+E+Q	Cervical	19,04 $\pm$ 1,57	23,58 $\pm$ 3,78	24,56 $\pm$ 8,54
	Médio	18,23 $\pm$ 1,65	27,61 $\pm$ 10,62	22,81 $\pm$ 4,16
	Apical	18,84 $\pm$ 1,64	22,76 $\pm$ 4,53	22,41 $\pm$ 3,66

H = hipoclorito de sódio 1 %; E = Edta a 17 %; Q = Quitosana 0,2%; T0 = Inicial; T1 = Após instrumentação; T2 = Após irrigação com a segunda solução; T3 = após lavagem com a primeira solução utilizada.

Na análise do perímetro dos túbulos dentinários para o fator de variação Grupos, observa-se que o Grupo Q+Q+Q apresentou maiores valores, com diferença estatisticamente significativa em relação ao Grupo H+E+H ($p < 0,05$). Os demais grupos apresentaram valores intermediários, sem diferenças estatisticamente significantes em relação àquele de menor valor (H+E+H) e o de maior (Q+Q+Q) ($p > 0,05$) (Tabela 17)

Tabela 17. Médias $\pm$ desvios-padrão (μm) do perímetro dos túbulos dentinários para os Grupos de soluções irrigadoras utilizadas durante o tratamento endodôntico.

Grupos de soluções irrigadoras	Média $\pm$ desvio padrão
H+E+H	21,47 $\pm$ 9,17 B
H+Q+H	21,22 $\pm$ 5,38 AB
Q+Q+Q	22,78 $\pm$ 5,08 A
Q+E+Q	22,21 $\pm$ 5,73 AB

H = hipoclorito de sódio 1 %; E = Edta a 17 %; Q = Quitosana 0,2%. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Na análise dos Tempos, evidenciou-se que o 1 e o 2 apresentaram valores do perímetro dos túbulos dentinários maiores, e com diferença estatisticamente significativa em relação ao Tempo 0 ($p < 0,05$) (Tabela 18).

Tabela 18. Médias $\pm$ desvios-padrão (μm) do perímetro dos túbulos dentinários para os Tempos utilizados durante o tratamento endodôntico.

Tempos	Média $\pm$ desvio padrão
T0	18,85 $\pm$ 1,94 B
T1	21,61 $\pm$ 5,35 A
T2	25,29 $\pm$ 8,70 A

T0 = *Baseline*; T1 = Após irrigação durante a instrumentação; T3 = após irrigação final e lavagem com a primeira solução utilizada. Letras iguais indicam que não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$).

Ao comparar os Terços radiculares, não foi possível observar diferença estatisticamente significativa entre eles ($p > 0,05$) (Tabela 19).

Tabela 19. Médias $\pm$ desvios-padrão (μm) do perímetro dos túbulos dentinários para os Terços radiculares

Terços radiculares	Média $\pm$ desvio padrão
Cervical	22,87 $\pm$ 8,44 A
Médio	21,82 $\pm$ 6,18 A
Apical	21,08 $\pm$ 4,28 A

Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Análise da contagem dos túbulos dentinários

Os valores originais, médias e desvios-padrões relacionados à análise da contagem dos túbulos dentinários estudados, submetidos à variação dos grupos de soluções irrigadoras, tempos utilizados e terços radiculares avaliados, estão descritos na Tabela 20.

Tabela 20. Valores originais, médias e desvio padrão da contagem dos túbulos dentinários, nos terços cervical, médio e apical das hemi raízes, submetidas aos diferentes tratamentos e tempos utilizados.

Solução irrigadora	Terço radicular	Tempos		
		T0	T1	T2
H+E+H	Cervical	10,67±2,06	27,50±5,36	444,83±38,34
	Médio	9,33±3,08	9,00±1,09	427,33±61,65
	Apical	10,50±1,22	8,33±3,98	422,17±66,54
H+Q+H	Cervical	10,83±1,60	26,33±3,32	439,00±40,91
	Médio	6,67±2,50	8,83±3,76	387,33±39,40
	Apical	8,33±1,75	6,00±1,55	328,67±47,22
Q+Q+Q	Cervical	9,33±3,20	431,17±41,89	456,50±35,52
	Médio	8,33±3,08	331,67±84,72	407,17±43,24
	Apical	7,17±2,32	338,33±107,46	389,5±98,70
Q+E+Q	Cervical	9,00±2,97	457,33±26,01	474,50±9,77
	Médio	9,67±2,73	381,00±79,63	465,67±23,33
	Apical	6,83±2,64	442,67±37,32	460,67±18,76

H = hipoclorito de sódio 1 %; E = Edta a 17 %; Q = Quitosana 0,2%; T0 = Inicial; T1 = Após instrumentação; T2 = Após irrigação com a segunda solução; T3 = após lavagem com a primeira solução utilizada.

Na análise da contagem dos túbulos dentinários para o fator de variação Grupos, observa-se que o Grupo Q+E+Q e o Q+Q+Q apresentaram os maiores valores, com diferença estatisticamente significativa em relação aos Grupos H+E+H e H+Q+H ($p<0,05$), que foram semelhantes, ou seja, não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si ($p<0,05$) (Tabela 21)

Tabela 21. Médias $\pm$ desvios-padrão da contagem dos túbulos dentinários para os Grupos de soluções irrigadoras utilizadas durante o tratamento endodôntico.

Grupos de soluções irrigadoras	Média $\pm$ desvio padrão
H+E+H	152,18 $\pm$ 201,77 B
H+Q+H	135,78 $\pm$ 181,34 B
Q+Q+Q	264,35 $\pm$ 194,84 A
Q+E+Q	300,81 $\pm$ 212,30 A

H = hipoclorito de sódio 1 %; E = Edta a 17 %; Q = Quitosana 0,2%. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Na análise do fator Tempo para contagem dos túbulos dentinários, evidenciou-se que todos os tempos apresentam diferença estatisticamente entre eles, sendo que o Tempo 2 apresentou os maiores valores e o Tempo 0, os menores ($p < 0,05$) (Tabela 22).

Tabela 22. Médias $\pm$ desvios-padrão da contagem dos túbulos dentinários para os Tempos utilizados durante o tratamento endodôntico.

Tempos	Média $\pm$ desvio padrão
T0	8,89 $\pm$ 2,70 C
T1	205,68 $\pm$ 201,16 B
T2	425,28 $\pm$ 60,58 A

T0 = *Baseline*; T1 = Após irrigação durante a instrumentação; T3 = após irrigação final e lavagem com a primeira solução utilizada. Letras iguais indicam que não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$).

Na análise do fator Terço, observou-se que o cervical apresentou maiores valores na contagem dos túbulos dentinários, com diferença estatisticamente significativa em relação ao médio e apical ($p < 0,05$), sendo que, entre estes, não foi observada diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) (Tabela 23).

Tabela 23. Médias $\pm$ desvios-padrão e mediana da contagem dos túbulos dentinários para os Terços radiculares

Terços radiculares	Média $\pm$ desvio padrão	Mediana
Cervical	233,08 $\pm$ 220,42	200,00 A
Médio	204,33 $\pm$ 203,00	110,50 B
Apical	202,43 $\pm$ 204,32	117,50 B

Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Para os Grupos H+E+H e H+Q+H observou-se que o Tempo 2 apresentou maiores valores na contagem dos túbulos dentinários, com diferença estatisticamente significativa ao Tempo 1 e Tempo 0 ($p < 0,05$). Estes, foram semelhantes, ou seja, não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si ($p > 0,05$). Em relação aos terços radiculares, não houve diferença estatisticamente significativa entre eles ($p > 0,05$) em nenhum Tempo estudado ($p > 0,05$). (Tabelas 24 e 25)

Tabela 24. Médias $\pm$ desvios-padrão da contagem dos túbulos dentinários da interação dos fatores Tempo x Terço para o Grupo H+E+H de soluções irrigadoras utilizadas durante o tratamento

	T0	T1	T2
Cervical	10,67 $\pm$ 2,06 B	27,5 $\pm$ 5,36 B	444,83 $\pm$ 38,34 A
Médio	9,33 $\pm$ 3,08 B	9,00 $\pm$ 1,09 B	427,33 $\pm$ 61,65 A
Apical	10,5 $\pm$ 1,22 B	8,33 $\pm$ 3,98 B	422,17 $\pm$ 66,54 A

H = hipoclorito de sódio 1 %; E = Edta a 17 %; Q = Quitosana 0,2 T0 = *Baseline*; T1 = Após irrigação durante a instrumentação; T2 = após irrigação final e lavagem com a primeira solução utilizada. Letras iguais indicam que não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$).

Tabela 25. Médias $\pm$ desvios-padrão da contagem dos túbulos dentinários da interação dos fatores Tempo x Terço para o Grupo H+Q+H de soluções irrigadoras utilizadas durante o tratamento

	T0	T1	T2
Cervical	10,83 $\pm$ 1,60 D	26,33 $\pm$ 3,33 C	439 $\pm$ 40,91 A
Médio	6,67 $\pm$ 2,50 D	8,83 $\pm$ 3,76 D	387,33 $\pm$ 39,40 B
Apical	8,33 $\pm$ 1,75 D	6,00 $\pm$ 1,55 D	328,67 $\pm$ 47,22 B

H = hipoclorito de sódio 1 %; E = Edta a 17 %; Q = Quitosana 0,2 T0 = *Baseline*; T1 = Após irrigação durante a instrumentação; T2 = após irrigação final e lavagem com a primeira solução utilizada. Letras iguais indicam que não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$).

Na interação dos fatores para os Grupos Q+Q+Q e Q+E+Q observou-se que os Tempos 1 e 2 apresentaram maiores valores, com diferença estatisticamente significativa ao tempo 0 ($p < 0,05$). Para os Terços observou-se que o cervical e apical apresentaram maiores valores, nos Tempos 1 e 2 ($p < 0,05$). (Tabela 26 e 27).

Tabela 26. Médias $\pm$ desvios-padrão da contagem dos túbulos dentinários da interação dos fatores Tempo x Terço para o Grupo Q+Q+Q de soluções irrigadoras utilizadas durante o tratamento

	T0	T1	T2
Cervical	9,33 $\pm$ 3,20 C	431,17 $\pm$ 41,89 A	456,50 $\pm$ 35,52 A
Médio	8,33 $\pm$ 3,08 C	331,67 $\pm$ 84,73 B	407,17 $\pm$ 43,24 A
Apical	7,17 $\pm$ 2,32 C	338,33 $\pm$ 107,46 B	389,50 $\pm$ 98,70 A

H = hipoclorito de sódio 1 %; E = Edta a 17 %; Q = Quitosana 0,2 T0 = *Baseline*; T1 = Após irrigação durante a instrumentação; T3 = após irrigação final e lavagem com a primeira solução utilizada. Letras iguais indicam que não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$).

Tabela 27. Médias $\pm$ desvios-padrão da contagem dos túbulos dentinários da interação dos fatores Tempo x Terço para o Grupo Q+E+Q de soluções irrigadoras utilizadas durante o tratamento

	T0	T1	T2
Cervical	9,00 $\pm$ 2,97 C	457,33 $\pm$ 26,01 A	474,50 $\pm$ 9,77 A
Médio	6,67 $\pm$ 2,73 C	381,00 $\pm$ 79,63 B	465,67 $\pm$ 23,33 A
Apical	6,83 $\pm$ 2,64 C	442,67 $\pm$ 37,32 A	460,67 $\pm$ 18,76 A

H = hipoclorito de sódio 1 %; E = Edta a 17 %; Q = Quitosana 0,2 T0 = *Baseline*; T1 = Após irrigação durante a instrumentação; T3 = após irrigação final e lavagem com a primeira solução utilizada. Letras iguais indicam que não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$).

Na interação dos fatores Grupos x Terços para o Tempo 0, observou-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre os Grupos ($p > 0,05$), com exceção do terço médio, em que o grupo H+Q+H apresentou o menor valor em relação aos demais grupos ($p < 0,05$) (Tabela 28).

Tabela 28. Médias $\pm$ desvios-padrão da contagem dos túbulos dentinários da interação dos fatores Grupos x Terço para o Tempo 0 do tratamento endodôntico.

	Cervical	Médio	Apical
H+E+H	10,67 $\pm$ 2,06 A	9,33 $\pm$ 3,08 A	10,50 $\pm$ 1,22 A
H+Q+H	10,83 $\pm$ 1,60 A	6,67 $\pm$ 2,50 B	8,33 $\pm$ 1,75 AB
Q+Q+Q	9,33 $\pm$ 3,20 A	8,33 $\pm$ 3,08 A	7,17 $\pm$ 2,32 A
Q+E+Q	9,00 $\pm$ 2,97 A	9,67 $\pm$ 2,73 A	6,83 $\pm$ 2,64 A

H = hipoclorito de sódio 1 %; E = Edta a 17 %; Q = Quitosana 0,2 T0 = *Baseline*; T1 = Após irrigação durante a instrumentação; T3 = após irrigação final e lavagem com a primeira solução utilizada. Letras iguais indicam que não houve diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$).

Na interação dos fatores Grupos x Terços para o Tempo 1, observou-se que o grupo Q+E+Q, nos terços cervical e apical, e o grupo Q+Q+Q, no terço cervical, apresentaram os maiores valores, e os grupos H+E+H e H+Q+H, os menores ($p<0,05$). Em relação aos Terços radiculares foi observado que o cervical apresentou maiores valores com diferença estatisticamente significativa ao médio e apical ($p<0,05$) e estes foram semelhantes, ou seja, não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si ($p>0,05$), com exceção do grupo Q+E+Q no terço apical que apresentou resultados semelhantes ao terço cervical ($p>0,05$). (Tabela 29).

Tabela 29. Médias $\pm$ desvios-padrão da contagem dos túbulos dentinários da interação dos fatores Grupos x Terço para o Tempo 1 do tratamento endodôntico.

	Cervical	Médio	Apical
H+E+H	27,50 $\pm$ 5,36 C	9,00 $\pm$ 1,09 C	8,33 $\pm$ 3,98 C
H+Q+H	26,33 $\pm$ 3,33 C	8,83 $\pm$ 3,76 C	6,00 $\pm$ 1,55 C
Q+Q+Q	431,17 $\pm$ 41,89 A	331,67 $\pm$ 84,73 B	338,33 $\pm$ 107,46 B
Q+E+Q	457,33 $\pm$ 26,01 A	381,00 $\pm$ 79,63 B	442,67 $\pm$ 37,32 A

H = hipoclorito de sódio 1 %; E = Edta a 17 %; Q = Quitosana 0,2 T0 = *Baseline*; T1 = Após irrigação durante a instrumentação; T3 = após irrigação final e lavagem com a primeira solução utilizada. Letras iguais indicam que não houve diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$).

Na interação dos fatores Grupos x Terços para o Tempo 2, observou-se que todos os grupos apresentaram maiores valores para o terço cervical, com diferenças

estatisticamente significativa entre eles, com exceção do grupo Q+E+Q, que não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os terços estudados ($p < 0,05$) (Tabela 30).

Tabela 30. Médias $\pm$ desvios-padrão da contagem dos túbulos dentinários da interação dos fatores Grupos x Terço para o Tempo 2 do tratamento endodôntico.

	Cervical	Médio	Apical
H+E+H	444,83 $\pm$ 38,34 A	427,33 $\pm$ 61,65 B	422,17 $\pm$ 66,54 B
H+Q+H	439,00 $\pm$ 40,91 A	387,33 $\pm$ 39,40 C	328,67 $\pm$ 47,22 C
Q+Q+Q	456,50 $\pm$ 35,52 A	407,17 $\pm$ 43,24 BC	389,50 $\pm$ 98,70 BC
Q+E+Q	474,50 $\pm$ 9,77 A	465,67 $\pm$ 23,33 A	460,67 $\pm$ 18,76 A

H = hipoclorito de sódio 1 %; E = Edta a 17 %; Q = Quitosana 0,2 T0 = *Baseline*; T1 = Após irrigação durante a instrumentação; T3 = após irrigação final e lavagem com a primeira solução utilizada. Letras iguais indicam que não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$).

Análise da rugosidade da superfície

Os valores originais, médias e desvios padrões relacionados à rugosidade das superfícies das hemi raízes estudadas, expressos em μm , submetidos à variação dos grupos de soluções irrigadoras, terços radiculares e tempos avaliados, estão descritos na Tabela 31.

Tabela 31. Valores originais, médias e desvio padrão (μm) da rugosidade de superfície, nos terços cervical, médio e apical das hemi raízes, submetidas aos diferentes tratamentos e tempos utilizados.

Solução irrigadora	Terço radicular	Tempos		
		T0	T1	T2
H+E+H	Cervical	2,747 $\pm$ 1,25	2,395 $\pm$ 3,22	2,073 $\pm$ 1,69
	Médio	2,649 $\pm$ 1,25	2,961 $\pm$ 3,62	2,132 $\pm$ 1,61
	Apical	2,220 $\pm$ 1,72	1,332 $\pm$ 0,28	1,773 $\pm$ 1,20
H+Q+H	Cervical	3,320 $\pm$ 3,40	0,919 $\pm$ 0,52	0,889 $\pm$ 0,53
	Médio	2,610 $\pm$ 1,24	1,035 $\pm$ 0,44	0,964 $\pm$ 0,46
	Apical	1,764 $\pm$ 1,31	1,756 $\pm$ 1,56	1,860 $\pm$ 1,72
Q+Q+Q	Cervical	2,686 $\pm$ 2,23	1,027 $\pm$ 0,63	0,897 $\pm$ 0,38
	Médio	2,342 $\pm$ 1,16	1,169 $\pm$ 0,59	1,164 $\pm$ 0,57
	Apical	3,155 $\pm$ 1,58	1,264 $\pm$ 0,23	1,290 $\pm$ 0,52
Q+E+Q	Cervical	2,329 $\pm$ 0,99	1,148 $\pm$ 0,67	1,118 $\pm$ 0,39
	Médio	2,453 $\pm$ 1,56	0,913 $\pm$ 0,60	0,981 $\pm$ 0,61
	Apical	1,444 $\pm$ 1,19	1,110 $\pm$ 0,29	1,136 $\pm$ 0,26

H = hipoclorito de sódio 1 %; E = Edta a 17 %; Q = Quitosana 0,2%; T0 = Inicial; T1 = Após instrumentação; T2 = Após irrigação com a segunda solução; T3 = após lavagem com a primeira solução utilizada.

Na análise da rugosidade de superfície para o fator de variação Grupos não houve diferença estatisticamente significativa entre eles ($p>0,05$) (Tabela 31)

Tabela 32. Médias $\pm$ desvios-padrão (μm) da rugosidade de superfície para os Grupos de soluções irrigadoras utilizadas durante o tratamento endodôntico.

Grupos de soluções irrigadoras	Média $\pm$ desvio padrão
H+E+H	2,253 $\pm$ 1,918 A
H+Q+H	1,680 $\pm$ 1,628 A
Q+Q+Q	1,666 $\pm$ 1,267 A
Q+E+Q	1,403 $\pm$ 0,962 A

H = hipoclorito de sódio 1 %; E = Edta a 17 %; Q = Quitosana 0,2%. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$).

Na análise dos Tempos, evidenciou-se que o Tempo 0 apresentou maiores valores de rugosidade de superfície, com diferença estatisticamente significativa em relação ao Tempo 1 e 2 ($p < 0,05$), os quais não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre si (Tabela 33).

Tabela 33. Médias $\pm$ desvios-padrão (μm) da rugosidade de superfície para os Tempos utilizados durante o tratamento endodôntico.

Tempos	Média $\pm$ desvio padrão
T0	2,476 $\pm$ 1,640 A
T1	1,419 $\pm$ 1,538 B
T2	1,356 $\pm$ 1,023 B

T0 = *Baseline*; T1 = Após irrigação durante a instrumentação; T3 = após irrigação final e lavagem com a primeira solução utilizada. Letras iguais indicam que não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$).

Ao comparar os Terços radiculares, não se observou diferença estatisticamente significativa entre eles ($p > 0,05$) (Tabela 34).

Tabela 34. Médias $\pm$ desvios-padrão (μm) da rugosidade de superfície para os Terços radiculares

Terços radiculares	Média $\pm$ desvio padrão
Cervical	1,675 $\pm$ 1,199 A
Médio	1,781 $\pm$ 1,522 A
Apical	1,796 $\pm$ 1,773 A

Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

As imagens de microscopia confocal a laser, apresentadas na Figura 20, permitem observar morfológicamente que, no geral, em todos os grupos no Tempo 0, a superfície dentinária apresentou-se irregular, com praticamente sem nenhum túbulo dentinário aberto, e nos demais tempos, após o contato das soluções com a superfície dentinária, é possível a observar regularidade da superfície e consequentemente maior número de túbulos abertos.

Figura 20. Imagens de microscopia confocal a laser representativas da análise da rugosidade, sendo possível observar maior rugosidade de superfície em todos os Grupos no Tempo 0. (A) G1 - NaOCl + EDTA + NaOCl; (B) G2 - NaOCl + Quitosana + NaOCl; (C) G3 - Quitosana+ Quitosana + Quitosana; (D) G4 - Quitosana + EDTA + Quitosana.

Análise da interface material obturador/dentina

Os valores originais, médias e desvios padrões relacionados à extensão de *tags* formados na interface material obturador/dentina das hemi raízes estudadas,

expressos em μm , submetidos à variação dos grupos de soluções irrigadoras e terços radiculares avaliados, estão descritos na Tabela 35.

Tabela 35. Valores originais, médias e desvio padrão (μm) da extensão de *tags* formados na interface material obturador/dentina, nos terços cervical, médio e apical das hemi raízes avaliadas.

Grupos de soluções irrigadoras	Terços radiculares		
	Cervical	Médio	Apical
H+E+H	20,85 $\pm$ 5,04	19,33 $\pm$ 7,29	22,37 $\pm$ 11,44
H+Q+H	20,67 $\pm$ 8,68	18,10 $\pm$ 11,92	15,63 $\pm$ 6,65
Q+Q+Q	30,09 $\pm$ 7,52	26,98 $\pm$ 7,13	13,75 $\pm$ 3,35
Q+E+Q	22,94 $\pm$ 5,01	19,17 $\pm$ 6,60	12,43 $\pm$ 2,60

H = hipoclorito de sódio 1 %; E = Edta a 17 %; Q = Quitosana 0,2%.

Na análise da interface material obturador/dentina, pode-se observar que não houve diferença estatisticamente significativa para o fator Grupo ($p>0,05$) (Tabela 36).

Tabela 36. Médias $\pm$ desvios-padrão (μm) da extensão de *tags* formados na interface material obturador/dentina para os Grupos de soluções irrigadoras utilizadas durante o tratamento endodôntico.

Grupos de soluções irrigadoras	Média $\pm$ desvio padrão
H+E+H	20,85 $\pm$ 1,52 A
H+Q+H	18,13 $\pm$ 2,52 A
Q+Q+Q	23,61 $\pm$ 8,68 A
Q+E+Q	18,18 $\pm$ 5,32 A

H = hipoclorito de sódio 1 %; E = Edta a 17 %; Q = Quitosana 0,2%.

Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$).

Na análise dos Terços radiculares, observou-se que o apical apresentou menores valores de extensão de *tags* formados, com diferença estatisticamente significativa em relação ao médio e cervical ($p<0,05$), que apresentaram os maiores valores, sem diferenças estatisticamente significantes entre si (Tabela 37).

Tabela 37. Médias $\pm$ desvios-padrão (μm) da extensão de *tags* formados na interface material obturador/dentina para os Terços radiculares em geral.

Terços radiculares	Média $\pm$ desvio padrão
Cervical	23,64 $\pm$ 4,42 A
Médio	20,89 $\pm$ 4,09 A
Apical	16,04 $\pm$ 4,42 B

Letras iguais indicam que não houve diferença estatisticamente significante ($p>0,05$).

Nos Grupos H+E+H e H+Q+H, observou-se que não houve diferença estatisticamente significante entre os terços radiculares avaliados ($p>0,05$) (Tabela 38 e 39).

Tabela 38. Médias $\pm$ desvios-padrão (μm) da extensão de *tags* formados para o Grupo H+E+H de soluções irrigadoras nos terços radiculares.

Terços radiculares	Média $\pm$ desvio padrão
Cervical	20,85 $\pm$ 5,04 A
Médio	19,33 $\pm$ 7,29 A
Apical	22,37 $\pm$ 11,44 A

H = hipoclorito de sódio 1 %; E = Edta a 17 %; Q = Quitosana 0,2%. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significante ($p<0,05$).

Tabela 39. Médias $\pm$ desvios-padrão (μm) da extensão de *tags* formados para o Grupo H+Q+H de soluções irrigadoras nos terços radiculares.

Terços radiculares	Média $\pm$ desvio padrão
Cervical	20,67 $\pm$ 8,68 A
Médio	18,10 $\pm$ 11,92 A
Apical	15,63 $\pm$ 6,65 A

H = hipoclorito de sódio 1 %; E = Edta a 17 %; Q = Quitosana 0,2%. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significante ($p<0,05$).

Para o Grupo Q+Q+Q, verificou-se que o terço apical apresentou os menores valores de extensão de *tags* formados, com diferença estatisticamente significante em relação aos terços médio e cervical ($p<0,05$), que apresentaram os maiores valores, sem diferenças estatisticamente significantes entre si (Tabela 40).

Tabela 40. Médias $\pm$ desvios-padrão (μm) da extensão de *tags* formados para o Grupo Q+Q+Q de soluções irrigadoras nos terços radiculares.

Terços radiculares	Média $\pm$ desvio padrão
Cervical	30,10 $\pm$ 7,52 A
Médio	26,98 $\pm$ 7,13 A
Apical	13,76 $\pm$ 3,35 B

H = hipoclorito de sódio 1 %; E = Edta a 17 %; Q = Quitosana 0,2%. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

No Grupo Q+E+Q, evidenciou-se que o terço apical apresentou os menores valores de extensão de *tags* formados, com diferença estatisticamente significativa apenas em relação ao cervical ($p < 0,05$) (Tabela 41).

Tabela 41. Médias $\pm$ desvios-padrão (μm) da extensão de *tags* formados para o Grupo Q+E+Q de soluções irrigadoras nos terços radiculares.

Terços radiculares	Média $\pm$ desvio padrão
Cervical	22,94 $\pm$ 5,01 A
Médio	19,17 $\pm$ 6,60 AB
Apical	12,43 $\pm$ 2,60 B

H = hipoclorito de sódio 1 %; E = Edta a 17 %; Q = Quitosana 0,2%. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

A seguir, encontram-se as imagens representativas de cada análise realizada para cada grupo experimental. A figura 21 é referente à análise do perímetro e da contagem dos túbulos e a figura 22 é concernente à análise da penetração do cimento na interface material obturador/dentina. Todas as análises foram realizadas com o uso do *Software* OLS 4000, que gerencia as imagens obtidas com o microscópio confocal.

Figura 21. Análise do perímetro e da contagem dos túbulos. Os pontos em vermelho mostram a quantidade de túbulos dentinários abertos. **(A)** G1 - NaOCl + EDTA + NaOCl; **(B)** G2 - NaOCl + Quitosana + NaOCl; **(C)** G3 - Quitosana + Quitosana + Quitosana; **(D)** G4 - Quitosana + EDTA + Quitosana.

Figura 22. Análise da penetração do cimento na interface material obturador/dentina. Setas vermelhas sinalizam as linhas azuis que representam o quanto o cimento obturador penetrou nos túbulos dentinários. **(A)** G1 - NaOCl + EDTA + NaOCl; **(B)** G2 - NaOCl + Quitosana + NaOCl; **(C)** G3 - Quitosana + Quitosana + Quitosana; **(D)** G4 - Quitosana + EDTA + Quitosana.

As imagens de microscopia confocal a laser, apresentadas na Figura 23, permitem observar qualitativamente que, nos Grupos Q+Q+Q e Q+E+Q, é possível observar melhor justaposição e interação da superfície da dentina com o cimento obturador resinoso, diferentemente do observados nos Grupos H+E+H e H+Q+H, nos quais deparam-se com pior adaptação do cimento à dentina radicular.

Figura 23. Análise da interface material obturador/dentina. (A) G1 - NaOCl + EDTA + NaOCl; (B) G2 - NaOCl + Quitosana + NaOCl; (C) G3 - Quitosana+ Quitosana + Quitosana; (D) G4 - Quitosana + EDTA + Quitosana.

Discussão

Diferentes soluções irrigadoras são frequentemente utilizadas para eliminar *debris*, lubrificar paredes dentinárias, destruir bactérias, remover a camada de *smear* e os tecidos remanescentes (ZHANG et al., 2010). Porém, essas soluções, devido ao contato com o tecido dental durante o procedimento de irrigação, modificam significativamente o conteúdo mineral da dentina radicular, fato este que deve ser avaliado (ARI; ERDEMIR, 2005; COBANKARA; ERDOGAN; HAMURCU, 2011).

O presente estudo buscou determinar, por meio da Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier e pela Microscopia Confocal a laser, as alterações físico-químicas e morfológicas na dentina do canal radicular tratada com diferentes soluções irrigadoras conhecidas e adotadas para a realização da terapia endodôntica (hipoclorito de sódio a 1% e EDTA a 17%), e uma solução já conhecida, porém apenas testada e utilizada como agente quelante, v.g., a Quitosana a 0,2% (SILVA et al., 2012; SILVA et al., 2013; DEL CARPIO-PEROCHENA et al., 2015). O uso da espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier possibilita a identificação de estruturas moleculares e dos compostos orgânicos e inorgânicos presentes na dentina radicular, de forma não destrutiva. Esta identificação ocorre pelo espectro de absorção da amostra, que é gerado a partir dos modos vibracionais das moléculas que compõem a dentina. Os espectros obtidos por meio deste método caracterizam a composição e concentração de substâncias minerais e orgânicas das superfícies analisadas, criando parâmetros de comparação entre elas (DI RENZO et al., 2001; ZHANG et al., 2010). Tais circunstâncias mostraram-se de utilidade para a realização das investigações propostas neste estudo.

A microscopia confocal utilizada nesse experimento permitiu a visualização do cimento endodôntico no interior dos canalículos dentinários. A literatura ressalta que a principal vantagem da microscopia confocal em relação à MEV é de não haver

necessidade da utilização de vácuo ou metalização, que promovem desidratação das amostras, além de poder ocasionar artefatos de técnica (BITTER et al., 2009; DE DEUS et al., 2011).

Alguns trabalhos estudam apenas a eficiência dos agentes quelantes na remoção da camada de *smear* (TEIXEIRA; FELIPPE; FELIPPE, 2005; DAI et al., 2011; GALLER et al., 2015; TABRIZIZADEH; SHAREGHI, 2015). Porém, seus efeitos sobre a dentina também devem ser observados, uma vez que há evidências científicas de que as soluções quelantes, assim como as soluções irrigadoras, causam alterações estruturais na dentina radicular, com influência nas propriedades mecânicas e nas físicas da estrutura dental (HENNENQUIN; PAJOT; AVIGNAT, 1994; HENNEQUIN; DOUILLARD, 1995; SLUTZKY-GOLDBERG et al., 2004; COBANKARA; ERDOGAN; HAMURCU, 2011). As soluções quelantes e desmineralizantes atuam sobre o cálcio da matriz de hidroxiapatita da dentina, com consequente exposição de colágeno (SLUTZKY-GOLDBERG et al., 2004).

Na primeira fase do presente estudo, a dentina radicular não foi instrumentada, o que não gerou camada de *smear* na sua superfície, de modo a permitir a avaliação da perda do material orgânico e inorgânico da dentina que ocorre quando em franco contato com as soluções irrigadoras avaliadas, sem a interposição da camada de *smear* entre as soluções avaliadas e as paredes dentinárias (ARI; ERDEMIR, 2005; GARCIA-GODOY et al., 2005; SAYIN et al., 2007; ZHANG et al., 2010).

Os dentes utilizados neste estudo foram coletados aleatoriamente de diferentes pacientes. Portanto, o conteúdo mineral inicial (T0-*baseline*) foi diferente para todos os dentes, porém o acaso na separação dos grupos tornou tal aspecto

semelhante para todos os grupos experimentais (COBANKARA; ERDOGAN; HAMURCU, 2011).

As soluções aqui avaliadas possuem ações físico-químicas diferentes, que justificaram as suas escolhas para análise. O EDTA, em contato com a superfície dentinária, provoca a descalcificação da dentina peri e intertubular e, assim, deixa o colágeno exposto. O NaOCl dissolve o colágeno e deixa a entrada dos túbulos dentinários mais aberta e exposta (TEIXEIRA; FELIPPE; FELIPPE, 2005). Este é um agente proteolítico não específico, capaz de remover material orgânico e íons de magnésio, carbonato e fosfato, importantes para as propriedades mecânicas da dentina (PASCON et al., 2009). Consequentemente, com a degradação dos seus componentes orgânicos (HABELITZ et al., 2002; MARENDING et al., 2007; PASCON et al., 2009), as propriedades mecânicas da dentina são afetadas (ZHANG et al., 2010), tais como a redução da microdureza (SLUTZKY-GOLBERG et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2007), da resistência à flexão, e do módulo de elasticidade (GRIGORATOS et al., 2001; MARENDING et al., 2007).

Como consequência da ação do NaOCl em porções orgânicas, as propriedades de dissolução dos tecidos e seus efeitos antibacterianos, que são desejados na endodontia, foram mutuamente interligados com os efeitos indesejáveis. Nesse contexto, é importante ressaltar que a porção mineral da dentina tem efeito protetor sobre o colágeno e, portanto, os agentes desmineralizantes utilizados para remoção da camada de *smear* deixam esta porção orgânica desprotegida, uma vez que não é resistente à ação proteolítica, de modo a agilizar o efeito destrutivo do hipoclorito de sódio (DI RENZO et al., 2001; OYARZUN; CORDERO; WHITTLE, 2002; MARENDING et al., 2007).

A busca de soluções que preservem a estrutura do colágeno é necessária, o que justifica a realização de pesquisas que se estudem soluções que dissolvam a parte mineral sem causar alterações negativas no colágeno da dentina, e que permitam o selamento da interface material obturador/dentina após a obturação do canal radicular. Sugere-se, assim, que, com a utilização da Quitosana como solução irrigadora, o dano seja em menor proporção devido à sua capacidade de ligação com as fibras de colágeno por meio de atração eletrostática, envolvendo-as, o que aumenta a resistência do colágeno exposto e o protege da ação das collagenases (SILVA et al., 2012; PERSADMEHR et al., 2014). Além disso, é uma alternativa potencial ao uso do EDTA devido ao seu potencial quelante (SILVA et al., 2012) e antimicrobiano (LIU et al., 2001; RAAFAT; SAHL, 2009). Esse biopolímero melhora a resistência à nova contaminação bacteriana e à formação e aderência da camada de *smear*, que é uma das mais importantes causas do insucesso do tratamento endodôntico (KISHEN et al., 2008; DEL CAPIO-PEROCHENA et al., 2015), o que justifica a avaliação do uso dessa substância como solução irrigadora, isoladamente e em associações com outras substâncias químicas.

Com base nas análises pelo método citado, constatou-se que a sequência de irrigação com Quitosana-EDTA-Quitosana apresentou maior razão amida/fosfato, indicadora da maior presença de estrutura orgânica exposta e, portanto, maior desmineralização da superfície dentinária. Isso se deve, provavelmente, à combinação das duas soluções com características quelantes; utilizadas durante o preparo químico mecânico dos canais radiculares, com eventual potencialização da ação do EDTA, que entrou em contato prévio com as paredes dentinárias dotadas de focos de desmineralização, de modo a causar efeito ampliado desse aspecto negativo (COBANKARA; ERDOGAN; HAMURKU, 2011). Quimicamente, a interação

da Quitosana, que ocorre com apenas uma pequena parte do colágeno, é puramente de natureza eletrostática, e a maior parte permanece inalterada ou com poucas modificações. Este comportamento pode ser interpretado por considerar que ocorre o encapsulamento do colágeno pela Quitosana. Dessa forma, ela impede que outras interações ocorram com o colágeno, que está envolvido na formação da cápsula. Essas ligações eletrostáticas ocorrem entre os grupos aminos da Quitosana e os radicais COO^- do colágeno. A interação da Quitosana com o colágeno também pode afetar o mecanismo de hidrólise pelas collagenases de duas maneiras: pela inibição do processo de reconhecimento do colágeno pelas collagenases ou pela interação direta com a enzima (DEL CAPIO-PEROCHENA et al., 2015; LIU et al., 2001; NIKHIL et al. 2016; RAAFAT; SAHL, 2009).

A sequência de irrigação com NaOCl-EDTA-NaOCl evidenciou os maiores valores para a razão carbonato/fosfato, indicadora da quantidade do conteúdo inorgânico presente na amostra. Esses resultados demonstram que, quanto maior o valor da razão, maior a quantidade de carbonato presente na amostra, que é um radical mais sensível do que o fosfato. Esse achado coincide com o de Dogan et al. (2001), que mostrou que o NaOCl provoca alterações significativas no conteúdo mineral da dentina.

Sugere-se que o tratamento com NaOCl cause acumulação do conteúdo mineral na dentina humana (INABA et al., 1996), o que resulta em aumento da quantidade de carbonato e diminuição de fosfato (TSUDA; RUBEN; ARENDS, 1996). Baumgartner et al. (1992) sugeriu que o uso isolado do NaOCl como solução irrigadora pode expor o material inorgânico da dentina, devido à dissolução da matéria orgânica, e ali deixa uma camada de tecido mineralizado - *smear*. Esta

camada mineralizada seria uma das razões pelas quais o NaOCl aumentou a razão Ca/P da superfície dentinária (DOGAN et al., 2001).

Provavelmente, a diferença encontrada entre os grupos de soluções irrigadoras deve-se principalmente à ação do EDTA a 17%, que, quando utilizado no Grupo Quitosana+EDTA+Quitosana, entra em contato com a superfície dentinária dotada de pontos de desmineralização decorrentes do efeito quelante da Quitosana, de modo a potencializar o efeito desmineralizante do EDTA. Isso não ocorreu no Grupo NaOCl+EDTA+NaOCl, já que o NaOCl não tem a capacidade desmineralizante, de modo a propiciar a ocorrência dos núcleos mencionados. No Grupo Quitosana+Quitosana+Quitosana, ou seja, quando do uso puro e simples da substância, observou-se boa capacidade de desmineralização ao analisar o componente inorgânico, porém em menor expressão do que quando utilizada em associação com o EDTA. Devido à sua capacidade de proteção ao colágeno (SILVA et al., 2012; PERSADMEHR et al., 2014), não se observou grande quantidade de colágeno exposto quando avaliado o seu conteúdo orgânico.

Esse resultado está de acordo com outros estudos que mostram que o EDTA provoca a remoção de grande quantidade de cálcio e fósforo da dentina radicular (SAYIN et al., 2007), além de provocar irregularidades na dentina peri e intertubular com a aplicação acima de 1 minuto e em volume maior que 1 mL (ÇALT; SERPER, 2002; TORABINEJAD et al., 2003; TAY; GUTMANN; PASHLEY, 2007; KHEDMAT; SHOKOUHINEJAD, 2008). Estudos apresentam resultados semelhantes quando se compararam diferentes concentrações de EDTA utilizadas com várias outras substâncias irrigadoras, o que mostrou que o EDTA apresenta efeitos similares (SOUSA; SILVA, 2005) ou mais potentes (ARI; ERDEMIR, 2005) na extração do

Ca^{2+} da dentina radicular, e que foram exacerbados com a extensão do tempo de contato das soluções com as superfícies dentinárias (SAYIN et al., 2007).

Outros estudos verificaram que o EDTA e o NaOCl são capazes de alterar a estrutura mineral (SAYIN et al., 2007; BALLAL; MALA; BHAT, 2011; PASCON et al., 2012), e se sugere diminuição das propriedades mecânicas uma vez que a porção mineral do tecido dentinário contribui para o módulo de elasticidade e dureza, enquanto que o colágeno é responsável pela tenacidade dos tecidos (SLUTZKY-GOLGBERG et al., 2004; MARENDING et al., 2007). Dessa forma, a destruição do colágeno nos tecidos mineralizados pode aumentar a susceptibilidade à fratura do dente tratado endodonticamente (ZHANG et al., 2010). Como a solução de EDTA apresenta efeito desmineralizante forte, ocorre o alargamento dos túbulos dentinários, amolecimento da dentina e desnaturação das fibras de colágeno. Estes efeitos podem causar dificuldade na adaptação dos materiais obturadores às paredes dos canais radiculares (ÇALT; SERPER, 2002).

A maior quantidade de colágeno exposto, observada no Grupo Quitosana+EDTA+Quitosana, quando em demasia, pode deixar a interface material obturador/dentina vulnerável às ações de degradação das metaloproteinases (MMPs), após a obturação. A degradação do colágeno pelas enzimas bacterianas e pelas MMPs derivadas do hospedeiro é outro fator que pode levar à perda de integridade estrutural dos dentes obturados (FERRARI et al, 2004;. KISHEN, 2006). As bactérias e os seus produtos podem estimular diretamente a ativação das MMPs, que contribuem para remodelação do tecido tanto fisiológico como patológico (CHAUSSAIN-MILLER et al., 2006; CARRILHO et al. 2009). Portanto, estratégias de tratamento para inibir a liberação das MMPs e para resistir ao potencial de

degradação da matriz de colágeno pelas MMPs são de suma importância na endodontia.

Assim, no Grupo Quitosana+ Quitosana+ Quitosana, no qual foi utilizada a solução de Quitosana em todas as etapas, foi observada boa quantidade de colágeno exposto, que é essencial na interação da dentina com o cimento obturador resinoso, e não deixou grande interface vulnerável às intempéries do meio. Logo, a Quitosana melhorou os substratos sem alterar tanto as suas composições químicas.

Neste estudo, também foi possível visualizar que o grupo em que foi utilizada a Quitosana em todas as etapas da simulação do tratamento endodôntico, observou-se desmineralização crescente com o passar do tempo, porém menor do que quando utilizado o EDTA. Isso ocorre porque a Quitosana é um ácido fraco e auto limitante; por isso, abre os túbulos dentinários (LEVINE, 1971; PASHLEY et al. 1991).

Além disso, devido à capacidade de a Quitosana ligar-se às fibrilas de colágeno, ao mesmo tempo em que ela promove a desmineralização da superfície e a proteção do colágeno, atrai os íons Ca^{2+} , e parte desses íons permanecerão no colágeno. Esse raciocínio explica os resultados do componente orgânico encontrados no grupo Quitosana+Quitosana+Quitosana, onde não se encontrou alteração nos diferentes tempos, com a explicação provável de que a Quitosana desmineralizou a superfície, expôs o colágeno, porém o componente inorgânico não se alterou nos resultados, pois o Cálcio restou precipitado na Quitosana (TARAVEL, DOMARD, 1993).

Os resultados deste trabalho mostraram que existe variação na proporção de compostos inorgânicos entre os terços radiculares em todos os grupos avaliados. A razão carbonato/fosfato é maior no terço apical quando comparado aos demais

terços, evidenciando seu maior grau de mineralização, o que provavelmente decorre da menor quantidade e menor diâmetro dos túbulos neste terço (PAQUÉ et al., 2006; LOTTANTI et al., 2009). Além disso, essa região pode apresentar áreas completamente desprovidas de túbulos, sendo frequentemente esclerosada e mais mineralizada (LOTTANTI et al., 2009). Essa diferença de composição química característica do elemento dental entre os terços radiculares merece destaque, uma vez que interfere diretamente nos procedimentos adesivos e restauradores (NEELAKANTAN et al., 2012).

A anatomia mais estreita da região apical e a menor acessibilidade das soluções irrigadoras a ela têm sido sugeridas como razões para a maior presença da camada de *smear* (ARVANITI; KHABBAZ, 2011; TABRIZIZADEH; SHAREGHI, 2015), o que reforça ainda mais a importância de se realizar boa irrigação em todo o comprimento do canal radicular e que as deste canal determinam o volume da solução irrigadora que entra em contato com as paredes radiculares e, conseqüentemente, sua eficiência (ARVANIT; KHABBAZ, 2011).

O uso das soluções irrigadoras em conjunto com o preparo mecânico é essencial na remoção da camada de *smear* e das bactérias, principalmente nas áreas mais inacessíveis à instrumentação no canal radicular (VAN DER VYVES 2014), além de criar formato do canal radicular mais amplo e favorável para posterior obturação (ALBRECHT; BAUMGARTNER; MARSHALL, 2004, ARI, ERDEMIR; BELLI, 2004). Para isso, são necessários métodos na terapia endodôntica, nos quais o preparo do canal radicular produza alargamento maior do seu espaço, a fim de superar as dificuldades encontradas na irrigação principalmente na região apical, que pode ser obtido com a utilização de instrumentos dotados de *tapers* maiores, o que justifica a utilização do instrumento final #60.04 na segunda fase deste trabalho,

permitindo melhores condições de irrigação, pois, quanto maior o espaço, melhor a penetração da solução irrigadora no canal radicular e, portanto, maior o contato das soluções com as paredes dentinárias (ALBRECHT; BAUMGARTNER; MARSHALL, 2004; USMAN; BAUMGARTNER; MARSHALL, 2004; ARVANITI; KHABBAZ, 2011).

Em relação aos tempos, após o Tempo 3, no qual todas as soluções já entraram em contato com os fragmentos de dentina, foi possível observar maior quantidade de matéria orgânica exposta, quando comparado ao Tempo 0, porém apresentou resultados semelhantes aos Tempo 1 e 2, que correspondem à análise realizada após a utilização da primeira solução simulando a irrigação durante a instrumentação, e após a irrigação com a segunda solução irrigadora utilizada, respectivamente. A partir disto, é possível observar que, quanto maior tempo da solução irrigadora em contato com a superfície dentinária, maior foi o seu efeito final em relação ao inicial, (CLARKSON et al., 2006; ROSSI-FEDELE; DE FIGUEIREDO, 2008; ZHANG et al., 2010; ARSLAN et al., 2015). Estudos prévios evidenciaram que as ações do NaOCl e do EDTA são maiores de acordo com a concentração e tempo de contato com o substrato, corroborando com os resultados do presente estudo (SAYIN et al., 2007; SAITO et al., 2008, ZHANG et al., 2010).

Morfologicamente, foi possível observar nesse estudo que a utilização da Quitosana promoveu boa atuação na abertura dos túbulos dentinários, provavelmente devido ao seu potencial quelante (SILVA et al., 2012). Todas as soluções promoveram diminuição da rugosidade de superfície quando em contato com a dentina, devido ao próprio processo de instrumentação e limpeza que já retifica e modela o canal radicular, o que remove a camada de *smear* que também aparece nas imagens tornando a superfície mais irregular.

Quando a sequência de irrigação NaOCl–EDTA–NaOCl é utilizada, as fibras de colágeno perdem a cápsula de proteção que advém da hidroxiapatita, deixando-as mais expostas à ação degradante do NaOCl. Este protocolo mostrou influência negativa na adesão do cimento resinoso AH Plus com a dentina (NEELAKANTAN et al., 2011), uma vez que é especulado que os anéis epóxicos do cimento liguem-se quimicamente aos grupos aminos presentes no colágeno da dentina (FISHER; BERZINS; BAHCALL, 2007; NEELAKANTAN et al., 2015).

A remoção da camada de *smear* e do *smear plug* é considerada essencial para permitir a penetração dos cimentos através dos túbulos (MOON et al., 2010). Assim, à guisa de especulação, a presença de cimento nos túbulos dentinários pode ser indicativa dessa remoção. Houve diferença de penetração do cimento endodôntico entre os terços radiculares apenas nos grupos em que foi utilizada a solução de Quitosana, onde foi possível observar maior penetração do cimento nos terços cervical e médio do que no apical. A penetração do cimento ocorre nos túbulos dentinários, que tendem a diminuir da porção cervical para a porção apical, uma vez que a dentina não é uniformemente mineralizada (CARRIGAN et al., 1984), e devido à maior pressão que a região do terço cervical sofre durante a fase de condensação da massa obturadora no sistema de canais radiculares. A dentina apical pode apresentar áreas completamente desprovidas de túbulos (MJÖR et al., 2001), sendo frequentemente esclerosada e mais mineralizada (VASSILIADIS et al., 1994). Adicionalmente, nas regiões cervicais, além de existir maior quantidade de túbulos dentinários, observam-se também canalículos com diâmetros maiores (MJÖR et al., 2001; AMOROSO-SILVA et al., 2014). Chandra et al. (2012) avaliaram a penetração de quatro diferentes cimentos endodônticos resinosos no interior dos canalículos dentinários, por meio da microscopia confocal, e mostraram maior

penetração dos materiais no terço cervical, seguido do terço médio e por último, terço apical, corroborando os achados do presente trabalho. Observações semelhantes foram relatadas por Tuncer e Tuncer (2012), em um estudo que avaliou o efeito da irrigação final com EDTA, ácido cítrico e ácido maléico na percentagem e extensão de penetração de cimento através dos túbulos dentinários. Verificaram, em todos os grupos, que a porção cervical do canal radicular apresentou alta percentagem e maior extensão de penetração do cimento que as amostras dos terços médio e apical.

Importante frisar que alguns autores ressaltam que a penetração do cimento endodôntico no interior dos túbulos dentinários apresenta a vantagem de promover retenção mecânica do material obturador nas paredes dentinárias (KOKKAS et al., 2004; ORDINOLA- ZAPATA et al., 2009). Atua ainda, como um “agente bloqueador”, dificultando nova infecção bacteriana e ou inativando as que permaneceram no interior dos túbulos dentinários (AMOROSO-SILVA et al., 2014).

O presente estudo foi feito *in vitro*. Portanto, os resultados obtidos não necessariamente definem as ações das substâncias testadas *in situ*. Sangue, tecidos remanescentes e outras variáveis podem afetar as ações das soluções sob investigação, no canal radicular (KURUVILLA et al., 2015). É importante conhecer como cada solução afeta a dentina radicular antes de usá-la clinicamente. Estudos clínicos são necessários para confirmar esses resultados e avaliar sua relevância no resultado do tratamento endodôntico.

Conclusão

Com base na metodologia utilizada e nos resultados obtidos neste estudo, conclui-se que:

A Quitosana, de modo geral, utilizada como solução irrigadora; produziu menos alterações químicas na dentina radicular quando comparada às demais soluções empregadas;

- Quanto à análise, por meio do FTIR, da superfície dentinária, na primeira fase do experimento, a associação da quitosana com o EDTA (grupo Q+E+Q) resultou na maior quantidade de porção orgânica exposta, e que foi incrementada com o tempo. A região analisada não influenciou nos resultados, e a associação do hipoclorito de sódio com o EDTA (grupo H+E+H) resultou na maior quantidade de material inorgânico.

- Quanto ao uso das soluções irrigadoras analisadas durante o preparo biomecânico seguido de obturação com cimento resinoso AH Plus, observou-se maior número de túbulos dentinários expostos e maiores perímetros ao final da irrigação. Em todos os grupos experimentais houve diminuição da rugosidade de superfície quando em contato com a dentina independentemente das soluções avaliadas. Em relação à interface material obturador/dentina, os terços cervical e médio apresentaram maior penetração do cimento endodôntico no interior dos túbulos dentinários, principalmente nos grupos em que a Quitosana foi utilizada.

Referências

ALBRECHT, L.J.; BAUMGARTNER, J.C.; MARSHALL, J.G. Evaluation of apical debris removal using various sizes and tapers of Profile GT files. **Journal of endodontics**, v.30, n.6, p.425-8, 2004.

AMOROSO-SILVA, PA; GUIMARÃES, BM; MARCIANO, M. A.; DUARTE, M. A.; CAVENAGO, B. C.; ORDINOLA-ZAPATA, R.; ALMEIDA, M. M.; MORAES, I. G. Microscopic analysis of the quality of obturation and physical properties of MTA Fillapex. **Microscopy Research and Technique**, v. 77, n. 12, p.1031-6, 2014.

ARI, H.; BELLI, S.; GUNES, B. Sealing ability of Hybrid Root SEAL (MetaSEAL) in conjunction with different obturation techniques. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology Endodontics**, v.109, n.6, p.e113-e116, 2010.

ARI, H.; ERDEMIR, A; BELLI, S. Evaluation of the effect of endodontic irrigation solutions on the microhardness and the roughness of root canal dentin. **Journal of endodontics**, v.30, n.11, p.792-5, 2004.

ARI, H.; ERDEMIR, A. Effects of endodontic irrigation solutions on mineral content of root canal dentin using ICP-AES technique. **Journal of Endodontics**, v.31, n.3, p.187-9, 2005.

ARSLAN, D.; GUNESER, M. B.; KUSTARCI, A.; ER, K.; SISO, S. H. Pulp tissue dissolution capacity of QMix 2in1 irrigation solution. **European Journal of Dentistry**, v.9, n.3, p.423-7, 2015.

ARVANITI, I. S.; KHABBAZ, M. G. Influence of root canal taper on its cleanliness: a scanning electron microscopic study. **Journal of Endodontics**, v.37, n.6, p.871-4, 2011.

BALLAL, N. V.; MALA, K.; BHAT, K. S. Evaluation of decalcifying effect of maleic acid and EDTA on root canal dentin using energy dispersive spectrometer. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontology**, v.112, n.2, p.e78-84, 2011.

BARÓN, M.; LLENA, C.; FORNER, L.; PALOMARES, M.; GONZÁLEZ-GARCIA, C.; SALMERÓN-SANCHEZ, M. Nanostructural changes in dentine caused by endodontic irrigants. **Medicina Oral Patologia Oral y Cirugia Bucal**, v.18, n.4, p.e733-6, 2013.

BAUMGARTNER, J.C.; CUENIN, P.R. Efficacy of several concentration of sodium hypochlorite for root canal irrigation. **Journal of Endodontics**, v.18, n.12, p.605-12, 1992.

BEDRAN-RUSSO, A. K.; PEREIRA, P. N.; DUARTE, W. R.; DRUMMOND, J. L.; YAMAUCHI, M. Application of crosslinkers to dentin collagen enhances the ultimate tensile strenght. Journal of biomedical materials research.Part B. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied biomaterials**, v.80, n.1, p.268-72, 2007.

BEDRAN-RUSSO, A. K.; CASTELLAN, C. S.; SHINOHARA, M. S.; HASSAN, L.; ANTUNES, A. Characterization of biomodified dentin matrices for potencial preventive and reparative therapies. **Acta Biomaterials**, v.7, n.4, p.1735-1741, 2011.

BITTER, K.; PARIS, S.; MUELLER, J.; NEUMANN, K.; KIELBASSA, A. M. Correlation of scanning electron and confocal laser scanning microscopic analyses for visualization of dentin/adhesive interfaces in the root canal. **The Journal of Adhesive Dentistry**, v. 11, n. 1, p. 7-14, 2009.

BRESCHI, L.; MAZZONI, A.; NATO, F.; CARRILHO, M.; VISINTINI, E.; TJÄDERHANE, L.; RUGGERI, A.; TAY, F. R.; DORIGO EDE, S.; PASHLEY, D. H. Chlorhexidine stabilizes the adhesive interface: A 2-year in vitro study. **Dental Materials**, v.26, n.4, p.320-5, 2010.

CARRIGAN, P. J.; MORSE, D. R.; FURST, M. L.; SINAI, I. H. A scanning electron microscopic evaluation of human dentinal tubules according to age and location. **Journal of Endodontics**, v.10, p. 359-63, 1984.

CARRILHO, M. R.; TAY, F. R.; DONNELLY, A. M.; AGEE, K. A.; TJADERHANE, L.; MAZZONI, A.; BRESCHI, L.; FOULGER, S.; PASHLEY, D.H. Host-derived loss of dentin matrix stiffness associated with solubilization of collagen, **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied biomaterials**, v.14, n.7, p.373-80, 2009.

CHANDRA, S. S.; SHANKAR, P.; INDIRA, R. Depth of Penetration of Four Resin Sealers into Radicular Dentinal Tubules: A Confocal Microscopic Study. **Journal of Endodontics**, v. 38, p. 1412–1416, 2012.

CHANDRASEKHAR, V.; MORISHETTY, P. K.; METLA, S. L.; RAJU, C. Expansion of gutta-percha in contact with various concentrations of zinc oxide-eugenol sealer: a three-dimensional volumetric study. **Journal of Endodontics**, v.37, n.5, p. 697-700, 2011.

CHAUSSAIN-MILLER, C.; FIORETTI, F.; GOLDBERG, M.; MENASHI, S. The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in human caries. **Journal of Dental Research** v.85, n.1, p.22-32, 2006.

CHENG, Y.; HUANG, S.; HSIEN, H.; CHIANG, Y.; LIN, C. Influence of cyclic heating on physical property and biocompatibility of α - and β - form gutta-percha. **Journal of the Formosan Medical Association**, v.xx, p.1-8, 2012.

CLARKSON, R. M.; MOULE, A. J.; PODLICH, H.; KELLAWAY, R.; MACFARLANE, R.; LEWIS, D.; ROWELL, J. Dissolution of porcine incisor pulps in sodium hypochlorite solutions of varying compositions and concentrations. **Australian Dental Journal**, v.51, n.3, p.245-51, 2006.

COBANKARA, F. K.; ERDOGAN, H.; HAMURCU, M. Effects of chelating agents on the mineral content of root canal dentin. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontology**, v.112, n.6, p.e149-54, 2011.

ÇALT, S.; SERPER, A. Time-dependent effects of EDTA on dentin structures. **Journal of Endodontics**, v.28, n.1, p.17-9, 2002.

DAI, L.; KHECHEN, K.; KHAN, S.; GILLEN, B.; LOUSHINE, B.A.; WIMMER, C.E.; GUTMANN, J.L.; PASHLEY, D.; TAY, F.R. The effect of QMix, an experimental antibacterial root canal irrigant, on removal of canal wall smear layer and debris. **Journal of endodontics**, v.37, n.1, p.80-4, 2011.

DE DEUS, G.; REIS, C.; DI GIORGI, K.; BRANDÃO, M. C.; AUDI, C.; FIDEL, R. A. Interfacial adaptation of the Epiphany self-adhesive sealer to root dentin. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics**, v. 111, n. 3, p. 381-386, 2011.

DEITCH, A. K.; LIEWEHR, F. R.; WEST, L. A.; PATTON, W. R. A comparison of fill density obtained by supplementing cold lateral condensation with ultrasonic condensation. **Journal of Endodontics**, v.28, n.8, p.665-667, 2002.

DEL CARPIO-PEROCHENA, A.; BRAMANTE, C. M.; DUARTE, M. A.; DE MOURA, M. R.; AOUADA, F. A.; KISHEN, A. Chelating and antibacterial properties of chitosan nanoparticles on dentin. **Restorative Dentistry and Endodontics**, v. 40, n. 3, p. 195- 201, 2015.

DI RENZO, M.; ELLIS, T.H.; SACHER, E.; STANGEL, I. A photoacoustic FTIRS study of the chemical modifications of human dentin surfaces: II. Deproteination. **Biomaterials**, v.22, n.8, p.793-7, 2001.

DOĞAN, H.; QUALT, S. Effects of chelating agentes and sodium hypochlorite on mineral contente of root dentin. **Journal of Endodontics**, v.27, n.9, p.578-80, 2001.

EFSTRATIOU, M.; PAPAIOANNOU, W.; NAKOU, M.; KTENAS, E.; VROTSOS, I. A.; PANIS, V. Contamination of a toothbrush with antibacterial properties by oral microorganisms. **Journal of Dentistry**, v.35, n.4, p.331-7, 2007.

EVERAERTS, F.; TORRIANNI, M.; VAN LUYN, M.; VAN WACHAM, P.; FEIJEN, J.; HENDRIKS, M. Reduced calcification of bioprotheses, cross-linked via na improved carbodiimide based method. **Biomaterials**, v.25, n.24, p.5523-5530, 2004.

FAHMY, S.H.;EL GENDY, A.A.; EL ASHRY, S.H. Dentin wettability enhancement for three irrigating solutions and their effect on push out bond strength of gutta percha / AH Plus. **Journal of clinical and experimental dentistry**, v.1, n.7, p.e237-42, 2015.

FERRARI, M.; MASON, P. N.; GORACCI, C.; PASHLEY, D. H.; TAY, F. R. Collagen degradation in endodontically treated teeth after clinical function. **Journal Dental Research**, v.83, n.5, p. 414-9, 2004.

FISHER, M.A.; BERZINS, D.W.; BAHCALL, J.K. An in vitro comparison of bond strength of various obturation materials to root canal dentin using a push-out test design. **Journal of endodontics**, v.33, n.7, p.856-8, 2007.

GALLER, K. M.; WIDBILLER, M.; BUCHALLA, W.; EIDT, A.; HILLER, K. A.; HOFFER, P.; SCHMALZ, G. EDTA conditioning of dentine promotes adhesion, migration and differentiation of dental pulp stem cells. **International Endodontic Journal**, 2015.

GANSS, C.; LUSSI, A.;GRUNAU, O.;KLIMEK, J.; SCHLUETER, N. Conventional and anti-erosion fluoride toothpastes: effect on enamel erosion and erosion-abrasion. **Caries research**, v.45, n.6, p.581-9, 2011.

GARCIA-GODOY, F.; LOUSHINE, R. J.; ITTHAGARUN, A.; WELLER, R. N.; MURRAY, P. E.; FEILZER, A. J.; PASHLEY, D. H.; TAY, F. R. Application of biologically-oriented dentin

bonding principles to the use of endodontic irrigants. **American Journal of Dentistry**, v.18, n.4, p.281-90, 2005.

GRINGORATOS, D.; KNOWLES, J.; NG, Y. L.; GULABIVALA, K. Effect of exposing dentine to sodium hypochlorite and calcium hydroxide on its flexural strength and elastic modulus. **International Endodontic Journal**, v.34, n.2, p.113-9, 2001.

GROSSMAN, L. An improved root canal cement. **Journal American Dental Association**, v.56, n.3, p.381-385, 1958.

GULSAHI, K.; CENHELI, Z. C.; ONAY, E. O.; TASMAN-DAGLI, F.; UNGOR, M. Comparison of the area of resin-based sealer and voids in roots obturated with resilon and gutta-percha. **Journal of Endodontics**, v.33, n.11, p.1338-1341, 2007.

HABELITZ, S.; BALOOCH, M.; MARSHALL, S.J.; BALOOCH, G.; MARSHALL, G.W.JR. In situ atomic force microscopy of partially demineralized human dentin collagen fibrils. **Journal Structural of Biology**, v.138, n.3, p.227-236, 2002.

HAN, B.; JAUREQUI, J.; TANG, B. W.; NIMNI, M. E. Proanthocyanidin: A natural crosslinking reagent for stabilizing collagen matrices. **Journal of biomedical materials research Part A**, v.65, n.1, p.118-24, 2003.

HASHEM, A. A.; GHONEIM, A. G.; LUTFY, R. A.; FOUDA, M. Y. The effect of different irrigating solutions on bond strength of two root canal-filling systems. **Journal of Endodontics**, v.35, n.4, p.537-40, 2009.

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. **Journal of Endodontics**, v.20, n.11, p.551-4, 1994.

HENNEQUIN, M.; DOUILLARD, Y. Effects of citric acid treatment on the Ca, P and Mg contents of human dental roots. **Journal of Clinical Periodontology**, v.22, n.7, p.550-7, 1995.

INABA, D.; RUBEN, J.; TAKAGI, O.; ARENDS, I. Effect of sodium hypochlorite treatment on remineralization of human root dentin in vitro. **Caries Research**, v.30, n.3, p.218-24, 1996.

JAMES, B. L.; BROWN, C. R., LEGAN, J.J., MOORE, B. K.; VAIL, M. M. An in vitro evaluation of the contents of root canals obturated with gutta percha and AH-26 sealer or resilon and epiphany sealer. **Journal of Endodontics**, v.33, n.11, p.1359-1363, 2007.

JIA, W.; ALPERT, B. Dental filling material and endodontic post. **US patent 2007/0131139A1**. Wallingford, June 14, 2007.

KARIM, I. E.; KENNEDY, J.; HUSSEY, D. The antimicrobial effects of root canal irrigation and medication. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v.103, n.4, p.560-569, 2007.

KHEDMAT, S.; SHOKOUHINEJAD, N. Comparison of the efficacy of three chelating agentes in smear layer removal. **Journal of Endodontic**, v.34, n.5, p.599-602, 2008.

KISHEN, A. Mechanisms and risk factors for fracture predilection in endodontically treated teeth. **Endodontic Topics**, v.13, n.1, p.57-83, 2006.

KISHEN, A.; SHI, Z.; SHRESTHA, A.; NEOH, K. G. An investigation on the antibacterial and antibiofilm efficacy of cationic nanoparticulates for root canal disinfection. **Journal of Endodontics**, v.34, n.12, p. 1515-20, 2008.

KOKKAS, A. B.; BOUTSIUKIS, A.Ch.; VASSILIADIS, L.P.; STAVRIANOS, C.K. The influence of the smear layer on dentinal tubule penetration depth by three different root canal sealers: Na in vitro study. **Journal of Endodontics**, v.30, n.2, p.100-102, 2004.

KOLOSOWSKI, K. P.; SODHI, R. N.; KISHEN, A.; BASRANI, B. R. Qualitative time-of-flight secondary ion mass spectrometry analysis of root dentin irrigated with sodium hypochlorite, EDTA, or clorexidine. **Journal of Endodontics**, v.41, n.10, p.1672-7, 2015.

KURUVILLA, A.; JAGANATH, B. M.; KRISHNEGOWDA, S. C.; RAMACHANDRA, P. K. M.; JOHNS, D. A.; ABRAHAM, A. Acomparative evaluation of smear layer removal by using edta, etidronic acid, and maleic acid as root canal irrigants: An *in vitro* scanning eléctron microscopic study. **Journal of Conservative Dentistry**, v.18, n.3, p.247-251,2015.

LEA, C. S.; APICELLA, M. J.; MINES, P.; YANCICH, P.; PARKER, M. H. Comparison of the obturation density of cold lateral compaction versus warm vertical compaction using the

continuous wave of condensation technique. **Journal of Endodontics**, v.31, n.1, p.37-39, 2005.

LEVINE R. S. The distribution of hydroxyproline in sound human coronal dentine. **Archives of Oral Biology**, v.16, n. 5, p. 473-8, 1971.

LI, Z., YUBAO, L., YI, Z., LAN, W., JANSEN, J. *In vitro* and *in vivo* evaluation of the bioactivity of ZnO containing nano-hydroxyapatite/chitosan cement. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v.93, n.1, p. 269-79, 2010.

LIU, X. F.; GUAN, Y. L.; YANG, D. Z.; LI, Z.; YAO, K. D. Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan. **Journal of Applied Polymer Science**, v.79, n.7, p.1324-35, 2001.

LOTTANTI, S.; GAUTSCHI, H.; SENER, B.; ZEHNDER, M. Effects of ethylenediaminetetraacetic, etidronic and peracetic acid irrigation on human root dentine and the smear layer. **International Endodontic Journal**, v.42, n.4, p.335-43, 2009.

LUCCY, C.T.; WELLER, R.N.; KULILD, J.C. An evaluation of the apical seal roduced by lateral and warm lateral condensation techniques. **Journal of Endodontic** v.16, n. 4, p. 170-2, 1990.

MACEDO, R. G.; HERRERO, N. P.; WESSELINK, P.; VERSLUIS, M.; VAN DER SLUIS, L. Influence of the dentinal wall on the pH of sodium hypochlorite during root canal irrigation. **Journal of Endodontic**, v.40, n.7, p.1005-8, 2014.

MADHAVAN, K.; BELCHENKO, D.; MOTTA, A.; TAN, W. Evaluation of composition and crosslinking effects on collagen-based composite constructs. **Acta Biomaterialia**, v.6, n.4, p.1413-22, 2010.

MARENDING, M.; PAQUÉ, F.; FISCHER, J.; ZEHNDER, M. Impact of irrigant sequence on mechanical properties of human root dentin. **Journal of Endodontics**, v.33, n.11, p.1325-8, 2007.

MELLO, I.; KAMMERE, B. A.; YOSHIMOTO, D.; MACEDO, M. C.; ANTONIAZZI, J. H. Influence of final rinse technique on ability of ethylenediaminetetraacetic acid of removing smear layer. **Journal of endodontics**, v.36, n.3, p.512-4, 2010.

MENDONÇA, D. H. S.; COLUCI, V.; RACHED-JUNIOR, F. J.; MIRANDA, C. E. S.; SILVA-SOUSA, Y. T. C.; SILVA, S. R. C. Effects of various irrigation/aspiration protocols on cleaning of flattened root canals. **Brazilian Oral Research**, v.29, n.1, p.1-9, 2015.

MINER, M. R.; BERZINS, D. W.; BABCALL, J. K. A comparison of thermal properties between gutta-percha and a synthetic polymer based root canal filling material (resilon). **Journal of Endodontics**, v.32, n.7, p.683-6, 2006.

MJÖR, I. A.; SMITH, M. R.; FERRARI, M.; MANNOCCI, F. The structure of dentine in the apical region of human teeth. **International Endodontic Journal**, v. 34, p.346–53, 2001.

MOELLER, L.; WENZEL, A.; WEGGE-LARSEN, A.M.; DING, M.; KIRKEVANG, L.L. Quality of root fillings performed with two root filling techniques. An in vitro study using micro-CT. **Acta Odontologica Scandinavica** v.71, n.3-4, p.689-96, 2013.

MOON, Y. M.; SHON, W. J.; BAEK, S. H.; BAE, K. S.; KUM, K. Y.; LEE, W. Effect of final irrigation regimen on sealer penetration in curved root canals. **Journal of Endodontics**, v. 36, n.4, p. 732-6, 2010.

NEELAKANTAN, P.; SUBBARAO, C.; SUBBARAO, C. V.; DE-DEUS, G.; ZEHNDER, M. The impact of root dentin conditioning on sealing ability and push-out bond strength of an epoxy resin root canal sealer. **International Endodontic Journal**, v.44, n.6, p.491-8, 2011.

NEELAKANTAN, P.; VARUGHESE, A. A.; SHARMA, S.; SUBBARAO, C. V.; ZEHNDER, M.; DE-DEUS, G. Continuous chelation irrigation improves the adhesion of epoxy resin-based root canal sealer to root dentine. **International Endodontic Journal**, v.45, n.12, p.1097-102, 2012.

NEELAKANTAN, P.; SHARMA, S.; SHEMES, H.; WESSELINK, P. R. Influence of irrigation sequence on the adhesion of root canal sealers to dentin: A Fourier transform Infrared spectroscopy and push-out bond strength analysis. **Journal of Endodontics**, v.41, n.7, p.1108-11, 2015.

NIKHIL, V.; JAISWAL, S.; BANSAL, P.; ARORA, R.; RAJ, S.; MALHOTRA. Effect of phytic acid, ethylenediaminetetraacetic acid, and chitosan solutions on microhardness of the human radicular dentin. **Journal of conservative dentistry**, v.19, n.2, p.179-83, 2016.

NIU, W.; YOSHIOKA, T.; KOBAYASHI, C.; SUDA, H. A scanning electron microscopic study of dentinal erosion by final irrigation with EDTA and NaOCl solutions. **International Endodontic Journal**, v.35, n.11, p.934-9, 2002.

OLIVEIRA, L. D.; CARVALHO, C. A.; NUNES, W.; VALERA, M. C.; CAMARGO, C. H.; JORGE, A. O. Effects of chlorhexidine and sodium hypochlorite on the microhardness of root canal dentin. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v.104, n.4, p.e125-8, 2007.

ORDINOLA-ZAPATA R.; BRAMANTE, C. M.; GRAEFF, M. S.; DEL CARPIO PEROCHENA, A.; VIVAN, R. R.; CAMARGO, E. J.; GARCIA, R. B.; BERNARDINELLI, N.; GUTMMANN, J. L.; MORAES, I. G. Depth and percentage of penetration of endodontic sealers into dentinal tubules after root canal obturation using a lateral compaction technique: a confocal laser scanning microscopy study. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, Endodontics**, v. 108, n. 3, p. 450-457, 2009.

OYARZÚN, A.; CORDERO, A. M.; WHITTLE, M. Immunohistochemical evaluation of the effects of sodium hypochlorite on dentin collagen and glycosaminoglycans. **Journal of endodontics**, v.28, n.3, p.152-6, 2002.

PABLO, O.V.; ESTEVEZ, R.; SÁNCHEZ, M.P.; HEILBORN, C.; COHENCA, N. Root anatomy and canal configuration of the permanent mandibular first molar: A systematic review. **Journal of Endodontics**, v.36, n.12, p.1919-31, 2010.

PAQUÉ, F.; LUDER, H. U.; SENER, B.; ZEHNDER, M. Tubular sclerosis rather than the smear layer impedes dye penetration into the dentine of endodontically instrumented root canals. **International Endodontic Journal**, v.39, n.1, p.18-25, 2006.

PAQUÉ, F.; RECHENBERG, D-K.; ZEHNDER, M. Reduction of hard-tissue debris accumulation during rotary root canal instrumentation by etidronic acid in a sodium hypochlorite irrigant. **Journal of endodontics**, v.38, n.5, p.692-695, 2012.

PASCON, F. M.; KANTOVITZ, K. R.; SACRAMENTO, P. A.; NOBRE-DOS-SANTOS, M.; PUPPIN-RONTANI, R. M. Effect of sodium hypochlorite on dentine mechanical properties. A review. **Journal of Dentistry**, v.37, n.12, p.903-8, 2009.

PASCON, F. M.; KANTOVITZ, K. R.; SOARES, L. E.; SANTO, A. M.; MARTIN, A. A.; PUPPIN-RONTANI, R. M. Morphological and chemical changes in dentin after using endodontic agents: fourier transform Raman spectroscopy, energy-dispersive x-ray fluorescence spectrometry, and scanning electron microscopy study. **Journal of Biomedical Optics**, v.17, n.7, p. 075008-1/6, 2012.

PASHLEY D. H. Clinical correlations of dentin structure and function. **Journal of Prosthetic Dentistry**, v. 66, n. 6, p.777-81, 1991.

PAUL, ML.; MAZUMDAR, D.; NIYOGI, A.; BARANWAL, AK. Comparative evaluation of the efficacy of different irrigants including MTAD under SEM. **Journal of Conservative Dentistry**, v.16, n.4, p.336-41, 2013.

PERSADMEHR, A.; TORNECK, C.D.; CVITKOVITCH, D.G.; PINTO, V.; TALIOR, I.; KAZEMBE, M.; SHRESTHA, S.; McCULLOCH, C..A.; KISHEN, A. Bioactive Chitosan nanoparticles and photodynamic therapy inhibit collagen degradation *in vitro*. **Journal of Endodontics**, v.40, n.5, p.703-9, 2014.

PETERS, L. B.; WESSELINK, P. R. Periapical healing of endodontically treated teeth in one and two visits obturated in the presence or absence of detectable microorganisms. **International Endodontic Journal**, v.35, n.8, p.660-7, 2002.

PLOTINO, G.; CORTESE, T.; GRANDE, N.M; LEONARDI, D.P.; DI GIORGIO, G.; TESTARELLI, L.; GAMBARINI, G. New technologies to improve root canal disinfection. **Brazilian Dental Journal**, v.27, n.1, p.3-8, 2016.

RAAFAT, D.; SAHL, H.G. Chitosan and its antimicrobial potencial – a critical literature survey. **Microbial Biotechnology**, v.2, n.2, p.186-201, 2009.

RABEA, E. I.; BADAWY, M. E.; STEVENS, C. V.; SMAGGHE, G.; STEURBAUT, W. Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of action. **Biomacromolecules**, v.4, n.6, p.1457-65, 2003.

RIVERA, E. M., YAMAUCHI, M. Site comparisons of dentin collagen crosslinks from extracted human teeth. **Archives of Oral Biology**, v.38, n.7, p.541-546, 1993.

ROSSI-FEDELE, G.; DE FIGUEIREDO, J. A. Use of a bottle warmer to increase 4% sodium hypochlorite tissue dissolution ability on bovine pulp. **Australian Endodontic Journal**, v.34, n.1, p.39-42, 2008.

SAITO, K.; WEBB, T. D.; IMAMURA, G. M.; GOODELL, G. G. Effect of shortened irrigation times with 17%ethylene diamine tetra-acetic acid on smear layer removal after rotatory canal instrumentation. **Journal of Endodontics**, v.34, n.8, p.1011-4, 2008.

SALEH, I. M.; RUYTER, I. E.; HAAPASALO, M.; ØRSTAVIK, D. The effects of dentine pretreatment on the adhesion of root-canal sealers. **International Endodontic Journal**, v. 35, n.10, p. 859-66, 2002.

SAYIN, T. C.; SERPER, A.; CEHRELI, Z. C.; OTLU, H. G. The effect of EDTA, EGTA, EDTAC, and tetracycline-HCl with and without subsequent NaOCl treatment on the microhardness of root canal dentin. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v.104, n.3, p.418-24, 2007.

SCHILDER, H. Filling root canals in three dimensions. **Journal of Endodontics**, v.11, n.5, p.723-744, 1967.

SHRESTHA, A.; ZHILONG, S.; GEE, N. K.; KISHEN, A. Nanoparticulates for antibiofilm treatment and effect of aging on its antibacterial activity. **Journal of Endodontics**, v.36, n.6, p.1030-5, 2010.

SHRESTHA, A.; FRIEDMAN, S.; KISHEN, A. Photodynamically crosslinked and chitosan-incorporated dentin collagen. **Journal of Dental Research**, v.90, n.11, p.1346-51, 2011.

SHI, Z.; NEOH, K. G.; KANG, E. T.; WANG, W. Antibacterial and mechanical properties of bone cement impregnated with chitosan nanoparticles. **Biomaterials**, v.27, n.11, p.2440-2449, 2006.

SILVA, P. V.; GUEDES, D. F. C.; PÉCORA, J. D.; CRUZ-FILHO, A. M. Time-Dependent effects of chitosan on dentin structures. **Brazilian Dental Journal**, v. 23, n. 4, p. 357-361, 2012.

SILVA, P. V.; GUEDES, D. F.; NAKADI, F. V.; PÉCORA, J. D.; CRUZ-FILHO, A. M. Chitosan: a new solution for removal of smear layer after root canal instrumentation. **International Endodontic Journal**, v.46, n.4, p.332-8, 2013.

SLUTZKY- GOLDBERG, I.; MAREE, M.; LIBERMAN, R.; HELING, I. Effect of sodium hypochlorite on dentin microhardness. **Journal of Endodontics**, v.30, n.12, p.880-2, 2004.

SOUSA, S. M.; SILVA, T. L. Demineralization effect of EDTA, EGTA, CDTA and citric acid on root dentin: a comparative study. **Brazilian Oral Research**, v.19, n.3, p.188-92, 2005.

SPANÓ, J. C.; BARBIN, E. L.; SANTOS, T. C.; GUIMARÃES, L. F.; PÉCORA, J. D. Solvent action of sodium hypochlorite on bovine pulp and physico-chemical properties of resulting liquid. **Brazilian Dental Journal**, v.12, n.3, p.154-7, 2001.

SPANÓ, J. C. E.; SILVA, R. G.; GUEDES, D. F. C.; SOUSA-NETO, M. D.; ESTRELA, C.; PÉCORA, J. D. Atomic absorption spectrometry and scanning electron microscopy evaluation of concentration of calcium ions and smear layer removal with root canal chelators. **Journal of Endodontics**, v.35, n.5, p.727-730, 2009.

TABRIZIZADEH, M.; SHAREGHI, A. The effect of preparation size on efficacy of smear layer removal; A scanning electron microscopic study. **Iranian Endodontic Journal**, v.10, n.3, p.169-73, 2015.

TARTARI, T.; DUARTE JUNIOR, A. P.; SILVA JUNIOR, J. O.; KLATAU, E. B.; SILVA E SOUZA JUNIOR, M. H.; SILVA E SOUZA JUNIOR, P. A. Etidronate from medicine to endodontics: effects of different irrigant regimes on root dentin roughness. **Journal of applied Oral Science**, v.21, n.5, p.409-5, 2013.

TAVARIA, F. K.; COSTA, E. M.; PINA-VAZ, I.; CARVALHO, M. F.; PINTADO, M. M. Chitosan as a dental biomaterial: state of the art. **Brazilian Journal of Bbiomedical Engineering**, v.29, n.1, p.110-120, 2013.

TAVAREL, M. N.; DOMARD, A. Relation between the physicochemical characteristics of collagen and its interactions with chitosan: I. **Biomaterials**, v.14, n.12, p.930-938, 1993.

TAY, F. R.; PASHLEY, D. H.; LOUSHINE, R. J.; WELLER, R. N.; MONTICELLI, F.; OSORIO, R. Self-etching adhesives increase collagenolytic activity in radicular dentin. **Journal of endodontics**, v.32, n.9, p.862-8, 2006.

TAY, F. R.; GUTMANN, J. L.; PASHLEY, D. H. Microporous demineralized collagen matrices in intact radicular dentin created by commonly used calcium-depleting endodontic irrigants. **Journal of Endodontics**, v.33, n.9, p.1086-90, 2007.

TEIXEIRA, C. S.; FELIPPE, C. S.; FELIPPE, W. T. The effect of application time of EDTA and NaOCl on intracanal smear layer removal: an SEM analysis. **International Endodontic Journal**, v.38, n.5, p.285-290, 2005.

TJÄDERHANE, L., CARRILHO, M.R., BRESCHI, L., TAY, F.R., PASHLEY, D.H.. Dentin basic structure and composition-an overview. **Endodontic Topics**, v.20, n.1, p.3-29, 2012.

TORABINEJAD, M.; KHADEMI, A.A.; BABAGOLI, J.; CHO, Y.; JOHNSON, W.B.; BOZHILOV, K.; KIM, J.; SHABAHANG, S. Anew solution for the removal of the smear layer. **Journal of Endodontics**, v.29, n.3, p.170-5, 2003.

TSUDA, H.; RUBEN, J.; ARENDS, J. Raman spectra of human dentin mineral. **European Journal of Oral Sciences**, v.104, n.2, p.123-31, 1996.

TUNCER, A. K.; TUNCER, S. Effect of Different Final Irrigation Solutions on Dentinal Tubule Penetration Depth and Percentage of Root Canal Sealer. **Journal of Endodontics**, v. 38, p. 860–863, 2012.

USMAN, N.;BAUMGARTNER, J.C.; MARSHALL, J.G. Influence of instrument size on root canal debridement. **Journal of endodontics**, v.30, n.2, p.110-2, 2004.

VAN DER SLUIS, L. W.; SHEMESH, H.; WU, M. K.; WESSELINK, P. R. An evaluation of the influence of passive ultrasonic irrigation on the seal of root canal fillings. **International Endodontic Journal**, v. 40, n. 5, p. 356-361, 2007.

VAN DER VYVES, P.J.; BOTHA, F.S.; DE WET, F.A. Antimicrobial efficacy of nine different root canal irrigation solutions. **Journal of the South African Dental Association**, v.69, n.4, p.158-60, 2014.

VASSILIADIS, L.P.; SKLAVOUNOS, S. A.; STAVRIANOS, C. K. Depth of penetration and appearance of Grossman sealer in the dentinal tubules: an in vivo study. **Journal of Endodontics**, v.20, p.373–6, 1994.

VERKAIK, M. J.; BUSSCHER, H. J.; JAGER, D.; SLOMP, A. M.; ABBAS, F.; VAN DER MEI, H. C. Efficacy of natural antimicrobials in toothpaste formulations against oral biofilms in vitro. **Journal of Dentistry**, v.39, n.3, p.218-24, 2011.

VIOLANTE, T.L.; HAASE, E.M.; VICKERMAN, M.M. Collagen-binding streptococcal surface proteins influence the susceptibility of biofilm cells to endodontic antimicrobial solutions. **Journal of Endodontic**, v.39, n.3, p.370-4, 2013.

VIRE, D.E. Failure of endodontically treated teeth: Classification and evaluation. **Journal of endodontics**, v.17, n.7, p.338-342, 1991.

WANG, X.H.; LI, D.P.; WANG, W.J.; FENG, Q.L.; CUI, F.Z.; XU, Y.X.; SONG, X.H.; VAN DER WERF, M. Crosslinked collagen/chitosan matrix for artificial livers. **Biomaterials**, v.24, n.19, p.3213-20, 2003.

WU, M-K.; DUMMER, P. M. H.; WESSELINK, P. R. Consequences of and strategies to deal with residual post-treatment root canal infection. **Internacional Endodontic Journal**, v.39, n.35, p.343–356, 2006.

ZHANG, K.; KIM, Y. K.; CADENARO, M.; BRYAN, T.E.; SIDOW, S.J.; LOUSHINE, R.J.; LING, J.Q.; PASHLEY, D.H.; TAY, F.R. Effects of different exposure times and concentrations of sodium hypochlorite/ethylenediaminetetraacetic acid on the structural integrity of mineralized dentin. **Journal of Endodontics**, v.36, n.1, p.105-9, 2010.

ZEHNDER, M. Root canal irrigants. **Journal of endodontics**, v.32, n.5, p.389-398, 2006.

Apêndices

Apêndice 1. Valores originais, médias e desvio padrão (cm^{-1}) do conteúdo inorgânico, nos terços cervical, médio e apical dos fragmentos de dentina radicular, submetidos aos diferentes tratamentos e tempos utilizados.

Solução irrigadora	Tempos												$\bar{x}t \pm DP \text{ total}$
	T0			T1			T2			T3			
	Cervical	Médio	Apical	Cervical	Médio	Apical	Cervical	Médio	Apical	Cervical	Médio	Apical	
H+E+H	0,018	0,018	0,017	0,021	0,019	0,028	0,018	0,019	0,022	0,016	0,018	0,022	
	0,018	0,022	0,023	0,017	0,021	0,021	0,016	0,018	0,020	0,015	0,016	0,019	
	0,025	0,023	0,027	0,026	0,023	0,023	0,026	0,025	0,028	0,023	0,019	0,024	
	0,020	0,022	0,023	0,021	0,022	0,021	0,027	0,022	0,021	0,026	0,019	0,019	
	0,017	0,022	0,023	0,015	0,020	0,022	0,018	0,021	0,021	0,015	0,017	0,015	
$\bar{x}t \pm DP$	0,020±0,003	0,021±0,002	0,023±0,003	0,020±0,004	0,021±0,002	0,023±0,003	0,021±0,005	0,021±0,003	0,022±0,003	0,019±0,005	0,018±0,001	0,020±0,004	0,021±0,001
H+Q+H	0,019	0,022	0,024	0,017	0,020	0,025	0,016	0,022	0,022	0,016	0,020	0,021	
	0,019	0,020	0,018	0,017	0,019	0,018	0,015	0,016	0,015	0,015	0,010	0,016	
	0,018	0,020	0,018	0,017	0,018	0,022	0,015	0,018	0,019	0,014	0,016	0,017	
	0,020	0,019	0,019	0,019	0,016	0,017	0,016	0,016	0,017	0,016	0,015	0,016	
	0,020	0,023	0,023	0,018	0,017	0,024	0,016	0,017	0,025	0,017	0,015	0,024	
$\bar{x}t \pm DP$	0,019±0,001	0,021±0,002	0,020±0,003	0,017±0,001	0,018±0,001	0,021±0,004	0,016±0,0004	0,018±0,003	0,020±0,004	0,016±0,001	0,015±0,003	0,019±0,003	0,018±0,003
Q+Q+Q	0,018	0,024	0,020	0,015	0,018	0,020	0,014	0,020	0,020	0,015	0,021	0,021	
	0,023	0,021	0,022	0,014	0,019	0,019	0,014	0,013	0,022	0,012	0,019	0,020	
	0,022	0,022	0,018	0,017	0,019	0,017	0,016	0,017	0,017	0,016	0,017	0,016	
	0,019	0,016	0,020	0,014	0,015	0,021	0,015	0,014	0,017	0,014	0,014	0,022	
	0,016	0,021	0,017	0,015	0,017	0,014	0,014	0,015	0,017	0,014	0,018	0,016	
$\bar{x}t \pm DP$	0,019±0,003	0,021±0,003	0,019±0,002	0,015±0,001	0,017±0,002	0,018±0,003	0,014±0,001	0,016±0,003	0,019±0,002	0,014±0,002	0,018±0,002	0,019±0,003	0,017±0,003
Q+E+Q	0,017	0,023	0,018	0,015	0,005	0,016	0,037	0,035	0,020	0,024	0,000	0,023	
	0,019	0,020	0,018	0,014	0,013	0,015	0,031	0,017	0,021	0,019	0,015	0,029	
	0,019	0,020	0,017	0,014	0,017	0,014	0,035	0,018	0,012	0,026	0,018	0,011	
	0,018	0,021	0,022	0,017	0,017	0,020	0,020	0,025	0,024	0,012	0,022	0,025	
	0,017	0,020	0,018	0,015	0,018	0,018	0,020	0,018	0,019	0,016	0,016	0,021	
$\bar{x}t \pm DP$	0,018±0,001	0,021±0,002	0,019±0,002	0,015±0,001	0,014±0,005	0,017±0,003	0,029±0,008	0,023±0,008	0,019±0,005	0,019±0,006	0,014±0,008	0,022±0,006	0,019±0,006
$\bar{x} \pm DP \text{ total}$	0,012±0,002	0,014±0,002	0,013±0,002	0,010±0,002	0,012±0,001	0,012±0,002	0,018±0,001	0,016±0,001	0,014±0,002	0,013±0,001	0,013±0,001	0,016±0,002	

H = hipoclorito de sódio 1 %; E = Edta a 17 %; Q = Quitosana 0,2%; T0 = Inicial; T1 = Após instrumentação; T2 = Após irrigação com a segunda solução; T3 = após lavagem com a primeira solução utilizada.

Apêndice 2. Valores originais, médias e desvio padrão (cm^{-1}) do conteúdo orgânico, nos terços cervical, médio e apical dos fragmentos de dentina radicular, submetidos aos diferentes tratamentos e tempos utilizados.

Solução irrigadora	Tempos												$\bar{x}t \pm DP \text{ total}$
	T0			T1			T2			T3			
	Cervical	Médio	Apical	Cervical	Médio	Apical	Cervical	Médio	Apical	Cervical	Médio	Apical	
H+E+H	0,011	0,012	0,018	0,008	0,006	0,011	0,041	0,033	0,027	0,015	0,009	0,014	
	0,012	0,030	0,012	0,008	0,013	0,007	0,039	0,038	0,039	0,012	0,020	0,013	
	0,018	0,015	0,017	0,010	0,008	0,006	0,043	0,039	0,035	0,019	0,012	0,013	
	0,009	0,012	0,020	0,008	0,009	0,010	0,042	0,031	0,054	0,015	0,015	0,023	
	0,012	0,011	0,015	0,006	0,008	0,012	0,165	0,045	0,059	0,022	0,014	0,024	
$\bar{x}t \pm DP$	0,012±0,003	0,016±0,008	0,016±0,003	0,008±0,002	0,009±0,002	0,009±0,002	0,066±0,055	0,037±0,005	0,043±0,013	0,017±0,004	0,014±0,004	0,017±0,005	0,022±0,023
H+Q+H	0,009	0,013	0,011	0,006	0,008	0,008	0,046	0,026	0,018	0,008	0,011	0,007	
	0,010	0,010	0,020	0,006	0,007	0,010	0,016	0,024	0,046	0,006	0,011	0,018	
	0,013	0,011	0,013	0,007	0,008	0,010	0,038	0,025	0,025	0,012	0,007	0,005	
	0,012	0,011	0,010	0,008	0,006	0,005	0,027	0,023	0,015	0,010	0,007	0,003	
	0,013	0,011	0,010	0,009	0,004	0,007	0,053	0,021	0,026	0,014	0,003	0,009	
$\bar{x}t \pm DP$	0,011±0,002	0,011±0,001	0,013±0,004	0,007±0,001	0,006±0,002	0,008±0,002	0,036±0,015	0,024±0,002	0,026±0,012	0,010±0,003	0,008±0,003	0,008±0,006	0,014±0,011
Q+Q+Q	0,009	0,014	0,012	0,037	0,053	0,069	0,054	0,095	0,117	0,063	0,083	0,182	
	0,010	0,016	0,014	0,036	0,050	0,092	0,041	0,117	0,177	0,045	0,097	0,199	
	0,010	0,008	0,010	0,023	0,021	0,082	0,042	0,039	0,119	0,047	0,064	0,186	
	0,010	0,008	0,016	0,036	0,024	0,069	0,043	0,038	0,081	0,057	0,049	0,151	
	0,009	0,011	0,016	0,027	0,041	0,037	0,053	0,092	0,047	0,051	0,121	0,092	
$\bar{x}t \pm DP$	0,010±0,001	0,011±0,003	0,013±0,003	0,032±0,006	0,038±0,014	0,070±0,021	0,047±0,006	0,076±0,036	0,108±0,049	0,053±0,007	0,083±0,028	0,162±0,043	0,059±0,049
Q+E+Q	0,013	0,014	0,011	0,061	0,046	0,049	0,808	0,295	0,185	1,659	0,152	0,237	
	0,009	0,009	0,010	0,049	0,036	0,053	0,692	0,103	0,309	0,329	0,145	0,409	
	0,012	0,009	0,012	0,089	0,030	0,041	1,044	0,095	0,371	0,591	0,178	1,145	
	0,010	0,010	0,011	0,030	0,034	0,039	0,153	0,106	0,078	0,192	0,171	0,111	
	0,009	0,010	0,015	0,040	0,032	0,059	0,356	0,081	0,118	0,198	0,113	0,294	
$\bar{x}t \pm DP$	0,011±0,002	0,011±0,002	0,012±0,002	0,054±0,023	0,036±0,006	0,048±0,009	0,611±0,462	0,136±0,089	0,212±0,125	0,594±0,617	0,152±0,026	0,439±0,409	0,193±0,227
$\bar{x} \pm DP \text{ total}$	0,011±0,001	0,012±0,003	0,014±0,002	0,025±0,022	0,022±0,017	0,034±0,031	0,190±0,281	0,068±0,050	0,097±0,084	0,169±0,284	0,064±0,068	0,157±0,201	0,072±0,066

H = hipoclorito de sódio 1 %; E = Edta a 17 %; Q = Quitosana 0,2%; T0 = Inicial; T1 = Após instrumentação; T2 = Após irrigação com a segunda solução; T3 = após lavagem com a primeira solução utilizada.

Anexo 1. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO/ FORP/ USP
--

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Efeito da Quitosana como solução irrigadora sobre as paredes dos canais radiculares mediante diferentes métodos de avaliação.

Pesquisador: Vanessa Lessa Cavalcanti de Araújo

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 39629314.0.0000.5419

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.164.187

Data da Relatoria: 29/07/2015

Apresentação do Projeto:

Relatório parcial. A pesquisadora solicita alteração de título para: Efeito da Quitosana como solução irrigadora sobre as paredes dos canais radiculares mediante diferentes métodos de avaliação, justificando que é para mudança na escrita para melhor elucidação do tema. Também justifica que uma parte das análises do projeto que seriam executadas no exterior não ocorrerá mais por falta de apoio financeiro, descreve quais análises e de que forma as mesmas serão feitas.

Objetivo da Pesquisa:

Os mesmos descritos inicialmente. Estudo in vitro- dentes.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Estudo in vitro- dentes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Apresentação do relatório parcial. Solicita alteração de título e modificação de metodologia - ambos justificados.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados.

Recomendações:

Aprovado.

Endereço: Avenida do Café s/nº	CEP: 14.040-904
Bairro: Monte Alegre	
UF: SP	Município: RIBEIRÃO PRETO
Telefone: (16)3315-0493	Fax: (16)3315-4102
	E-mail: cep@forp.usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO
PRETO/ FORP/ USP

Continuação do Parecer: 1.154.157

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Conforme deliberado na 182ª Sessão Ordinária do CEP, realizada em 29/07/2015.

RIBEIRÃO PRETO, 30 de Julho de 2015.

Assinado por:

Simone Cecílio Hallak Regalo
(Coordenador)

Endereço: Avenida do Café s/nº

Bairro: Monte Alegre

CEP: 14.040-904

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3315-0493

Fax: (16)3315-4102

E-mail: cep@forp.usp.br