

SAMILLA DOS SANTOS GONÇALVES MONTEIRO

Analysis of intratubular decontamination after chemical-mechanical preparation by different adjuvant strategies and different irrigating cannulas in mixed biofilm

Análise da descontaminação intratubular após preparo químico-mecânico por diferentes estratégias adjuvantes e diferentes cânulas irrigadoras em biofilme misto

Tese constituída por artigo apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração em Endodontia.

Orientador: Profa. Dra. Flaviana Bombarda de Andrade

“Versão Corrigida”

BAURU
2022

Dos Santos Gonçalves Monteiro, Samilla
Análise da descontaminação intratubular após
preparo químico-mecânico por diferentes estratégias adjuvantes
e diferentes cânulas irrigadoras em biofilme misto/ Samilla dos
Santos Gonçalves Monteiro -- Bauru, 2022.
79 p. : il. ; 31 cm.

Tese (doutorado) -- Faculdade de Odontologia de
Bauru, Universidade de São Paulo, 2022

Orientador: Profa. Dra. Flaviana Bombarda de
Andrade

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

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

Comitê de Ética da FOB-USP

Protocolo nº: 4.536.271

Data: 11 de fevereiro de 2021

FOLHA DE APROVAÇÃO

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru
Assistência Técnica Acadêmica
Serviço de Pós-Graduação



FOLHA DE APROVAÇÃO

Tese apresentada e defendida por
SAMILLA DOS SANTOS GONÇALVES MONTEIRO
e aprovada pela Comissão Julgadora
em 10 de fevereiro de 2023.

Prof. Dr. **KLEBER KILDARE TEODORO DE CARVALHO**

Prof. Dr. **GEORGE TÁCCIO DE MIRANDA CANDEIRO**
UNICHRISTUS

Prof. Dr. **MARCO ANTONIO HUNGARO DUARTE**
FOB-USP

Prof.^a Dr.^a **FLAVIANA BOMBARDA DE ANDRADE**
Presidente da Banca
FOB - USP


Prof. Dr. Marco Antonio Hungaro Duarte
Presidente da Comissão de Pós-Graduação
FOB-USP

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese de doutorado a Deus, aquele que me sustenta e me guia a cada dia, pois sem sua providência não teria chegado a lugar nenhum.

AGRADECIMENTOS

À professora Flaviana Bombarda de Andrade, por toda delicadeza e paciência com que me orientou ao longo desses quatro anos. A senhora é, sem dúvida, um exemplo, para mim, de pessoa, professora e pesquisadora. Sua personalidade forte, generosa e gentil me ensinou muito mais do que apenas as bancadas de laboratórios, aulas e reuniões que tivemos.

Ao meu querido e maravilhoso esposo Círio, por sempre estar ao meu lado, me dando todo apoio e suporte necessário para realizar meus sonhos, os quais também se tornaram seus sonhos. Foram muitos dias ausentes e viagens constantes em que pude contar com você para administrar todo cotidiano de nossa casa e nossos filhos. Não tenho palavras para agradecer todo seu amor, paciência e dedicação a nós. Te amo demais.

Aos meus pais Bazilio e Mazé, por me ensinarem desde sempre a importância do estudo e por abdicarem de si mesmos por mim e meus irmãos.

A minha irmã Samara, por estar sempre a disposição, seja para resolver dificuldades, cuidar das crianças ou apenas me ouvir.

Aos meus colegas de doutorado Maricel, Mirela e Feliz, pois sem vocês esse título não seria possível. Foram vocês que possibilitaram cada experimento e me acolheram de forma tão especial.

À Mirela, por ser tão amiga e parceira, por cada contaminação intratubular, por seu sorriso constante e mensagens de otimismo a cada necessidade de repetir o experimento. Você, Mirela, tem um lugar muito especial em meu coração.

À Marcia Graeff, técnica do Microscópio confocal e varredura laser, pois sem ela não teríamos essas imagens lindas, e também por sua gentileza e dedicação em cada experimento.

Ao professor George Miranda por todo apoio ao longo da minha jornada, desde a graduação até o doutorado. Obrigada por sempre me encorajar, apoiar e acreditar em mim.

A Faculdade de Odontologia de Bauru que me recebeu e foi essencial no meu processo de formação profissional, pela dedicação, e por tudo o que aprendi ao longo dos anos do curso.

A todos que participaram, direta ou indiretamente do desenvolvimento deste trabalho de pesquisa, enriquecendo o meu processo de aprendizado. Às pessoas com quem convivi ao longo desses anos de curso, que me incentivaram e que certamente tiveram impacto na minha formação acadêmica.

“A persistência é o menor caminho do êxito”.

(Charles Chaplin)

RESUMO

A irrigação desempenha papel fundamental para desinfecção de regiões não alcançadas pelos instrumentos endodônticos. Objetivou-se avaliar a descontaminação intratubular *ex vivo* através de terapia fotodinâmica (aPDT), agitação da solução irrigadora com Easy Clean (EC), XP Endo Finisher (XP) e irrigação ultrassônica passiva (PUI), utilizados após o preparo mecânico dos canais radiculares sobre biofilme misto; e avaliar a descontaminação intratubular *ex vivo* através de diferentes agulhas de irrigação durante preparo químico-mecânico dos canais radiculares sobre biofilme multiespécie. Para avaliar as terapias coadjuvantes, sessenta e seis raízes de dentes unirradiculares padronizadas foram contaminadas com *E. faecalis* e *C. albicans* por 7 dias, com protocolo de centrifugação para colonização dos túbulos dentinários. As raízes foram instrumentadas e submetidas a cinco protocolos de irrigação com água destilada esterilizada: 1) irrigação convencional (IC), 2) IC + aplicação de aPDT, 3) agitação por PUI, 4) agitação por EC 25.04 e 5) agitação por XP. Após estes protocolos, as raízes foram seccionadas longitudinalmente, coradas com o kit Life&Dead e visualizadas através de microscopia confocal de varredura a laser (MCVL), obtendo-se imagens das porções cervicais e apicais. As bactérias vivas e mortas foram coradas em verde e vermelho, respectivamente, e quantificadas. Após análise estatística comparativa ($P < 0,05$), observou-se que a PUI e o XP promoveram maior morte bacteriana, sendo estatisticamente similares entre si. EC, aPDT e IC foram similares ao grupo controle positivo, sendo menos efetivas. Para avaliar a descontaminação das cânulas irrigadoras, quarenta e quatro raízes de dentes unirradiculares padronizadas foram contaminadas com *E. faecalis*, *C. albicans* e *S. mutans* por 7 dias, com protocolo de centrifugação para colonização dos túbulos dentinários. As raízes foram instrumentadas e submetidas a irrigação com água destilada esterilizada por 4 agulhas diferentes: extremidade aberta, extremidade aberta com abertura lateral, extremidade fechada com uma abertura lateral e com duas aberturas laterais. Foram realizadas coletas microbiológicas do interior do canal principal antes e após a instrumentação e após a irrigação final para contabilização de Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL). Após estes protocolos, as raízes foram seccionadas longitudinalmente, coradas e visualizadas através de MCVL, obtendo-se imagens das porções cervicais e apicais. As bactérias vivas e mortas foram coradas em verde e

vermelho, respectivamente, e quantificadas. Após análise estatística comparativa ($P < 0,05$), observou-se que houve diferença entre a coleta inicial e as coletas após instrumentação e irrigação final. O pior desempenho antimicrobiano foi da agulha de extremidade fechada com única saída lateral, seguido pela extremidade aberta e ventilação lateral. A agulha de saída frontal teve performance intermediária e a agulha que gerou melhor descontaminação intratubular foi a de extremidade fechada com duas saídas laterais. Em conclusão, a descontaminação intratubular de biofilme misto foi mais bem realizada pelo instrumento/dispositivo XP- Endo Finisher e pela cânula de extremidade fechada com duas saídas laterais.

Palavras-chave: Irrigação Endodôntica; Terapia Fotodinâmica; Biofilmes

ABSTRACT

Analysis of intratubular decontamination after chemical-mechanical preparation by different adjuvant strategies and different irrigating cannulas in mixed biofilm

Irrigation plays a fundamental role in the disinfection of regions not reached by endodontic instruments. The objective was to evaluate ex vivo intratubular decontamination through photodynamic therapy (aPDT), agitation of the irrigating solution with Easy Clean (EC), XP Endo Finisher (XP), and passive ultrasonic irrigation (PUI) used after mechanical preparation of root canals on mixed biofilm; and to evaluate ex vivo intratubular decontamination through different irrigation needles during chemical-mechanical preparation of root canals on multispecies biofilm. To evaluate the adjuvant therapies, sixty-six roots of standardized single-rooted teeth were contaminated with *E. faecalis* and *C. albicans* for 7 days, with a centrifugation protocol for colonization of the dentinal tubules. The roots were instrumented and submitted to five irrigation protocols with sterilized distilled water: 1) conventional irrigation (CI), 2) IC + application of aPDT, 3) agitation by PUI, 4) agitation by EC 25.04, and 5) agitation by XP. After these protocols, the roots were sectioned longitudinally, stained with the Life&Dead kit and visualized through confocal laser scanning microscopy (CLSM), obtaining images of the cervical and apical portions. Live and dead bacteria were stained green and red, respectively, and quantified. After comparative statistical analysis ($P < 0.05$), it was observed that PUI and XP promoted greater bacterial death, being statistically similar to each other. EC, aPDT and IC were similar to the positive control group, being less effective. To evaluate the decontamination of irrigating cannulas, forty-four roots of standardized single-rooted teeth were contaminated with *E. faecalis*, *C. albicans* and *S. mutans* for 7 days, with a centrifugation protocol for colonization of dentinal tubules. The roots were instrumented and submitted to irrigation with sterilized distilled water through 4 different needles: open end, open end with lateral opening, closed end with one lateral opening and with two lateral openings. Microbiological samples were taken from inside the main canal before and after instrumentation and after final irrigation to count Colony Forming Units (CFU/mL). After these protocols, the roots were longitudinally sectioned, stained, and visualized through CLSM, obtaining images of the cervical and apical

portions. Live and dead bacteria were stained green and red, respectively, and quantified. After comparative statistical analysis ($P < 0.05$), it was observed that there was a difference between the initial collection and the collections after instrumentation and final irrigation. The worst antimicrobial performance was for the closed-end needle with a single side exit, followed by the half-round needle. The frontal exit needle had an intermediate performance, and the needle that generated the best intratubular decontamination was the closed end with two lateral exits. In conclusion, intratubular decontamination of mixed biofilm was best performed by the XP-Endo Finisher instrument/device and by the closed-end cannula with two side outlets.

Keywords: Endodontic Irrigation; Photodynamic Therapy; Biofilms

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Graph of media and standard deviation of percentage of bacterial viability. Comparison of conventional irrigation, PUI, XP-Endo, EasyClean, aPDT, and Positive Control (C+) groups	28
Figura 2 -	Viability images obtained in CLSM after processing for each test group	29
Figura 1 -	Gráficos de valores médios de viabilidade bacteriana de <i>S. mutans</i> para cada cânula de irrigação utilizada	40
Figura 2 -	Gráficos de valores médios de viabilidade bacteriana de <i>C. albicans</i> para cada cânula de irrigação utilizada	40
Figura 3 -	Gráficos de valores médios de viabilidade bacteriana de <i>E. faecalis</i> para cada cânula de irrigação utilizada	40
Figura 4 -	Gráficos de valores médios de colônias bacterianas comparando os quatro grupos de cânulas na coleta pós-irrigação final	40
Figura 5 -	Imagens MCVL representativas da área total dos túbulos dentinários	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Mean and standard deviation of percentage showing microbial viability of the tested groups.	28
--	----

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

%	Porcentagem
AAA	Abscessos Apicais Agudos
ABS	Acrilonitrila Butadieno Estireno
AM	Azul de Metileno
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Brain Heart Infusion
CFU	Colony Forming Units
CLSM	Confocal Laser Scanning Microscope
CT	Comprimento de trabalho
EC	Easy Clean
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EI	Endocardite Infecciosa
G	Gauge
IC	Irrigação Convencional
LPS	Lipopolissacarídeos
LTA	Ácido Lipoteicóico
MCVL	Microscópio Confocal de Varredura Laser
Micro-CT	Microtomografia Computadorizada
mL	Mililitros
mm	Milímetros
NaCl	Cloreto de Sódio
NaOCl	Hipoclorito de Sódio
P	Significância
PAA	Periodontite Apical Assintomática
aPDT	Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana
PIPS	Transmissão fotoacústica induzida por fótons
PQM	Preparo Químico-mecânico
PUI	Irrigação Ultrassônica Passiva
ROS	Radicais de Oxigênio
s	Segundos
SAF	Self-Adjusting Files

UFC	Unidades Formadoras de Colônias
XPF	XP Endo Finisher

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	ARTIGOS	22
2.1	ARTIGO 1	22
2.2	ARTIGO 2	34
3	DICUSSÃO AMPLIADA E FUNDAMENTADA	46
4	CONCLUSÃO	57
	REFERÊNCIAS	57

1. INTRODUÇÃO

Um dos principais objetivos do tratamento endodôntico é a eliminação dos microrganismos presentes no sistema de canais radiculares. No entanto, apesar de todos os esforços, ainda nos deparamos com o insucesso na endodontia. A falha do tratamento endodôntico pode estar relacionada com vários fatores, como a complexidade anatômica dos canais radiculares e a persistência bacteriana(1). Por isso, todos os esforços durante o preparo químico mecânico (PQM) devem ser realizados, para eliminar a quantidade máxima de bactérias dos canais radiculares, antes da obturação (1).

Com o tempo, o desbridamento e a desinfecção do sistema de canais radiculares foram considerados, principalmente, uma função dos instrumentos, enquanto menos atenção foi dada aos irrigantes (2). No entanto, evidências acumuladas gradualmente revelaram que os instrumentos são incapazes de atingir grande parte do sistema de canais radiculares (3). Como resultado, a importância percebida pela irrigação cresceu consideravelmente nas últimas décadas e isso acabou levando a uma mudança de paradigma. Atualmente, a instrumentação é amplamente considerada um meio de favorecer o acesso dos irrigantes ao terço apical, para reforçar a limpeza e desinfecção das diversas áreas do sistema de canais radiculares (4,5).

Um objetivo importante da instrumentação mecânica e irrigação na terapia endodôntica é a eliminação de microrganismos e de tecido pulpar infectado(6). Devido à complexidade anatômica do espaço pulpar, alguns tecidos orgânicos e bactérias são frequentemente deixados dentro dos sistemas de canais radiculares após a instrumentação. A irrigação é complementar à instrumentação para facilitar a remoção de bactérias, detritos e a camada de esfregaço (7,8). A eficácia da irrigação depende tanto da ação de descarga mecânica quanto da capacidade dos irrigantes de dissolver o tecido e matar as bactérias (9). Uma série de estudos têm sido feitos examinando os fatores físicos que influenciam o grau de penetração do irrigante e sua eficácia, incluindo a forma e o tamanho do canal, o volume e a pressão do irrigante, o tipo, o tamanho e a profundidade de inserção da agulha de irrigação(7,10–12). A dinâmica da irrigação desempenha um papel importante(5) na eficácia da mesma, dependendo do (s) mecanismo (s) de funcionamento do irrigante e da capacidade de colocar o irrigante em contato com os microrganismos e restos de dentina presentes no canal radicular(13).

Apesar de haver várias pesquisas avaliando a dinâmica de fluidos no interior do canal radicular, existem poucos estudos avaliando a efetividade das diferentes cânulas de irrigação na desinfecção dos túbulos dentinários.

Recentemente, tem havido um interesse significativo em biofilmes e seu papel no prognóstico endodôntico(14). O biofilme é uma comunidade estruturada de bactérias aderidas à superfície do canal radicular, encerradas em uma matriz polimérica protetora. Além disso, foi observado que fragmentos de biofilme podem se desprender, derivar e se reconectar a qualquer superfície dentro do sistema de canais radiculares, incluindo os túbulos dentinários(14). Microrganismos em um biofilme multiespécies trabalham juntos para compartilhar nutrientes e regular seus números gerais, expressão gênica de virulência e características fenotípicas por mecanismos de *quorum sensing* (15).

Biofilmes microbianos multiespécies em áreas remotas do sistema de canais radiculares são a principal causa de infecções persistentes, por isso são claramente o principal alvo para remoção por irrigação(16,17). *Enterococcus faecalis* e *Candida spp.* frequentemente estão associadas a falhas no tratamento endodôntico (18–21). Esses microrganismos podem penetrar facilmente nos túbulos dentinários dos canais radiculares (22).

E. faecalis é muito estudado na endodontia por causa de sua alta prevalência em quadros de periodontite apical persistente(23). Além disso, este microrganismo possui mecanismos intrínsecos de resistência a vários agentes antimicrobianos e resistência adicional também pode ser conferida pela aquisição de determinantes genéticos por transferência horizontal (24).

A incidência de *Candida spp.* na cavidade oral humana tem sido relatada como sendo mais de 30% em adultos saudáveis e até 95% em pacientes imunocomprometidos(25,26). Os fungos podem ser detectados em 7 a 18% dos canais radiculares infectados, sendo *C. albicans* a espécie mais comum encontrada (26). A capacidade de *C. albicans* aderir fortemente à dentina, formando tubos germinativos, hifas e matriz extracelular espessa, contribui para o aumento da resistência contra a resposta do sistema imunológico e, portanto, pode contribuir para a patogênese das doenças perirradiculares e para agentes químicos como azóis, anfotericina B, hidróxido de cálcio, hipoclorito de sódio, peróxido de hidrogênio e até radicais de oxigênio (ROS) (26–28).

A detecção de *Streptococcus mutans* nos sítios orais tem sido objeto de interesse, não apenas devido ao seu papel primário no aparecimento da cárie, mas também devido à sua associação com infecções extraorais, como a endocardite infecciosa (EI) (29,30). A virulência de *S. mutans* como um patógeno dentário reside principalmente em sua capacidade de: (i) aderir e formar biofilmes nas superfícies dos dentes, (ii) produzir grandes quantidades de ácidos orgânicos a partir de uma ampla gama de carboidratos e (iii) tolerar condições ambientais adversas, como baixo pH e tensões oxidativas(31).

Recentemente, Nomura et al.(32) relatou que *S. mutans* estavam presentes na polpa inflamada (pulpite) em alta frequência (50%). Lima et al.(33) também observaram que 60% das amostras de dentes com periodontite apical e 70% dos dentes com abscesso apicais agudos foram positivas para *S. mutans*.

As complexidades anatômicas do sistema de canal radicular e a existência de microrganismos como estruturas de biofilme aderentes à superfície são os principais desafios na desinfecção do canal radicular(4,34). Uma maneira de contornar tais desafios é combinar irrigantes adequados com uma técnica de irrigação ideal para atingir a redução máxima desses biofilmes.

A irrigação com seringa continua sendo o método mais comumente usado entre dentistas gerais e endodontistas(3,35,36). O irrigante é fornecido por uma seringa e uma agulha é inserida próximo ao comprimento de trabalho (CT) e, finalmente, flui em direção ao forame apical do canal radicular, onde geralmente é evacuado por uma ponta de sucção (37). Certas cânulas podem ser selecionadas para dispensar irrigante através de sua extremidade mais distal, enquanto outras cânulas fornecem irrigante através de um sistema de entrega de porta lateral e extremidade fechada.

Apesar de seu amplo uso, a irrigação com seringas parece incapaz de limpar e desinfetar áreas além do canal radicular principal (38,39). Portanto, modalidades adjuvantes aos procedimentos químico-mecânicos na terapia endodôntica, como medicamentos endodônticos e terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT), tem sido avaliadas (40).

Inicialmente recomendada para combater células tumorais (41), a aPDT, atualmente, tem sido proposta como adjuvante ao tratamento endodôntico, uma vez que estudos mostraram descontaminação microbiana adicional quando o aPDT é usada após a preparação químico-mecânica (42–46). Essa estratégia envolve a combinação de um fotossensibilizador não tóxico (FS) e luz de baixa intensidade

para matar um amplo espectro de microrganismos. A maioria dos tratamentos de aPDT combinam comprimentos de onda de luz vermelha visível com a cor azul de agentes fotossensibilizantes, como azul de metileno (AM) e azul de toluidina, ftalocianina, porfirina, xanteno, monoterpene. No entanto, estudos utilizando novos agentes fotossensibilizantes permitiram o uso de fontes de luz em diferentes comprimentos de onda. Os corantes vermelhos como eritrosina (47), bengala (48) e curcumina (49–51) são interessantes para aPDT em odontologia, pois permitem o uso de uma fonte de luz azul, como a luz de LED azul, recurso comumente presente em consultórios clínicos. A morte dos microrganismos ocorre pela formação local de espécies reativas de oxigênio, como oxigênio singlete e radical hidroxila, entre outros (52,53). A aPDT, comumente, tem um efeito de morte variável contra diferentes microrganismos, sendo menos efetiva contra fungos, seguido de bactérias Gram-negativas e mais efetiva contra bactérias Gram-positivas (53,54). Outra vantagem dessa técnica é ser minimamente invasiva, não induzir resistência e ser reproduzível (46)

Algumas outras estratégias têm sido propostas para aumentar a efetividade da desinfecção durante o preparo químico-mecânico dos canais radiculares. Entre elas, tem se destacado a agitação das soluções irrigadoras, seja ela realizada com instrumentos em movimento rotatório ou reciprocante no interior dos canais radiculares ou com o uso de insertos ultrassônicos.

O uso de dispositivos ultrassônicos durante a irrigação tem sido proposto para confrontar os problemas observados durante a limpeza e desinfecção do sistema de canais radiculares(44,55) e os resultados são significativos na redução de bactérias sobreviventes (56). A irrigação ultrassônica passiva (PUI) parece melhorar esses resultados (57), devido a um fluxo acústico no canal radicular (56). Essa técnica facilita a penetração do irrigante, a dissolução do tecido pulpar e a remoção da *smear layer*, se mostrando melhor do que a técnica convencional de irrigação com agulha (58).

Um outro instrumento apontado para agitação de irrigantes, o XP-endo *Finisher* (XPF; FKG Dentaire SA, La Chaux-de-Fonds, Suíça), foi recentemente introduzido como uma abordagem adjunta para melhorar a eficácia da irrigação em endodontia. O XPF é um instrumento de tamanho #25.00 e produzido usando um tipo especial de liga, o NiTi MaxWire (Martensite-Austenite Electropolish-FleX, FKG). Segundo o fabricante, o instrumento é reto em sua fase M, quando é resfriado, e

muda para a fase A quando é exposto à temperatura corporal, onde terá sua forma de curva única, com um comprimento de 10mm a partir da ponta e uma profundidade de 1,5 mm por causa de sua memória molecular (59). Sugere-se ser usado a 800 rpm com soluções irrigantes após preparação do canal radicular até o tamanho # 25 ou maior. Alguns estudos mostram que esse instrumento é eficaz para remover biofilme de regiões de difícil acesso dos canais radiculares(59–61), sobretudo quando utilizado em três ciclos de 20 segundos cada (59)

Entretanto, é importante salientar que este instrumento foi desenvolvido para possibilitar um efeito chicote sobre as irregularidades da superfície dos canais radiculares e assim remover o biofilme em áreas de difícil acesso. Segundo o fabricante, o instrumento XPF é capaz de tratar canais com morfologias complexas. Ademais, quando a lima entra em contato com a dentina, irá limpá-la sem alterar o formato original do canal. Tudo isso graças a capacidade de ampliar seu alcance em 6mm. Portanto, promove respeito a morfologia do canal, preservação da dentina, eliminação de detritos e remoção da medicação intracanal no tratamento em várias visitas ou do material de obturação residual em caso de retratamento(62).

Adotando os mesmos princípios de otimizar a ação de agentes químicos e usando instrumentos não afetados pelo contato com paredes do canal, pelo espaço em que operam ou pela dispersão de forças no interior do canal, um instrumento de plástico de acrilonitrila butadieno estireno (ABS) chamado Easy Clean (EC) foi desenvolvido (Easy Equipamentos Odontológicos, Belo Horizonte, Brasil). O instrumento tem um tamanho de 25.04, uma secção transversal em forma de hélice e opera com um movimento recíproco (63) ou rotatório. Este instrumento se mostrou eficaz na remoção da *smear layer* da região apical assim como em istmos, embora ainda tenham poucos estudos sobre (63,64)

Assim, torna-se necessária a avaliação antimicrobiana intratubular dos dispositivos adjuvantes ao PQM, além da aPDT e das diferentes cânulas existentes no mercado, com o intuito de otimizar a maior descontaminação possível do sistema de canais radiculares, levando os tratamentos endodônticos a uma maior taxa de sucesso.

2. ARTIGOS

2.1.ARTIGO 1

The impact of mechanical instrumentation and physical means and aPDT on root canal decontamination

Samilla Santos Gonçalves Monteiro, MSc, Maricel Rosario Cardenas Cuellar, MSc, Marcia Sirlene Zardin Graeff, PhD^a, Clovis Monteiro Bramante, PhD^a, George T Candeiro, PhD^b, Flaviana Bombarda de Andrade, PhD^a

^aDepartment of Restorative Dentistry, Endodontics, and Dental Materials, Bauru School of Dentistry, University of São Paulo, Bauru, São Paulo, Brazil.

^b Department of Dentistry, University Christus, Fortaleza, Ceará, Brazil.

Corresponding Author:

Flaviana Bombarda de Andrade

Department of Restorative Dentistry, Endodontics and Dental Materials, Bauru School of Dentistry, University of São Paulo. Al Dr. Octávio Pinheiro Brisola nº. 9-75, 17012-901, Bauru, São Paulo, Brazil. Phone number: +55 14 3235-8000. E-mail

Address: flaviana@fob.usp.br

Abstract

Aiming to enhance root canal decontamination, several protocols supporting mechanical chemical preparation have been proposed. The objective was to evaluate ex vivo intratubular decontamination through photodynamic therapy (aPDT), agitation of the irrigating solution with Easy Clean (EC), XP Endo Finisher (XP), and passive ultrasonic irrigation (PUI) used after mechanical preparation of root canals on mixed biofilm. Sixty-six standardized single-rooted tooth roots were contaminated with *E. faecalis* and *C. albicans* for 7 days with a centrifugation protocol for colonization of dentinal tubules. The roots were instrumented and submitted to five adjuvant protocols: 1) conventional irrigation (CI) with distilled water, 2) IC + aPDT application, 3) PUI, 4) irrigation with agitation by EC 25.04 and 5) irrigation with agitation by XP. After these protocols, the roots were sectioned longitudinally, stained with Life&Dead dye, and visualized through confocal laser scanning microscopy (CLSM), obtaining images of the cervical and apical regions. Live and dead bacteria were stained in green and red respectively and quantified. After statistical analysis by the Kruskal-Wallis test followed by Dunn ($P < 0.05$), it was observed that PUI and XP promoted greater bacterial death, being statistically similar to each other. EC, aPDT, and IC were similar to the positive control group, being less effective. Intratubular decontamination of mixed biofilm was best performed by XP-Endo Finisher physical instruments/devices.

INTRODUCTION

One of the main goals of endodontic treatment is the elimination of microorganisms present in the root canal system. However, despite all efforts, we are still faced with failure in some cases in endodontics. Endodontic treatment failure may be related to several factors, such as the anatomical complexity of the root canals and microbial persistence (1). Therefore, every effort during the mechanical chemical preparation must be made to eliminate the maximum number of microorganisms from the root canals before filling them (1).

Although mechanical preparation of the root canal system is more effective in reducing the number of bacteria, instrumentation alone is often not sufficient to carry out adequate disinfection (2).

Previous studies observed that intratubular contamination may contribute with unsuccess in endodontic treatment(65). Some bacteria, mainly Gram-positive, may colonize dentinal tubules and keep able for a long time after obturation of root canals (14,16,23). Lipoteichoic acid (LTA) is one of virulence factor of Gram-positive bacteria that may result in an apical inflammatory response and allows the colonization of dentinal tubules. *Enterococcus faecalis* is one of the most resistant bacteria into dentinal tubules and its synergy with *Candida albicans* have been studied (66,67)

Several devices have been recommended to optimize the root canal disinfection to complement the conventional mechanical preparation and irrigation using needle and syringe. Antimicrobial photodynamic therapy (aPDT), agitation of the irrigating solution with Easy Clean (EC), passive ultrasonic irrigation (PUI) and XP-Endo Finisher (XP) are examples of these devices and present suitable results for in vitro, ex vivo and in vivo studies z(13,56–58,61,64,68–74).

Calcium hydroxide medication is not able to eliminate bacteria into dentinal tubules and the use of a complementary device can maximize it. However, limited studies have observed the efficacy of complement devices to disinfect dentinal tubules.

The objective of the present ex vivo research was to evaluate intratubular decontamination by antimicrobial photodynamic therapy (aPDT), conventional irrigation and agitation of the irrigating solution with Easy Clean (EC), XP-Endo Finisher (XP) and passive ultrasonic irrigation (PUI), used after root canal preparation. The null hypothesis is that these complementary devices have no influence to disinfect dentinal tubules.

MATERIAL AND METHODS

Specimen preparation

Sixty-six unirradicular human teeth freshly extracted (with a single canal, closed Apex, without caries and calcification of the canal, confirmed by radiography) were selected based on dimensional and morphological similarities and stored in 1% sodium hypochlorite for 48 hours for initial decontamination and were subsequently immersed in distilled water. The crowns were cross-cut with a carborundum disc and the length of the specimens was standardized to 15 ± 0.5 mm. Specimens were instrumented in the root canal total length to file #25.01 (Prodesign Logic file, Easy Equipamentos Odontológicos, Belo Horizonte, Brazil).

Then, specimens were submitted to three ultrasonic baths of 10 min each one with 1% sodium hypochlorite, 17% EDTA, and saline to neutralize the anterior substances. The specimens received a double layer of red nail polish (L'Oréal Colorama, Rio de Janeiro, RJ, Brazil) externally to promote posterior contamination only by the main root canal. The specimens were sterilized by autoclave (Cristofoli, Campo Mourão, PR, Brazil) for 20 min at 121°C.

Dentin contamination

Isolated colonies of *E. faecalis* (ATCC 29212) and *C. albicans* (ATCC 10231) were used to create the inocula in BHI suspension after successive cultures. The cell suspension was spectrophotometrically (Bel Photonics, Osasco, SP, Brazil) measured according to the turbidity of the McFarland scale and adjusted to 3×10^8 CFU/mL for *E. faecalis* and 7×10^6 CFU/mL for *C. albicans*. The microbial growth curve was established previously and *C. albicans* was allowed to proliferate some hours before *E. faecalis* in this inocula.

The protocol proposed by Andrade et al. (2015) (75) was followed to infect the dentin. Under a hood, the specimens were individually inserted into microtubes with 1 mL of sterilized BHI solution and transferred to an ultrasonic bath for 15 min to allow the culture medium to penetrate the dentinal tubules. The BHI inoculum was added into the microtubes by a pipette (Nichipet EX, Nichiryo, Tokyo, Kanto, Japan) and the centrifugation protocol was performed. The BHI solution was changed after 24h, and the centrifugation protocol was repeated after 48h. All specimens were contaminated for 5 days and the effectiveness of the contamination protocol was confirmed by the observation at the CLSM, by means of positive control specimens.

Protocol of desinfection

Instrumentation was performed with the reciprocating system using the crown-down technique and following the manufacturer's instructions until the 25/.08 instrument was at working length. Before and after the instrumentation, the irrigating solution was renewed. The specimens were submitted to the additional intracanal disinfection protocol described below according to the group assigned:

Conventional Irrigation: the specimens were subjected to final irrigation with 6ml of distilled water

aPDT: After the endodontic procedure, the canal was irrigated with 0.5 mL of the photosensitizer and left inside the root canal for 2 minutes as pre-irradiation time. The root canal was then irradiated for 240 seconds (total energy, 9.6 J), with a disposable 200mm diameter fiber-coupled diode laser (MMOptics, Sao Paulo, Brazil). The laser delivered 660 nm light at a total power of 40 mW out of the fiber. The fiber was placed in the apical portion of the root canal at a point where resistance to the fiber was just felt (usually 1 mm from the apex), and spiral movements, from apical to cervical, were manually performed to ensure even diffusion of the light inside the canal lumen. The specimes were subjected to final irrigation with 6 mL of distilled water to remove the photosensitizer (42).

PUI: After the endodontic procedure, the canal was irrigated with 0.5 mL of the distilled water (NaviTip® - 29 G, Ultradent, South Jordan, UT, EUA). The solution was agitated in the canals for 1 min by means of an endodontic ultrasonic soft file 20.01 E1-Irrisonic (Helse Indústria e Comércio Ltda, Santa Rosa de Viterbo, SP, Brasil) that was mounted on an ultrasonic unit Piezon Master PM200 - EMS (EMS, São Bernardo do Campo-SP, Brazil). Passive ultrasonic activation of the irrigant was repeated 3 times, for 20 seconds each.

EasyClean: After the endodontic procedure, the canal was irrigated with 0.5 mL of the distilled water that was activated using the EasyClean tip (Easy Equipamentos Odontológicos, Belo Horizonte, MG, Brazil). This instrument has a size 25.04 taper and was coupled to an electric motor VDW Silver Reciproc® (VDW, Munique, Germany) in reciprocating motion. The activation of the irrigant was repeated 3 times, for 20 seconds each, completing one minute, as the anterior group.

XP-endo: XPF was placed in a contra-angle handpiece (Dentsply Tulsa Dental, Tulsa, OK, USA), inserted into the canal, and then activated (800 rpm and 1-Ncm torque) for 20 seconds and gentle 7- to 8-mm lengthwise vertical movements to contact

the full length of the canal as suggested by the manufacturer with distilled water inside the root canal. This cycle was repeated 3 times.

CLSM analysis

Ten teeth of each group were used in the CLSM analysis. Longitudinal sections of the specimens were created with a diamond disc and saline sterilized solution in an Isomet machine (Isomet, Buehler, IL, EUA) to obtain two halves. Next, 17% EDTA was utilized for 5 min to remove the cut smear layer and then washed in saline solution. The halves of the dentinal tubes were stained with 30 μ L of Live and Dead® dye for 10 min.

The samples were examined on an inverted Leica TCS-SPE confocal microscope (Leica Microsystems GmbH, Mannheim, Baden-Württemberg, Germany) using a 40X magnification oil lens. The pictures were obtained by using about 23 sections of 1 μ m step size in a format of 1024x1024 pixels. Four images were taken of the cervical and apical portions of each specimen half. For each portion, the images were taken in the most superficial region near the canal and in the greater dentinal depth. Images were acquired using the Leica Application Suite-Advanced Fluorescence software (LAS AF, Leica Mannheim, Baden-Württemberg, Germany). The evaluation of bacterial viability was made with the bioImageL TM v21 software for the bacterial count (green/live and red/dead).

RESULTS

After statistical analysis by the ANOVA test followed by Tukey ($P < 0.05$) it was observed that PUI and XP promoted greater bacterial death, being statistically similar to each other. The EC, aPDT and IC were similar to the positive control group, being less effective (Table 1, Figure 1). The cervical and apical areas, as well as superficial and deep areas were also compared and the results among the groups of treatment were the same (data not shown) of the total comparison, without separate the areas. The images obtained in CLSM and after processing, for each test group, are shown in Figure 2.

Table 1. Mean and standard deviation of percentage showing microbial viability of the tested groups

	Conventional Irrigation	PUI	XP Endo	Easy Clean	aPDT	C+
media	54,50 ^{BC}	40,02 ^B	21,28 ^A	58,25 ^C	59,19 ^C	73,54 ^C
Standard deviation	9,937	14,03	8,844	6,55	23,41	10,31

Different capital letters indicate significant statistical differences.

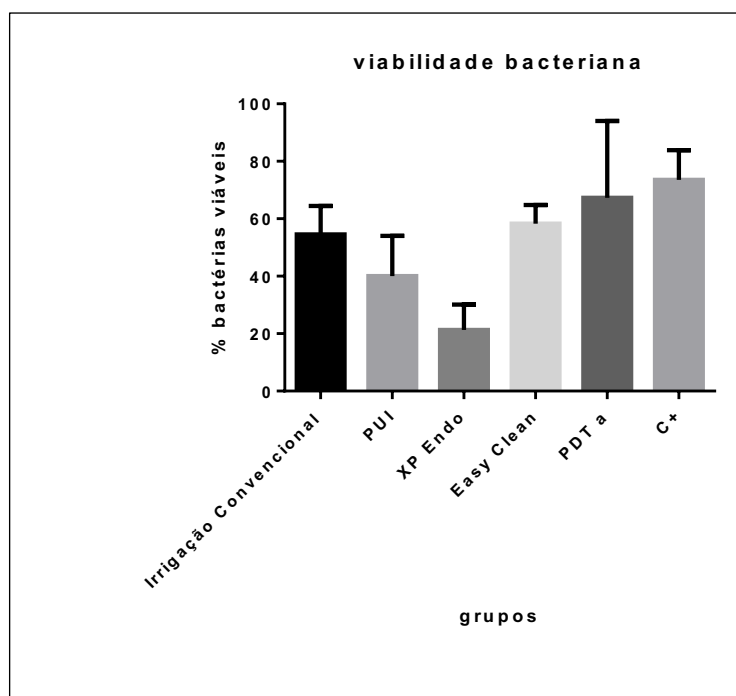


Figure 1. Graph of media and standard deviation of percentage of bacterial viability. Comparison of conventional irrigation, PUI, XP-Endo, EasyClean, aPDT and Positive Control (C+) groups. Different capital letters indicate significant statistical differences.

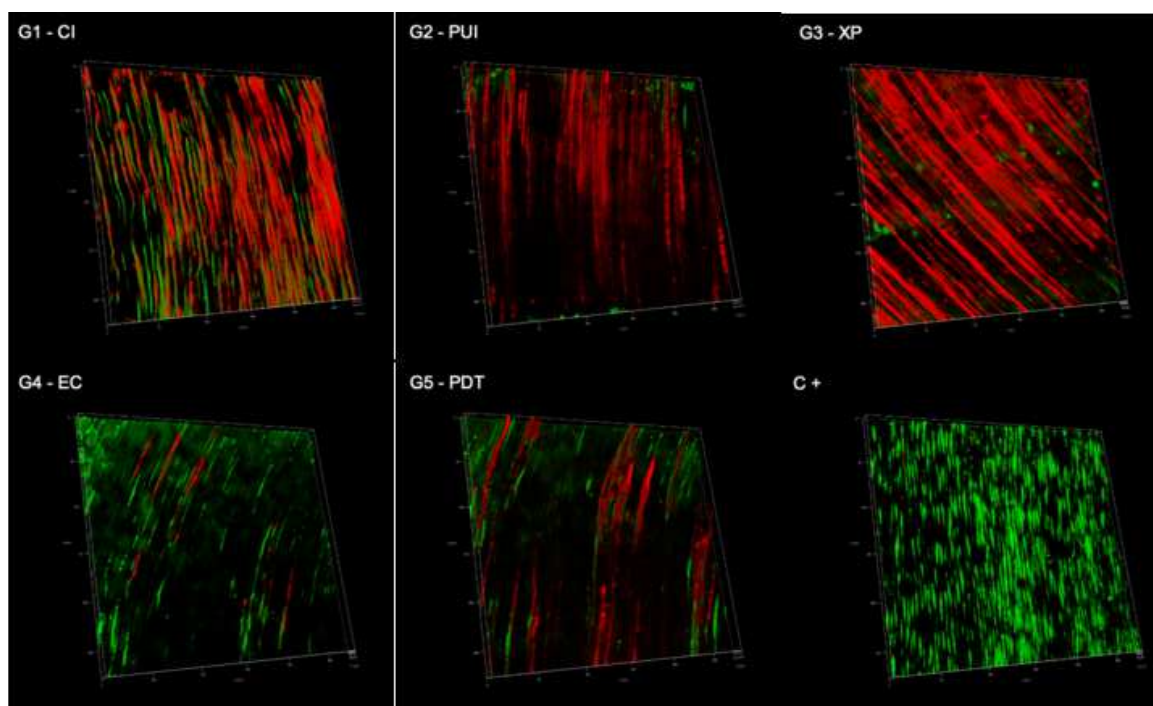


Figure 2. Viability images obtained in CLSM after processing for each test group. Green staining indicates viable bacteria while red staining expressed dead bacteria. G1 (Group 1): image of a tooth treated with convencional irrigation; G2: image a tooth treated; G3: tooth treated with XP-endo finisher; G: tooth treated with Easy Clean; G5: tooth treated with the Photodynamic Therapy; C+: positive control tooth.

DISCUSSION

This study compared 5 different irrigation protocols and their abilities to eliminate microorganisms in the root canal space, as well as their ability to penetrate the dentinal tubules to kill these microorganisms. This study presents the confocal laser microscope (CLSM) and specific imaging programs as an analysis method to calculate the percentage of viable bacteria in the dentinal tubules. The data reflect the efficiency levels of the different irrigation protocols tested to kill the microorganisms that deeply colonized the dentinal tubules. According to these results, the null hypothesis was partially accepted.

E. faecalis and *C. albicans* were chosen for this study because they were isolated from the root canal system in cases of failure (1,19,20). Furthermore, these microorganisms can penetrate the dentinal tubules (21) and form biofilms, which are more resistant to canal disinfection (22).

The root canal was standardized to be straight or with a curvature of less than 20° and a 30 G needle was used for irrigation. This increases needle depth compared to severely curved roots (23), improving the irrigation effect (24,25). The present study

used distilled water as an irrigating solution in order to evaluate the disinfectant action promoted by the supporting strategies without interference from the irrigating solution.

It can be considered that a limitation of our work was the use of distilled water as an irrigant, since it does not have antimicrobial properties. It should be noted, however, that in some clinical conditions the use of irrigating solutions commonly used in endodontics, such as sodium hypochlorite or chlorhexidine, represents a risk due to their cytotoxic potential(26–29). Situations such as incomplete rhizogenesis, or perforating resorptions, or even in cases of accidents and complications such as perforations.

As in other studies (12,24,30,31), the XP-Endo Finisher, used as an adjuvant in the final irrigation, proved to be effective in biofilm removal and disinfection when compared with conventional irrigation, Easy Clean and aPDT. For Tufenkçi (32) there was no statistically significant difference in bacterial reduction when using the XP-Endo finisher. It is possible that this difference in the result in relation to the present study is related to the method of analysis, given that this study used the counting of colony forming units while we evaluated the viability of microorganisms through CLSM.

PUI is more effective than conventional irrigation in cleaning the root canal system (33,34,17). This type of irrigation has the potential to remove remnants of dentin and organic tissue from areas inaccessible to instrumentation (29) and has been shown to be superior to the various techniques of agitation of irrigating solutions in some studies (35). We observed that both PUI and XPF performed better than the other tested groups, which may be associated with the fact that these two instruments are metallic. In addition, according to the manufacturer XPF has the ability to extend its reach by 6mm. Therefore, it promotes respect for canal morphology, preservation of dentin, elimination of debris and removal of intracanal medication in multi-visit treatment or residual filling material in case of retreatment (36).

Some studies show a greater effectiveness of the Easy Clean instrument in removing debris (37). However, the objective of the present study was to evaluate the disinfection promoted by the different supporting strategies and it was possible to observe that the viability of microorganisms in the canals treated with Easy Clean was statistically similar to conventional irrigation, to the positive control group and to aPDT. Fernandes et al analyzed the effectiveness of three irrigation systems: EndoActivator, passive ultrasonic irrigation (PUI) and Easy Clean in reducing *Enterococcus faecalis* through microbiological collection and culture method. The control group had a

significantly higher amount of CFU/mL after the chemical-mechanical preparation than the other groups, which were similar to each other ($p > 0.05$) (33).

Several studies (38-41) demonstrate greater disinfection of the root canal system when using aPDT. In none of these studies, however, the level of disinfection achieved is compared to irrigation strategies that involve agitation of the irrigating solution. It should be noted that the method of analysis used in these studies used microbiological collections of root canals followed by counting of CFU's. This method only allows us to verify the bacterial viability inside the main canal, while through CLSM and the intratubular infection protocol it is possible to verify the level of disinfection of the dentinal tubules. In our study, as in some previous studies (42,43), no statistically significant difference was observed between conventional irrigation and the use of aPDT.

The intratubular decontamination of mixed biofilm was best performed by physical instruments/devices XP-Endo Finisher.

REFERENCES

1. Siqueira JF Jr, Rôças IN. **Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures.** *J Endod.* 2008; **34**: 1291-1301.e3.
2. Lin J, Shen Y, Haapasalo M. **A comparative study of biofilm removal with hand, rotary nickel-titanium, and self-adjusting file instrumentation using a novel in vitro biofilm model.** *J Endod.* 2013; **39**: 658-63.
3. Fimple JL, Fontana CR, Foschi F, et al. **Photodynamic treatment of endodontic polymicrobial infection in vitro.** *J Endod.* 2008; **34**: 728-34.
4. Garcez AS, Fregnani ER, Rodriguez HM, et al. **The use of optical fiber in endodontic photodynamic therapy. Is it really relevant?** *Lasers Med Sci.* 2013; **28**: 79-85.
5. Garcez AS, Arantes-Neto JG, Sellera DP, et al. **Effects of antimicrobial photodynamic therapy and surgical endodontic treatment on the bacterial load reduction and periapical lesion healing. Three years follow up.** *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2015; **12**: 575-80.
6. Boutsoukis C, Kastrinakis E, Lambrianidis T, et al. **Formation and removal of apical vapor lock during syringe irrigation: a combined experimental and Computational Fluid Dynamics approach.** *Int Endod J.* 2014; **47**: 191-201.

7. van der Sluis LW, Versluis M, Wu MK, et al. **Passive ultrasonic irrigation of the root canal: a review of the literature.** *Int Endod J.* 2007; **40**: 415-26.
8. Alves FR, Marceliano-Alves MF, Sousa JC, et al. **Removal of Root Canal Fillings in Curved Canals Using Either Reciprocating Single- or Rotary Multi-instrument Systems and a Supplementary Step with the XP-Endo Finisher.** *J Endod.* 2016; **42**: 1114-9.
9. Kato AS, Cunha RS, da Silveira Bueno CE, et al. **Investigation of the Efficacy of Passive Ultrasonic Irrigation Versus Irrigation with Reciprocating Activation: An Environmental Scanning Electron Microscopic Study.** *J Endod.* 2016; **42**: 659-63.
10. Spoleti P, Siragusa M, Spoleti MJ. **Bacteriological evaluation of passive ultrasonic activation.** *J Endod.* 2003; **29**: 12-4.
11. Castelo-Baz P, Martín-Biedma B, Cantatore G, et al. **In vitro comparison of passive and continuous ultrasonic irrigation in simulated lateral canals of extracted teeth.** *J Endod.* 2012; **38**: 688-91.
12. Haapasalo M, Wang Z, Shen Y, et al. **Tissue dissolution by a novel multisonic ultracleaning system and sodium hypochlorite.** *J Endod.* 2014; **40**: 1178-81.
13. Bao P, Shen Y, Lin J, et al. **In Vitro Efficacy of XP-endo Finisher with 2 Different Protocols on Biofilm Removal from Apical Root Canals.** *J Endod.* 2017; **43**: 321-325.
14. Pedrinha VF, Cardenas Cuellar MR, Velásquez-Espedilla EG, et al. **Impact of irrigation protocols with some chelators and mechanical agitation on intratubular decontamination.** *Braz Oral Res.* 2021; **35**: e127.
15. Simezo AP, da Silveira Bueno CE, Cunha RS, et al. **Comparative Analysis of Dentinal Erosion after Passive Ultrasonic Irrigation versus Irrigation with Reciprocating Activation: An Environmental Scanning Electron Study.** *J Endod.* 2017; **43**: 141-146.
16. Duque JA, Duarte MA, Canali LC, et al. **Comparative Effectiveness of New Mechanical Irrigant Agitating Devices for Debris Removal from the Canal and Isthmus of Mesial Roots of Mandibular Molars.** *J Endod.* 2017; **43**: 326-331.
17. Andrade FB, Arias MP, Maliza AG, et al. **A new improved protocol for in vitro intratubular dentinal bacterial contamination for antimicrobial endodontic**

tests: standardization and validation by confocal laser scanning microscopy. *J Appl Oral Sci.* 2015; **23**: 591-8.

18. Vasconcelos LRSM, Midená RZ, Minotti PG, et al. **Effect of ultrasound streaming on the disinfection of flattened root canals prepared by rotary and reciprocating systems.** *J Appl Oral Sci.* 2017; **25**: 477-482.

19. Cunha Neto MAD, Coêlho JA, Pinto KP, Cuellar MRC, Marcucci MC, Silva EJNL, Andrade FB, Sassone LM. **Antibacterial Efficacy of Triple Antibiotic Medication with Macrogol (3Mix-MP), Traditional Triple Antibiotic Paste, Calcium Hydroxide, and Ethanol Extract of Propolis: An Intratubular Dentin Ex Vivo Confocal Laser Scanning Microscopic Study.** *J Endod.* 2021; **47**: 1609-1616.

20. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, et al. **Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment.** *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1998 ;**85**: 86-93.

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

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

23. Tay FR, Gu LS, Schoeffel GJ, et al. **Effect of vapor lock on root canal debridement by using a side-vented needle for positive-pressure irrigant delivery.** *J Endod.* 2010; **36**: 745-50.

24. Silva EJNL, Belladonna FG, Zuolo AS, et al. **Effectiveness of XP-endo Finisher and XP-endo Finisher R in removing root filling remnants: a micro-CT study.** *Int Endod J.* 2018; **51**: 86-91.

25. Azim AA, Aksel H, Zhuang T, et al. **Efficacy of 4 Irrigation Protocols in Killing Bacteria Colonized in Dentinal Tubules Examined by a Novel Confocal Laser Scanning Microscope Analysis.** *J Endod.* 2016; **42**: 928-34.

26. Mohammadi Z. Sodium hypochlorite in endodontics: an update review. *Int Dent J.* 2008;58(6).

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

28. Jose J, Palanivelu A, Subbaiyan H. Cytotoxicity evaluation of calcium hypochlorite and other commonly used root canal irrigants against human gingival fibroblast cells: An in vitro evaluation. *Dent Med Probl.* 2021;58(1).

29. Lee TH, Hu CC, Lee SS, Chou MY, Chang YC. Cytotoxicity of chlorhexidine on human osteoblastic cells is related to intracellular glutathione levels. *Int Endod J*. 2010;43(5).
30. Tüfenkçi P, Yılmaz K. **The Effects of Different Endodontic Access Cavity Design and Using XP-endo Finisher on the Reduction of Enterococcus faecalis in the Root Canal System.** *J Endod*. 2020; **46**: 419-424.
31. Schmidt TF, Teixeira CS, Felipe MC, et al. **Effect of Ultrasonic Activation of Irrigants on Smear Layer Removal.** *J Endod*. 2015; **41**: 1359-63.
32. Silva EJNL, Carvalho CR, Belladonna FG, et al. **Micro-CT evaluation of different final irrigation protocols on the removal of hard-tissue debris from isthmus-containing mesial root of mandibular molars.** *Clin Oral Investig*. 2019; **23**: 681-687.
33. Fernandes KGC, Silva BBD, Boer NC, et al. **The Effectiveness of Three Irrigation Systems in the Enterococcus faecalis Reduction after Instrumentation with a Reciprocating Instrument.** *Eur J Dent*. 2020; **14**: 539-543.
34. Hoedke D, Enseleit C, Gruner D, et al. **Effect of photodynamic therapy in combination with various irrigation protocols on an endodontic multispecies biofilm ex vivo.** *Int Endod J*. 2018; **51**: e23-e34.
35. Ng R, Singh F, Papamanou DA, et al. **Endodontic photodynamic therapy ex vivo.** *J Endod*. 2011; **37**: 217-22.
36. Siddiqui SH, Awan KH, Javed F. **Bactericidal efficacy of photodynamic therapy against Enterococcus faecalis in infected root canals: a systematic literature review.** *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2013; **10**: 632-43.
37. Souza LC, Brito PR, de Oliveira JC, et al. **Photodynamic therapy with two different photosensitizers as a supplement to instrumentation/irrigation procedures in promoting intracanal reduction of Enterococcus faecalis.** *J Endod*. 2010; **36**: 292-6.

2.2. ARTIGO 2

Descontaminação intratubular de biofilme multiespécie após o preparo químico-mecânico com diferentes agulhas de irrigação

Monteiro, S. S. G.¹, Barros, M.C. ¹, Pedrinha, V.F. ¹, Andrade, F.B.¹

¹Departamento de Dentística, Endodontia e Materiais Odontológicos da Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo (FOB-USP)

RESUMO

A irrigação desempenha papel fundamental para desinfecção de regiões não alcançadas pelos instrumentos endodônticos. Objetivou-se avaliar a descontaminação intratubular e na luz do canal *ex vivo* através de diferentes agulhas de irrigação durante preparo químico-mecânico dos canais radiculares sobre biofilme multiespécie. Quarenta e quatro raízes de dentes unirradiculares padronizadas foram contaminadas com *E. faecalis*, *C. albicans* e *S. mutans* por 7 dias com protocolo de centrifugação para colonização dos túbulos dentinários. As raízes foram instrumentadas e submetidas a irrigação com água destilada esterilizada por 4 agulhas diferentes: extremidade aberta, extremidade aberta com abertura lateral, extremidade fechada com uma abertura lateral e extremidade fechada com duas aberturas laterais. Foram realizadas coletas microbiológicas antes e após a instrumentação e após a irrigação final para contabilização de Unidades Formadoras de Colônias (CFU/mL). Após estes protocolos as raízes foram seccionadas longitudinalmente, coradas pelo kit Life&Dead e visualizadas através de microscopia confocal de varredura a laser (CLSM), obtendo-se imagens das porções cervical e apical. As bactérias vivas e mortas foram coradas em verde e vermelho respectivamente e quantificadas. Após análise estatística comparativa pelos testes ANOVA seguido de Tukey e Kruskal-Wallis seguido de Dunn ($P < 0,05$), observou-se que houve diferença entre a coleta inicial e as coletas após instrumentação e irrigação final. O pior desempenho antimicrobiano foi da agulha de extremidade fechada com única saída lateral, seguido pela extremidade aberta e ventilação lateral. A agulha de saída frontal teve performance intermediária e a agulha que gerou melhor descontaminação intratubular foi a de extremidade fechada com duas saídas laterais. Em conclusão, a descontaminação intratubular de biofilme misto foi melhor realizada pela cânula de extremidade fechada com duas saídas laterais.

INTRODUÇÃO

Um objetivo importante da instrumentação mecânica e irrigação na terapia endodôntica é a eliminação de microrganismos e tecido pulpar infectado(6). Porém,

devido à complexidade anatômica do espaço pulpar, alguns tecidos orgânicos e bactérias são frequentemente deixados dentro dos sistemas de canais radiculares após a instrumentação. Biofilmes microbianos multiespécies em áreas remotas do sistema de canais radiculares são a principal causa de infecções persistentes, por isso são claramente o principal alvo para remoção por irrigação (16). O importante papel da irrigação do canal radicular é, portanto, remover o biofilme bacteriano residual inacessível nas superfícies não instrumentadas, remover detritos e a camada de esfregaço (7,8).

A eficácia da irrigação depende tanto do turbilhão quanto da capacidade dos irrigantes de dissolver o tecido e matar as bactérias (9). Existem uma série de estudos examinando os fatores físicos que influenciam o grau de penetração do irrigante e sua eficácia, incluindo a forma e o tamanho do canal, o volume e a pressão do irrigante, o tipo, o tamanho e a profundidade de inserção da agulha de irrigação (7,10–12). A dinâmica da irrigação desempenha um papel importante (5) na eficácia da irrigação, dependendo do mecanismo de funcionamento do irrigante e da capacidade de colocar o irrigante em contato com os microrganismos e restos de dentina presentes no canal radicular (13). Uma melhor compreensão das interações entre esses fatores pode levar a uma maior eficácia da irrigação do canal radicular durante a terapia endodôntica.

A irrigação convencional com seringas continua sendo o método mais comumente usado entre dentistas gerais e endodontistas (35,36); o irrigante é fornecido por uma seringa e uma agulha inserida próximo ao comprimento de trabalho e, finalmente, flui em direção ao forame apical do canal radicular, onde geralmente é evacuado por uma ponta de sucção (37). Esse método tem sido defendido como um método eficiente de aplicação de irrigante (76). Existem no mercado diferentes agulhas que podem variar em calibre e no design da ponta, podendo apresentar extremidade aberta, com ou sem saída lateral e extremidade fechada, com 1 ou várias saídas laterais. Alguns autores pesquisaram sobre a dinâmica de fluídos no interior dos canais ao utilizar diferentes cânulas de irrigação, ou ainda a capacidade de remoção de debris (77) alcançada com a utilização delas, porém pouco se sabe sobre a efetividade em remover o biofilme intratubular. O objetivo do presente estudo foi avaliar a desinfecção de diferentes cânulas irrigadoras sobre biofilme multiespécies intratubular e da luz do canal.

MATERIAIS E MÉTODOS

Preparação da Amostra

Quarenta e quatro dentes humanos unirradiculares recém-extraídos (com canal único, ápice fechado, sem cárie e calcificação do canal, confirmada por radiografia) foram selecionados com base em semelhanças dimensionais e morfológicas e armazenados em hipoclorito de sódio 1% por 48 horas para descontaminação inicial, e posteriormente imersos em água destilada. As coroas foram cortadas transversalmente com um disco de carborundum e o comprimento dos espécimes foi padronizado para $15 \pm 0,5$ mm. Os espécimes foram instrumentados no comprimento total do canal radicular com lima nº 25.01 (Prodesign Logic file, Easy Equipamentos Odontológicos, Belo Horizonte, Brazil).

Em seguida, os espécimes foram submetidos a três banhos ultrassônicos de 10 min cada um com hipoclorito de sódio 1%, EDTA 17% e solução salina para neutralizar as substâncias anteriores. Os espécimes receberam uma dupla camada de esmalte vermelho (L'Oréal Colorama, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) externamente para promover a contaminação posterior apenas pelo canal radicular principal. Os espécimes foram esterilizados em autoclave (Cristofoli, Campo Mourão, PR, Brasil) por 20 minutos a 121°C.

Contaminação da dentina

Colônias isoladas de *E. faecalis* (ATCC 29212), *C. albicans* (ATCC 10231) e *S. mutans* (ATCC 25175) foram utilizadas para criar o inóculo em suspensão de BHI após cultivos sucessivos. A suspensão celular foi medida espectrofotometricamente (Bel Photonics, Osasco, SP, Brasil) de acordo com a turbidez da escala de McFarland e ajustada para 3×10^8 CFU/mL para *E. faecalis* e *S. mutans*; e 7×10^6 UFC/mL para *C. albicans*. A curva de crescimento microbiano foi previamente estabelecida e permitiu-se que *C. albicans* proliferasse algumas horas antes de *E. faecalis* e *S. mutans* neste inóculo.

O protocolo de Andrade et al. (2015) (16) foi seguido para infectar a dentina. Sob um fluxo laminar, os espécimes foram inseridos individualmente em microtubos com 1 mL de solução esterilizada de BHI e transferidos para um banho ultrassônico por 15 minutos para permitir que o meio de cultura penetrasse nos túbulos dentinários. O inóculo de BHI foi adicionado aos microtubos por uma pipeta (Nichipet EX, Nichiryo, Tóquio, Kanto, Japão) e o protocolo de centrifugação foi realizado. A solução de BHI

foi trocada após 24 h, e o protocolo de centrifugação foi repetido após 48 h. Todos os espécimes foram contaminados por 7 dias e a eficácia do protocolo de contaminação foi confirmada pela observação no CLSM, por meio de espécimes de controle positivo.

Protocolo de Desinfecção e Coleta de Microbiologia

A instrumentação foi realizada com o sistema recíprocante Reciproc (VDW, Munique, Alemanha) usando a técnica coroa-ápice e seguindo as instruções do fabricante até que o instrumento 25/.08 e 40/.06 estivessem no comprimento de trabalho. Após o uso de cada instrumento, 10mL de água destilada esterilizada foram utilizados como solução irrigadora em um fluxo constante de 0,26mL/s (17), além de uma irrigação final com 10mL de água destilada esterilizada. As coletas foram realizadas com 3 cones de papel esterilizados (15/02): antes da instrumentação (C0), após a instrumentação (C1) e após a irrigação final (C2). Os cones de papel foram inseridos em um microtubo contendo 1mL de caldo BHI, depois passaram por diluições seriadas e semeados nos seguintes meios para o crescimento dos microrganismos isolados: ágar M-enterococcus (KASVI, Curitiba, Brasil) para crescimento de *E. faecalis*, Ágar Sabouraud com Clorafenicol (KASVI, Curitiba, Brasil) para o crescimento de *C. albicans* e ágar Mitis Salivarius (Difco, Kansas City, MO, EUA) para o crescimento de *S. mutans*. Após 48 horas, foram contadas as unidades formadoras de colônias (UFC/mL) nas placas.

Os dentes foram divididos em quatro grupos de acordo com as cânulas de irrigação utilizadas: agulha com extremidade aberta e ventilação lateral (Endo-eze, Ultradent Products Inc., South Jordan, UT, EUA) (G1), agulhas de ponta fechada com ventilação lateral (Max-i-probe, Dentsply, Surrey, Reino Unido) (G2), agulha plana (abertura frontal) (NaviTip; Ultradent, South Jordan, UT)(G3) e ponta fechada com ventilação lateral dupla (Endo-Irrigation Needle; Transcodent, Neumunster, Germany)(G4). Todas as cânulas utilizadas tinham o mesmo tamanho 30G, que corresponde a um instrumento nº 35 e foram colocadas a 1mm do comprimento de trabalho (WL). Apenas 10 dos 11 dentes foram utilizados para coletas microbiológicas, já que 1 dente de cada grupo foi utilizado como controle positivo para análise por MCVL.

Análise por MCVL

Dez dentes de cada grupo foram usados na análise por MCVL. Cortes longitudinais dos espécimes foram criados com um disco de diamante e solução salina esterilizada em uma máquina Isomet (Isomet, Buehler, IL, EUA) para obter duas metades. Em seguida, 17% de EDTA foi utilizado por 5 min para remover a smear layer do corte e depois lavada em solução salina. As metades dos tubos de dentina foram coradas com 30 µL de corante Live and Dead® por 10 min.

Os espécimes foram examinados em um microscópio confocal Leica TCS-SPE invertido (Leica Microsystems GmbH, Mannheim, Baden-Württemberg, Alemanha) usando uma lente de ampliação de 40X com óleo de imersão. As imagens foram obtidas usando cerca de 23 seções de passo de espessura de 1 µm em um formato de 1024x1024 pixels. Quatro imagens foram tiradas das porções cervical e apical de cada metade do espécime. Para cada porção, as imagens foram feitas na região mais superficial próxima ao canal e na maior profundidade dentinária. As imagens foram adquiridas usando o software Leica Application Suite-Advanced Fluorescence (LAS AF, Leica Mannheim, Baden-Württemberg, Alemanha). A avaliação da viabilidade bacteriana foi feita com o software bioImageL TM v214 para a contagem bacteriana (verde/viva e vermelha/morta).

Os dados de UFC/mL e porcentagem de viabilidade bacteriana foram tabulados e submetidos ao teste de normalidade. Nas diferentes análises, conforme a distribuição normal ou não, utilizaram-se os testes ANOVA seguido de Tukey ou Kruskal-Wallis seguido de Dunn ($P < 0,05$) para comparação estatística dos grupos de estudo. Para avaliação dentro de cada grupo, das diferenças entre cada fase, utilizou-se o teste de Friedman quando os dados foram não paramétricos e ANOVA para os paramétricos ($P < 0,05$).

RESULTADOS

Os resultados mostraram uma redução significativa nas bactérias após 30mL de irrigação dentro dos grupos individuais. No entanto, para todos os microrganismos presentes no biofilme não houve diferença significativa entre C1 e C2, para todas as cânulas irrigadoras testadas (Fig. 1-3).

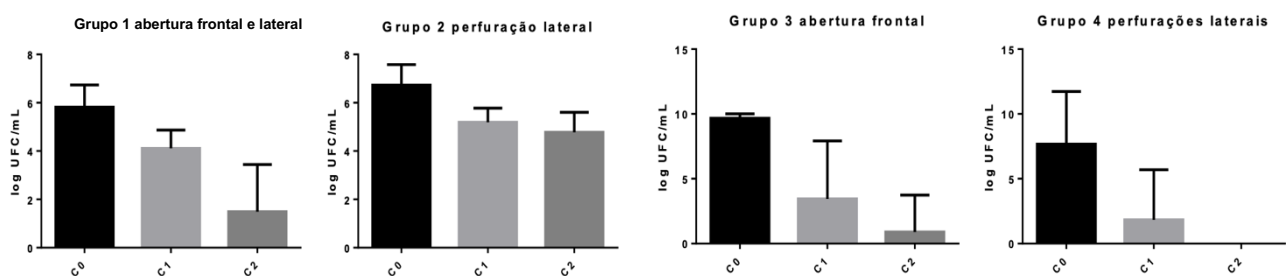


Figura 1. Gráficos de valores médios de colônias bacterianas de *S. mutans* para cada cânula de irrigação utilizada

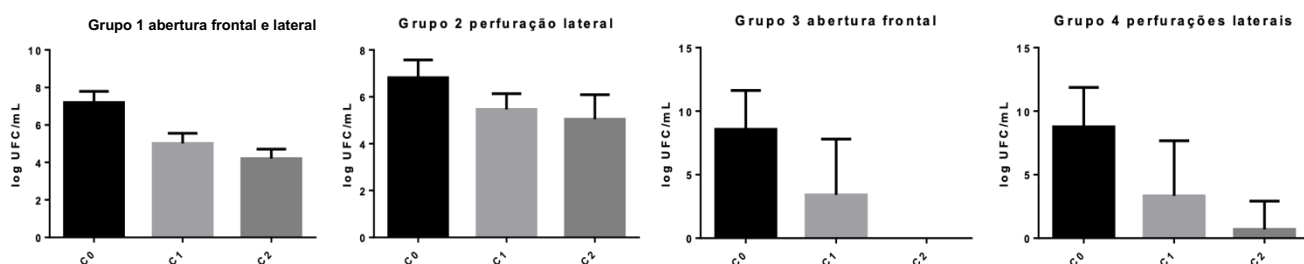


Figura 2. Gráficos de valores médios de colônias bacterianas de *C. albicans* para cada cânula de irrigação utilizada

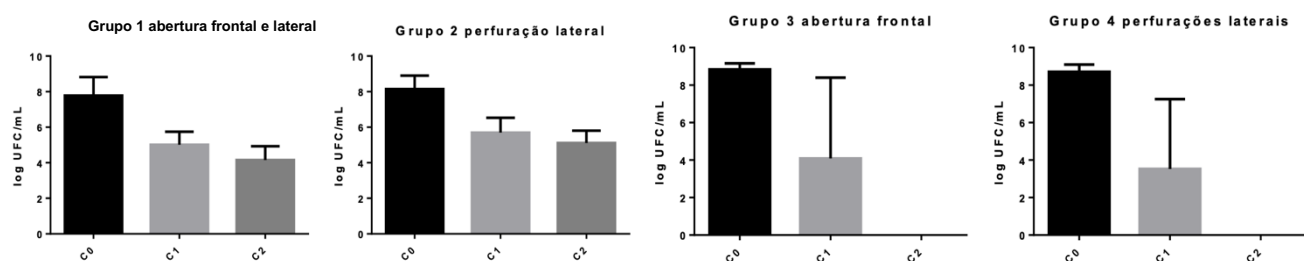


Figura 3. Gráficos de valores médios de colônias bacterianas de *E. faecalis* para cada cânula de irrigação utilizada

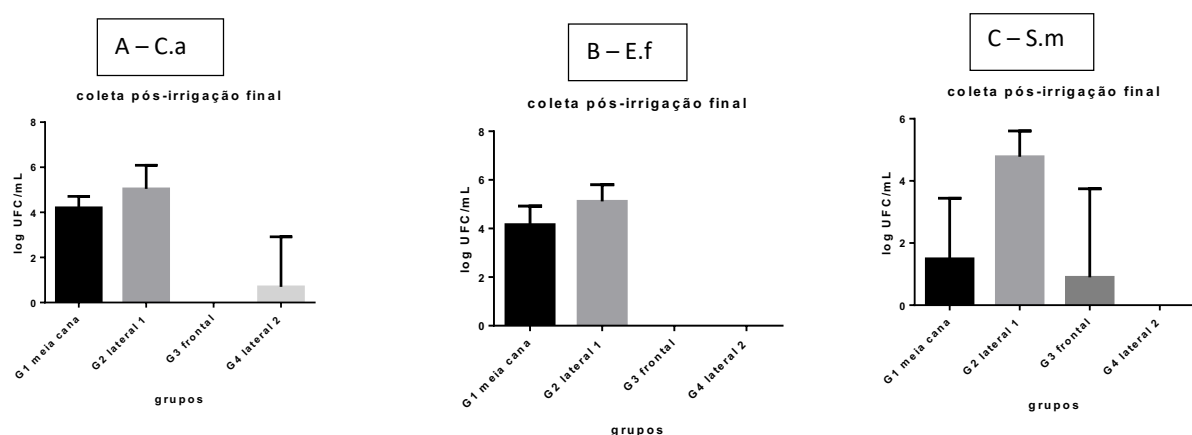


Figura 4. Gráficos de valores médios de colônias bacterianas comparando os quatro grupos de cânulas na coleta pós-irrigação final. A) Log de colônias de *C. albicans* após irrigação final com as diferentes cânulas; B) Log de colônias de *E. faecalis* após irrigação final com as diferentes cânulas; C) Log de colônias de *S. mutans* após irrigação final com as diferentes cânulas.

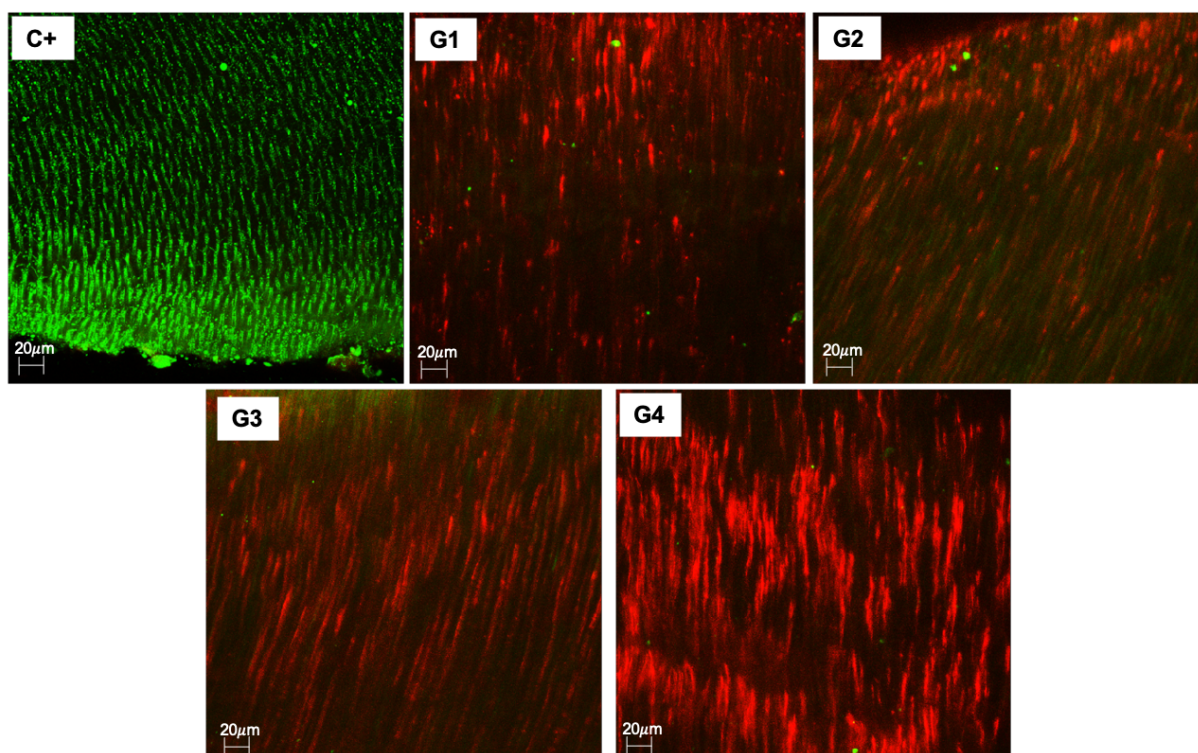


Figura 5 – Imagens MCVL representativas da área total dos túbulos dentinários. (G1) Cânula em forma de extremidade aberta e ventilação lateral; (G2) Cânula de extremidade fechada com uma saída lateral; (G3) Cânula com extremidade aberta; (G4) Cânula de extremidade fechada com saída bilateral; (C+) Controle positivo. Células viáveis coradas em verde e as não viáveis em vermelho. Ampliação 40x. Barras: 20,0 μ m.

Quando comparadas a desinfecção alcançada pelas diferentes cânulas irrigadoras observou-se que para *E. faecalis* não houve diferença estatística entre os grupos G3 e G4, somente. Para *C. albicans* os grupos G1 e G2 foram estatisticamente semelhantes entre si, assim como G3 e G4. Para *S. mutans* todas as cânulas irrigadoras tiveram comportamento estatisticamente semelhante. Na figura 4, se encontram a comparação das unidades formadoras de colônias entre os grupos de cânulas.

Os dados de viabilidade obtidos através de CLSM mostraram diferença entre os grupos teste e o controle positivo. A agulha de extremidade fechada e duas aberturas laterais apresentou menor viabilidade, porém não foi possível observar diferença estatística entre as diferentes agulhas de irrigação (Fig 5).

DISCUSSÃO

As complexidades anatômicas do sistema de canal radicular e a existência de microrganismos na estrutura de biofilme aderente à superfície são os principais desafios na desinfecção do canal radicular(4,17). Uma maneira de contornar tais desafios é combinar irrigantes ideais com uma técnica de irrigação ideal para atingir a redução máxima de biofilmes aderentes à superfície dos canais radiculares. O uso de irrigantes antimicrobianos, como hipoclorito de sódio, são mais eficientes na redução das bactérias viáveis dos canais radiculares(78). No entanto, o objetivo neste estudo foi avaliar a eficácia mecânica dos irrigantes quando administrados usando pontas de agulha diferentes. Assim, a água destilada esterilizada foi usada como irrigante. (10)

E. faecalis e *C. albicans* foram escolhidos para o este estudo porque foram repetidamente isolados do sistema de canais radiculares em casos de insucesso (1,79,80). Além disso, esses microrganismos podem penetrar nos túbulos dentinários(79,81) e formam biofilmes, que são mais resistente à desinfecção do canal (82). Recentemente, *S. mutans* também foi encontrado em alta prevalência em infecções endodônticas assintomáticas e sintomáticas, inclusive em abscessos (33).

No presente estudo, os canais foram instrumentados até um preparo apical de tamanho 40, que é o tamanho apical mínimo para facilitar a remoção de debris (11,83). O volume de irrigante é conhecido por afetar a limpeza do canal radicular (76,84,85), e no presente estudo em todos os grupos foi utilizado o mesmo volume de irrigante em quantidade suficiente para possibilitar uma excelente troca de fluidos no interior dos canais radiculares.

As cânulas irrigadoras que apresentaram melhor desempenho para remoção do biofilme no presente estudo foram as de abertura frontal (G3) e a de extremidade fechada com duas aberturas laterais (G4). Diversos estudos que utilizam dinâmica de fluidos computacional avaliaram velocidade, alcance e turbulência gerada por diferentes cânulas de irrigação(9,37,86–89). Estes estudos mostram que as agulhas abertas criaram um jato em direção ao ápice e reposição máxima de irrigante. Dentro deste grupo, as agulhas com abertura lateral pareciam menos eficiente em termos de substituição de irrigante(9,37,86–90), mas uma tensão de cisalhamento muito maior em uma região localizada da parede do canal (próxima à saída da agulha) (5,13,30–35). O padrão de fluxo das agulhas fechadas era diferente em comparação com as

agulhas abertas. O fluxo foi mais direcionado para a parede do canal radicular no lugar do ápice (9,37,71,86–90).

Tem sido sugerido que a agulha com abertura lateral é mais eficiente do que as entalhadas na remoção de corante(91) ou bactérias bioluminescentes (10). Esses estudos avaliaram principalmente a capacidade de cada agulha de trocar o irrigante no canal radicular, em vez de separar detritos ou microrganismos da parede, porque tanto as partículas de corante quanto as bactérias bioluminescentes estavam em suspensão.

A profundidade da colocação da agulha é um fator importante na redução da contagem de bactérias durante a irrigação do canal radicular (11,92). A substituição do irrigante em agulhas abertas estendeu-se além de 2 mm apicalmente, ao passo que foi limitada em 1 a 1,5 mm apicalmente em agulhas com pontas fechadas(37,87–89). Devido a possível interferência na troca de fluidos no terço apical estabelecemos a distância de 1mm do comprimento de trabalho para inserção das agulhas de irrigação.

No presente estudo a descontaminação na luz do canal radicular de biofilme multiespécie foi maior quando utilizadas agulhas de irrigação de extremidade aberta, provavelmente devido ao maior fluxo produzido, gerando uma maior movimentação do irrigante. Também a de extremidade fechada com duas aberturas laterais, que promoveu a maior descontaminação no interior do canal radicular, se deve ao fato do fluxo do irrigante ser direcionado lateralmente, atingindo mais superfícies internas da parede de canais radiculares. Clinicamente, pode-se extrapolar esse efeito em direção lateral também às possíveis ramificações do terço apical. Para descontaminação dos túbulos dentinários os resultados observados através de MCVL não permitiram observar diferença estatística significativa entre as diferentes cânulas utilizadas. Sugere-se o uso de cânulas de abertura frontal ou com extremidade fechada e duas aberturas laterais no tratamento endodôntico, objetivando a maior descontaminação possível do sistema de canais radiculares.

REFERÊNCIAS

1. Siqueira JF, Rôças IN. Clinical Implications and Microbiology of Bacterial Persistence after Treatment Procedures. *Journal of Endodontics*. 2008.

2. Schilder H. Cleaning and shaping the root canal. *Dent Clin North Am.* 1974;18(2).
3. Ove A. Peters, PD Dr med dent MF. Current Challenges and Concepts in the Preparation of Root Canal Systems: A Review. *J Endod.* 2004;30(8).
4. Peters OA, Laib A, Göhring TN, Barbakow F. Changes in root canal geometry after preparation assessed by high-resolution computed tomography. *J Endod.* 2001;27(1).
5. Gulabivala K, Patel B, Evans G, Ng YL. Effects of mechanical and chemical procedures on root canal surfaces. *Endod Topics.* 2005;10(1).
6. Nguy D, Sedgley C. The Influence of Canal Curvature on the Mechanical Efficacy of Root Canal Irrigation In Vitro Using Real-Time Imaging of Bioluminescent Bacteria. *J Endod.* 2006;32(11).
7. Khademi A, Yazdizadeh M, Feizianfard M. Determination of the Minimum Instrumentation Size for Penetration of Irrigants to the Apical Third of Root Canal Systems. *J Endod.* 2006;32(5).
8. Lee SJ, Wu MK, Wesselink PR. The effectiveness of syringe irrigation and ultrasonics to remove debris from simulated irregularities within prepared root canal walls. *Int Endod J.* 2004;37(10).
9. Boutsoukakis C, Lambrianidis T, Kastrinakis E, Bekiaroglou P. Measurement of pressure and flow rates during irrigation of a root canal ex vivo with three endodontic needles. *Int Endod J.* 2007;40(7).
10. Vinothkumar TS, Kavitha S, Lakshminarayanan L, Gomathi NS, Kumar V. Influence of Irrigating Needle-Tip Designs in Removing Bacteria Inoculated Into Instrumented Root Canals Measured Using Single-Tube Luminometer. *J Endod.* 2007;33(6).
11. Falk KW, Sedgley CM. The influence of preparation size on the mechanical efficacy of root canal irrigation in vitro. *J Endod.* 2005;31(10).
12. Usman N, Baumgartner JC, Marshall JG. Influence of instrument size on root canal debridement. *J Endod.* 2004;30(2).
13. van der Sluis LWM, Versluis M, Wu MK, Wesselink PR. Passive ultrasonic irrigation of the root canal: A review of the literature. *International Endodontic Journal.* 2007.
14. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. Vol. 284, *Science.* 1999.

15. Neelakantan P, Romero M, Vera J, Daood U, Khan AU, Yan A, et al. Biofilms in Endodontics—Current status and future directions. Vol. 18, International Journal of Molecular Sciences. 2017.
16. de Paz LC. Redefining the Persistent Infection in Root Canals: Possible Role of Biofilm Communities. J Endod. 2007;33(6).
17. Ricucci D, Siqueira JF. Biofilms and apical periodontitis: Study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. J Endod. 2010;36(8).
18. Dumani A, Yoldas O, Yilmaz S, Koksall F, Kayar B, Akcimen B, et al. Polymerase chain reaction of enterococcus faecalis and candida albicans in apical periodontitis from turkish patients. J Clin Exp Dent. 2012;
19. Poptani B, Sharaff M, Archana G, Parekh V. Detection of Enterococcus faecalis and Candida albicans in previously root-filled teeth in a population of Gujarat with polymerase chain reaction. Contemp Clin Dent. 2013;
20. Murad CF, Sassone LM, Faveri M, Hirata R, Figueiredo L, Feres M. Microbial diversity in persistent root canal infections investigated by checkerboard DNA-DNA hybridization. J Endod. 2014;
21. Tennert C, Fuhrmann M, Wittmer A, Karygianni L, Altenburger MJ, Pelz K, et al. New bacterial composition in primary and persistent/secondary endodontic infections with respect to clinical and radiographic findings. J Endod. 2014;
22. Al-Nazhan S, Al-Sulaiman A, Al-Rasheed F, Alnajjar F, Al-Abdulwahab B, Al-Badah A. Microorganism penetration in dentinal tubules of instrumented and retreated root canal walls. In vitro SEM study . Restor Dent Endod. 2014;
23. Zhang C, Du J, Peng Z. Correlation between Enterococcus faecalis and Persistent Intraradicular Infection Compared with Primary Intraradicular Infection: A Systematic Review. Journal of Endodontics. 2015.
24. Arias CA, Murray BE. The rise of the Enterococcus: Beyond vancomycin resistance. Nature Reviews Microbiology. 2012.
25. Siqueira JF, Sen BH. Fungi in endodontic infections. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2004;
26. Vaghela D, Venkateshbabu N, Arathi G, Kandaswamy D, Jamini N. Disinfection of dentinal tubules with two different formulations of calcium hydroxide as compared to 2% chlorhexidine: As intracanal medicaments against Enterococcus faecalis and Candida albicans: An in vitro study. Journal of Conservative Dentistry. 2011;

27. Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. In vitro growth and analysis of candida biofilms. *Nat Protoc.* 2008;
28. Calzavara-Pinton P, Rossi MT, Sala R, Venturini M. Photodynamic antifungal chemotherapy. *Photochemistry and Photobiology.* 2012.
29. Kim SL, Gordon SM, Shrestha NK. Distribution of streptococcal groups causing infective endocarditis: a descriptive study. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2018;91(3).
30. Nakano K, Nemoto H, Nomura R, Inaba H, Yoshioka H, Taniguchi K, et al. Detection of oral bacteria in cardiovascular specimens. *Oral Microbiol Immunol.* 2009;24(1).
31. Baker JL, Faustoferri RC, Quivey RG. Acid-adaptive mechanisms of *Streptococcus mutans*—the more we know, the more we don't. Vol. 32, *Molecular Oral Microbiology.* 2017.
32. Nomura R, Ogaya Y, Nakano K. Contribution of the collagen-binding proteins of *Streptococcus mutans* to bacterial colonization of inflamed dental pulp. *PLoS One.* 2016;11(7).
33. Lima AR, Herrera DR, Francisco PA, Pereira AC, Lemos J, Abranches J, et al. Detection of *Streptococcus mutans* in symptomatic and asymptomatic infected root canals. *Clin Oral Investig.* 2021;25(6).
34. Nair PNR, Henry S, Cano V, Vera J. Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after “one-visit” endodontic treatment. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology.* 2005;99(2).
35. Dutner J, Mines P, Anderson A. Irrigation trends among american association of endodontists members: A web-based survey. *J Endod.* 2012;38(1).
36. Willershausen I, Wolf TG, Schmidtman I, Berger C, Ehlers V, Willershausen B, et al. Survey of root canal irrigating solutions used in dental practices within Germany. *Int Endod J.* 2015;48(7).
37. Boutsoukis C, van der Sluis LWM. Syringe Irrigation: Blending Endodontics and Fluid Dynamics. *Em: Endodontic Irrigation.* 2015.
38. Jiang LM, Lak B, Eijssvogels LM, Wesselink P, van der Sluis LWM. Comparison of the cleaning efficacy of different final irrigation techniques. *J Endod.* 2012;38(6).

39. Paqué F, Boessler C, Zehnder M. Accumulated hard tissue debris levels in mesial roots of mandibular molars after sequential irrigation steps. *Int Endod J*. 2011;44(2).
40. Kawashima N, Wadachi R, Suda H, Yeng T, Parashos P. Root canal medicaments. *Int Dent J*. 2009;59(1).
41. Huang Z. A review of progress in clinical photodynamic therapy. *Technology in Cancer Research and Treatment*. 2005.
42. Garcez AS, Nuñez SC, Hamblin MR, Suzuki H, Ribeiro MS. Photodynamic therapy associated with conventional endodontic treatment in patients with antibiotic-resistant microflora: A preliminary report. *J Endod*. 2010;
43. Garcez AS, Ribeiro MS, Tegos GP, Núñez SC, Jorge AOC, Hamblin MR. Antimicrobial photodynamic therapy combined with conventional endodontic treatment to eliminate root canal biofilm infection. *Lasers Surg Med*. 2007;
44. George S, Kishen A. Influence of photosensitizer solvent on the mechanisms of photoactivated killing of *Enterococcus faecalis*. *Photochem Photobiol*. 2008;
45. Ng R, Singh F, Papamanou DA, Song X, Patel C, Holewa C, et al. Endodontic photodynamic therapy ex vivo. *J Endod*. 2011;
46. Chiniforush N, Pourhajibagher M, Shahabi S, Kosarieh E, Bahador A. Can antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) enhance the endodontic treatment? *Journal of Lasers in Medical Sciences*. 2016.
47. Costa ACBP, De Campos Rasteiro VM, Pereira CA, Da Silva Hashimoto ESH, Beltrame M, Junqueira JC, et al. Susceptibility of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to erythrosine- and LED-mediated photodynamic therapy. *Arch Oral Biol*. 2011;
48. Chui C, Aoki A, Takeuchi Y, Sasaki Y, Hiratsuka K, Abiko Y, et al. Antimicrobial effect of photodynamic therapy using high-power blue light-emitting diode and red-dye agent on *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontal Res*. 2013;
49. Konopka K, Goslinski T. Photodynamic therapy in dentistry. *Journal of Dental Research*. 2007.
50. Oda DF, Duarte MAH, Andrade FB, Moriyama LT, Bagnato VS, de Moraes IG. Antimicrobial action of photodynamic therapy in root canals using LED curing light, curcumin and carbopol gel. *Int Endod J*. 2019;

51. Paschoal MA, Tonon CC, Spolidório DMP, Bagnato VS, Giusti JSM, Santos-Pinto L. Photodynamic potential of curcumin and blue LED against streptococcus mutans in a planktonic culture. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2013;
52. Lim EJ, Oak CH, Heo J, Kim YH. Methylene blue-mediated photodynamic therapy enhances apoptosis in lung cancer cells. *Oncol Rep.* 2013;
53. Hamblin MR, Hasan T. Photodynamic therapy: A new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochemical and Photobiological Sciences.* 2004.
54. St. Denis TG, Dai T, Izikson L, Astrakas C, Anderson RR, Hamblin MR, et al. All you need is light, antimicrobial photoinactivation as an evolving and emerging discovery strategy against infectious disease. *Virulence.* 2011.
55. Burleson A, Nusstein J, Reader A, Beck M. The In Vivo Evaluation of Hand/Rotary/Ultrasound Instrumentation in Necrotic, Human Mandibular Molars. *J Endod.* 2007;
56. Spoleti P, Siragusa M, Spoleti MJ. Bacteriological evaluation of passive ultrasonic activation. *J Endod.* 2003;
57. Castelo-Baz P, Martín-Biedma B, Cantatore G, Ruíz-Piñón M, Bahillo J, Rivas-Mundiña B, et al. In vitro comparison of passive and continuous ultrasonic irrigation in simulated lateral canals of extracted teeth. *J Endod.* 2012;
58. Haapasalo M, Wang Z, Shen Y, Curtis A, Patel P, Khakpour M. Tissue dissolution by a novel Multisonic Ultracleaning system and sodium hypochlorite. *J Endod.* 2014;
59. Bao P, Shen Y, Lin J, Haapasalo M. In Vitro Efficacy of XP-endo Finisher with 2 Different Protocols on Biofilm Removal from Apical Root Canals. *J Endod.* 2017;
60. Elnaghy AM, Mandorah A, Elsaka SE. Effectiveness of XP-endo Finisher, EndoActivator, and File agitation on debris and smear layer removal in curved root canals: a comparative study. *Odontology.* 2017;
61. Alves FRF, Marceliano-Alves MF, Sousa JCN, Silveira SB, Provenzano JC, Siqueira JF. Removal of root canal fillings in curved canals using either reciprocating single- or rotary multi-instrument systems and a supplementary step with the XP-Endo Finisher. *J Endod.* 2016;
62. FKG SWISS ENDO. Xp-Endo finisher. Disponível em: <https://www.fkg.ch/sites/default/files201610_fkg_xp_endo_finisher_brochure_v2_pt_web_0.pdf>. 2018.

63. Kato AS, Cunha RS, da Silveira Bueno CE, Pelegriane RA, Fontana CE, de Martin AS. Investigation of the efficacy of passive ultrasonic irrigation versus irrigation with reciprocating activation: An environmental scanning electron microscopic study. *J Endod.* 2016;
64. Simezo AP, da Silveira Bueno CE, Cunha RS, Pelegriane RA, Rocha DGP, de Martin AS, et al. Comparative Analysis of Dentinal Erosion after Passive Ultrasonic Irrigation versus Irrigation with Reciprocating Activation: An Environmental Scanning Electron Study. *J Endod.* 2017;
65. Pereira TC, da Silva Munhoz Vasconcelos LR, Graeff MSZ, Ribeiro MCM, Duarte MAH, de Andrade FB. Intratubular decontamination ability and physicochemical properties of calcium hydroxide pastes. *Clin Oral Investig.* 2019;23(3).
66. Nakamura VC, Cai S, Candeiro GTM, Ferrari PH, Caldeira CL, Gavini G. Ex vivo evaluation of the effects of several root canal preparation techniques and irrigation regimens on a mixed microbial infection. *Int Endod J.* 2013;
67. Nakamura VC, Pinheiro ET, Prado LC, Silveira AC, Carvalho APL, Mayer MPA, et al. Effect of ultrasonic activation on the reduction of bacteria and endotoxins in root canals: a randomized clinical trial. *Int Endod J.* 2018;51.
68. Fimple JL, Fontana CR, Foschi F, Ruggiero K, Song X, Pagonis TC, et al. Photodynamic Treatment of Endodontic Polymicrobial Infection In Vitro. *J Endod.* 2008;34(6).
69. Garcez AS, Arantes-Neto JG, Sellera DP, Fregnani ER. Effects of antimicrobial photodynamic therapy and surgical endodontic treatment on the bacterial load reduction and periapical lesion healing. Three years follow up. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2015;12(4).
70. Garcez AS, Fregnani ER, Rodriguez HM, Nunez SC, Sabino CP, Suzuki H, et al. The use of optical fiber in endodontic photodynamic therapy. Is it really relevant? *Lasers Med Sci.* 2013;28(1).
71. Boutsoukis C, Kastrinakis E, Lambrianidis T, Verhaagen B, Versluis M, van der Sluis LWM. Formation and removal of apical vapor lock during syringe irrigation: A combined experimental and Computational Fluid Dynamics approach. *Int Endod J.* 2014;47(2).
72. Kato AS, Cunha RS, da Silveira Bueno CE, Pelegriane RA, Fontana CE, de Martin AS. Investigation of the efficacy of passive ultrasonic irrigation versus irrigation

- with reciprocating activation: An environmental scanning electron microscopic study. *J Endod* [Internet]. 2016;42(4):659–63. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2016.01.016>
73. Pedrinha VF CCMVEE. Impact of irrigation protocols with some chelators and mechanical agitation on intratubular decontamination. *Braz Oral Res.* 2021;35.
 74. Duque JA, Duarte MAH, Canali LCF, Zancan RF, Vivan RR, Bernardes RA, et al. Comparative Effectiveness of New Mechanical Irrigant Agitating Devices for Debris Removal from the Canal and Isthmus of Mesial Roots of Mandibular Molars. *J Endod.* 2017;
 75. de Andrade FB, Arias MPC, Maliza AGA, Duarte MAH, Graeff MSZ, Amoroso-Silva PA, et al. A new improved protocol for in vitro intratubular dentinal bacterial contamination for antimicrobial endodontic tests: Standardization and validation by confocal laser scanning microscopy. *Journal of Applied Oral Science.* 2015;23(6).
 76. van der Sluis LWM, Gambarini G, Wu MK, Wesselink PR. The influence of volume, type of irrigant and flushing method on removing artificially placed dentine debris from the apical root canal during passive ultrasonic irrigation. *Int Endod J.* 2006;39(6).
 77. Şahbaz C, Adigüzel Ö. An evaluation of the efficiency of different irrigation systems on the smear layer. *Journal of International Dental and Medical Research.* 2014;7(1).
 78. Byström A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the effect of 0.5 percent sodium hypochlorite in endodontic therapy. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology.* 1983;55(3).
 79. Haapasalo M, Ørstavik D. In vitro Infection and Disinfection of Dentinal Tubules. *J Dent Res.* 1987;66(8).
 80. Pinheiro ET, Gomes BPFA, Ferraz CCR, Sousa ELR, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J.* 2003;36(1).
 81. Love RM. *Enterococcus faecalis* - A mechanism for its role in endodontic failure. *Int Endod J.* 2001;34(5).
 82. Distel JW, Hatton JF, Gillespie MJ. Biofilm formation in medicated root canals. *J Endod.* 2002;28(10).

83. Khan S, Niu LN, Eid AA, Looney SW, Didato A, Roberts S, et al. Periapical pressures developed by nonbinding irrigation needles at various irrigation delivery rates. *J Endod.* 2013;39(4).
84. Huang TY, Gulabivala K, Ng YL. A bio-molecular film ex-vivo model to evaluate the influence of canal dimensions and irrigation variables on the efficacy of irrigation. *Int Endod J.* 2008;41(1).
85. Sedgley C, Applegate B, Nagel A, Hall D. Real-time imaging and quantification of bioluminescent bacteria in root canals in vitro. *J Endod.* 2004;30(12).
86. Boutsoukis C, Lambrianidis T, Kastrinakis E. Irrigant flow within a prepared root canal using various flow rates: A Computational Fluid Dynamics study. *Int Endod J.* 2009;42(2).
87. Boutsoukis C, Verhaagen B, Versluis M, Kastrinakis E, van der Sluis LWM. Irrigant flow in the root canal: Experimental validation of an unsteady Computational Fluid Dynamics model using high-speed imaging. *Int Endod J.* 2010;43(5).
88. Boutsoukis C, Verhaagen B, Versluis M, Kastrinakis E, Wesselink PR, van der Sluis LWM. Evaluation of Irrigant Flow in the Root Canal Using Different Needle Types by an Unsteady Computational Fluid Dynamics Model. *J Endod.* 2010;36(5).
89. Boutsoukis C, Lambrianidis T, Verhaagen B, Versluis M, Kastrinakis E, Wesselink PR, et al. The effect of needle-insertion depth on the irrigant flow in the root canal: Evaluation using an unsteady computational fluid dynamics model. *J Endod.* 2010;36(10).
90. Chen JE, Nurbakhsh B, Layton G, Bussmann M, Kishen A. Irrigation dynamics associated with positive pressure, apical negative pressure and passive ultrasonic irrigations: A computational fluid dynamics analysis. *Australian Endodontic Journal.* 2014;40(2).
91. Kahn F, Rosenberg P, Gliksberg J. An in vitro evaluation of the irrigating characteristics of ultrasonic and subsonic handpieces and irrigating needles and probes. *J Endod.* 1^o de maio de 1995;21(5):277–80.
92. Boutsoukis C, Lambrianidis T, Vasiliadis L. Clinical relevance of standardization of endodontic irrigation needle dimensions according to the ISO 9626:1991 and 9626:1991/Amd 1:2001 specification. *Int Endod J.* 2007;40(9).

93. Mayer BE, Peters OA, Barbakow F. Effects of rotary instruments and ultrasonic irrigation on debris and smear layer scores: A scanning electron microscopic study. *Int Endod J.* 2002;35(7).
94. Hülsmann M, Rummelin C, Schäfers F. Root canal cleanliness after preparation with different endodontic handpieces and hand instruments: A comparative SEM investigation. *J Endod.* 1997;23(5).
95. Gulabivala K, Stock CJR, Lewsey JD, Ghorri S, Ng YL, Spratt DA. Effectiveness of electrochemically activated water as an irrigant in an infected tooth model. *Int Endod J.* 2004;37(9).
96. Shen Y, Gao Y, Lin J, Ma J, Wang Z, Haapasalo M. Methods and models to study irrigation. *Endod Topics.* 2012;27(1).
97. Kishen A, Haapasalo M. Biofilm models and methods of biofilm assessment. *Endod Topics.* 2010;22(1).
98. Chávez De Paz LE. Development of a multispecies biofilm community by four root canal bacteria. *J Endod.* 2012;38(3).
99. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1998;85(1).
100. Siqueira JF, Rôças IN, Alves FRF, Silva MG. Bacteria in the apical root canal of teeth with primary apical periodontitis. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology.* 2009;107(5).
101. Nguy D, Sedgley C. The Influence of Canal Curvature on the Mechanical Efficacy of Root Canal Irrigation In Vitro Using Real-Time Imaging of Bioluminescent Bacteria. *J Endod.* 2006;32(11).
102. Hsieh YD, Gau CH, Kung Wu SF, Shen EC, Hsu PW, Fu E. Dynamic recording of irrigating fluid distribution in root canals using thermal image analysis. *Int Endod J.* 2007;40(1).
103. Sedgley CM, Nagel AC, Hall D, Applegate B. Influence of irrigant needle depth in removing bioluminescent bacteria inoculated into instrumented root canals using real-time imaging in vitro. *Int Endod J.* 2005;38(2).
104. Tay FR, Gu L sha, Schoeffel GJ, Wimmer C, Susin L, Zhang K, et al. Effect of Vapor Lock on Root Canal Debridement by Using a Side-vented Needle for Positive-pressure Irrigant Delivery. *J Endod.* 2010;36(4).

105. Azimian S, Bakhtiar H, Azimi S, Esnaashari E. In vitro effect of XP-Endo finisher on the amount of residual debris and smear layer on the root canal walls. *Dent Res J (Isfahan)*. 2019;16(3).
106. Silva EJNL, Belladonna FG, Zuolo AS, Rodrigues E, Ehrhardt IC, Souza EM, et al. Effectiveness of XP-endo Finisher and XP-endo Finisher R in removing root filling remnants: a micro-CT study. *Int Endod J*. 2018;51(1).
107. Boutsoukis C, Gogos C, Verhaagen B, Versluis M, Kastrinakis E, van der Sluis LWM. The effect of apical preparation size on irrigant flow in root canals evaluated using an unsteady Computational Fluid Dynamics model. *Int Endod J*. 2010;43(10).
108. Ruddle CJ. Hydrodynamic disinfection tsunami endodontics. Vol. 26, *Dentistry Today*. 2007.
109. Boutsoukis C, Arias-Moliz MT. Present status and future directions – irrigants and irrigation methods. Vol. 55, *International Endodontic Journal*. 2022.
110. Azim AA, Aksel H, Zhuang T, Mashtare T, Babu JP, Huang GTJ. Efficacy of 4 Irrigation Protocols in Killing Bacteria Colonized in Dentinal Tubules Examined by a Novel Confocal Laser Scanning Microscope Analysis. *J Endod*. 2016;
111. Adcock JM, Sidow SJ, Looney SW, Liu Y, McNally K, Lindsey K, et al. Histologic evaluation of canal and isthmus debridement efficacies of two different irrigant delivery techniques in a closed system. *J Endod*. 2011;37(4).
112. Howard RK, Kirkpatrick TC, Rutledge RE, Yaccino JM. Comparison of debris removal with three different irrigation techniques. *J Endod*. 2011;37(9).
113. Souza LC, Brito PRR, Machado de Oliveira JC, Alves FRF, Moreira E JL, Sampaio-Filho HR, et al. Photodynamic Therapy with Two Different Photosensitizers as a Supplement to Instrumentation/Irrigation Procedures in Promoting Intracanal Reduction of *Enterococcus faecalis*. *J Endod*. 2010;36(2).
114. Alves FRF, Andrade-Junior C v., Marceliano-Alves MF, Pérez AR, Rôças IN, Versiani MA, et al. Adjunctive Steps for Disinfection of the Mandibular Molar Root Canal System: A Correlative Bacteriologic, Micro–Computed Tomography, and Cryopulverization Approach. *J Endod*. 2016;
115. Liang YH, Jiang LM, Jiang L, Chen XB, Liu YY, Tian FC, et al. Radiographic healing after a root canal treatment performed in single-rooted teeth with and

- without ultrasonic activation of the irrigant: A randomized controlled trial. *J Endod.* 2013;39(10).
116. Kishen A, Shrestha A, del Carpio-Perochena A. Validation of Biofilm Assays to Assess Antibiofilm Efficacy in Instrumented Root Canals after Syringe Irrigation and Sonic Agitation. *J Endod.* 2018;44(2).
 117. Amato M, Vanoni-Heineken I, Hecker H, Weiger R. Curved versus straight root canals: The benefit of activated irrigation techniques on dentin debris removal. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology.* 2011;
 118. van der Sluis LWM, Vogels MPJM, Verhaagen B, Macedo R, Wesselink PR. Study on the Influence of Refreshment/Activation Cycles and Irrigants on Mechanical Cleaning Efficiency During Ultrasonic Activation of the Irrigant. *J Endod.* 2010;36(4).
 119. Leoni GB, Versiani MA, Silva-Sousa YT, Bruniera JFB, Pécora JD, Sousa-Neto MD. Ex vivo evaluation of four final irrigation protocols on the removal of hard-tissue debris from the mesial root canal system of mandibular first molars. *Int Endod J.* 2017;
 120. Versiani MA, Alves FRF, Andrade-Junior C v., Marceliano-Alves MF, Provenzano JC, Rôças IN, et al. Micro-CT evaluation of the efficacy of hard-tissue removal from the root canal and isthmus area by positive and negative pressure irrigation systems. *Int Endod J.* 2016;49(11).
 121. de Gregorio C, Estevez R, Cisneros R, Paranjpe A, Cohenca N. Efficacy of different irrigation and activation systems on the penetration of sodium hypochlorite into simulated lateral canals and up to working length: An in vitro study. *J Endod.* 2010;36(7).
 122. de Gregorio C, Paranjpe A, Garcia A, Navarrete N, Estevez R, Esplugues EO, et al. Efficacy of irrigation systems on penetration of sodium hypochlorite to working length and to simulated uninstrumented areas in oval shaped root canals. *Int Endod J.* 2012;45(5).
 123. Retsas A, Boutsoukis C. An update on ultrasonic irrigant activation. *Endo EPT.* 2019;13(2).
 124. Muhammad OH, Chevalier M, Rocca JP, Brulat-Bouchard N, Medioni E. Photodynamic therapy versus ultrasonic irrigation: Interaction with endodontic microbial biofilm, an ex vivo study. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2014;11(2).

125. Sabino CP, Garcez AS, Núñez SC, Ribeiro MS, Hamblin MR. Real-time evaluation of two light delivery systems for photodynamic disinfection of *Candida albicans* biofilm in curved root canals. *Lasers Med Sci.* 2015;30(6).
126. Lyon JP, Rezende RR, Rabelo MP, de Lima CJ, Moreira LM. Synergic Effect of Photodynamic Therapy with Methylene Blue and Surfactants in the Inhibition of *Candida albicans*. *Mycopathologia.* 2013;175(1–2).
127. Silva Garcez A, Núñez SC, Lage-Marques JL, Jorge AOC, Ribeiro MS. Efficiency of NaOCl and laser-assisted photosensitization on the reduction of *Enterococcus faecalis* in vitro. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology.* 2006;102(4).
128. de Oliveira BP, Aguiar CM, Câmara AC, de Albuquerque MM, Correia ACR de B, Soares MF de LR. The efficacy of photodynamic therapy and sodium hypochlorite in root canal disinfection by a single-file instrumentation technique. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2015;12(3).
129. Pourhajibagher M, bahador A. Adjunctive antimicrobial photodynamic therapy to conventional chemo-mechanical debridement of infected root canal systems: A systematic review and meta-analysis. Vol. 26, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy.* 2019.
130. Pourhajibagher M, Bahador A. An in vivo evaluation of microbial diversity before and after the photo-activated disinfection in primary endodontic infections: Traditional phenotypic and molecular approaches. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2018;22.
131. Pourhajibagher M, Ghorbanzadeh R, Parker S, Chiniforush N, Bahador A. The evaluation of cultivable microbiota profile in patients with secondary endodontic infection before and after photo-activated disinfection. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2017;18.
132. da Silva CC, Chaves Júnior SP, Pereira GLD, Fontes KBF da C, Antunes LAA, Póvoa HCC, et al. Antimicrobial Photodynamic Therapy Associated with Conventional Endodontic Treatment: A Clinical and Molecular Microbiological Study. *Photochem Photobiol.* 2018;94(2).
133. de Miranda RG, Colombo APV. Clinical and microbiological effectiveness of photodynamic therapy on primary endodontic infections: a 6-month randomized clinical trial. *Clin Oral Investig.* 2018;22(4).

134. Xu Y, Young MJ, Battaglino RA, Morse LR, Fontana CR, Pagonis TC, et al. Endodontic Antimicrobial Photodynamic Therapy: Safety Assessment in Mammalian Cell Cultures. *J Endod*. 2009;35(11).
135. Yildirim C, Karaarslan ES, Ozsevik S, Zer Y, Sari T, Usumez A. Antimicrobial efficiency of photodynamic therapy with different irradiation durations. *Eur J Dent*. 2013;7(4).
136. Rabello DGD, Corazza BJM, Ferreira LL, Santamaria MP, Gomes APM, Martinho FC. Does supplemental photodynamic therapy optimize the disinfection of bacteria and endotoxins in one-visit and two-visit root canal therapy? A randomized clinical trial. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2017;19.
137. Garcez AS, Hamblin MR. Methylene blue and hydrogen peroxide for photodynamic inactivation in root canal - A new protocol for use in endodontics. *Eur Endod J*. 2017;2(1).
138. Shrestha A, Kishen A. The effect of tissue inhibitors on the antibacterial activity of chitosan nanoparticles and photodynamic therapy. *J Endod*. 2012;38(9).
139. Silva EJNL, Carvalho CR, Belladonna FG, Prado MC, Lopes RT, De-Deus G, et al. Micro-CT evaluation of different final irrigation protocols on the removal of hard-tissue debris from isthmus-containing mesial root of mandibular molars. *Clin Oral Investig*. 2019;23(2):681–7.
140. Aveiro E, Chiarelli-Neto VM, de-Jesus-Soares A, Zaia AA, Ferraz CCR, Almeida JFA, et al. Efficacy of reciprocating and ultrasonic activation of 6% sodium hypochlorite in the reduction of microbial content and virulence factors in teeth with primary endodontic infection. *Int Endod J*. 2020;53(5):604–18.
141. DRUTTMAN ACS, STOCK CJR. An in vitro comparison of ultrasonic and conventional methods of irrigant replacement. *Int Endod J*. 1989;22(4).
142. Bronnec F, Bouillaguet S, Machtou P. Ex vivo assessment of irrigant penetration and renewal during the final irrigation regimen. *Int Endod J*. 2010;
143. Macedo RG, Verhaagen B, Wesselink PR, Versluis M, van der Sluis LWM. Influence of refreshment/activation cycles and temperature rise on the reaction rate of sodium hypochlorite with bovine dentine during ultrasonic activated irrigation. *Int Endod J*. 2014;47(2).
144. Carvalho MC, Zuolo ML, Arruda-Vasconcelos R, Marinho ACS, Louzada LM, Francisco PA, et al. Effectiveness of XP-Endo Finisher in the reduction of bacterial load in oval-shaped root canals. *Braz Oral Res*. 2019;33.

145. Siqueira JF, Alves FRF, Almeida BM, MacHado De Oliveira JC, Rôças IN. Ability of chemomechanical preparation with either rotary instruments or self-adjusting file to disinfect oval-shaped root canals. J Endod. 2010;
146. Lin J, Shen Y, Haapasalo M. A comparative study of biofilm removal with hand, rotary nickel-titanium, and self-adjusting file instrumentation using a novel in vitro biofilm model. J Endod. 2013;
147. Martinho FC, Gomes APM, Fernandes AMM, Ferreira NS, Endo MS, Freitas LF, et al. Clinical comparison of the effectiveness of single-file reciprocating systems and rotary systems for removal of endotoxins and cultivable bacteria from primarily infected root canals. J Endod. 2014;

3. DISCUSSÃO AMPLIADA E FUNDAMENTADA

O objetivo da irrigação desenvolvida atualmente é aumentar as taxas de sucesso do tratamento endodôntico, proporcionando uma irrigação eficaz dos canais radiculares, eliminando o máximo possível os microrganismos desta superfície, removendo substâncias tóxicas, esfregaços e detritos(93,94). Por isso, é de fundamental importância a realização de pesquisas sobre técnicas de irrigação que propiciem o maior nível de limpeza.

Uma vez que as infecções endodônticas são de origem multiespécie e organizadas em biofilmes, a geração de biofilmes bacterianos padronizados realistas fora da boca é notoriamente difícil (95). O uso de modelos de monoespécies para avaliar agentes antimicrobianos é considerado uma desvantagem crítica na endodontia, pois as infecções do canal radicular na clínica são polimicrobianas (96–98).

E. faecalis e *C. albicans* foram escolhidos para estes estudos porque foram repetidamente isolados de canais radiculares em casos de insucesso (1,79,80,99). Além disso, esses microrganismos podem penetrar nos túbulos dentinários(79,81) e formam biofilmes, que são mais resistente à desinfecção do canal (82).

S.mutans foi encontrado em alta prevalência em infecções endodônticas assintomáticas e sintomáticas, inclusive em abscessos, mas não foi detectado nos canais radiculares de dentes com polpa vital normal (33)

Um estudo anterior (100) investigou o perfil bacteriano de exsudato purulento de abscessos apicais agudos (AAA) e de canais radiculares de dentes com periodontite apical assintomática (PAA) usando a técnica “checkerboard”, visando

identificar 40 espécies/filótipos bacterianos. Encontraram a presença de espécies de estreptococo em 45% dos AAA e nos canais radiculares de pacientes assintomáticos (~ 33%). Em um estudo mais recente (33), apenas *S. mutans* foi investigado e estavam presentes em 70% dos casos com AAA (70%) e em 60% dos com PAA.

O uso de irrigantes antimicrobianos, como hipoclorito de sódio, são mais eficientes na redução das bactérias viáveis dos canais radiculares(78). No entanto, o objetivo do presente trabalho não foi avaliar o efeito químico, mas sim a eficácia mecânica do irrigante quando administrado usando diferentes pontas de agulha ou métodos adjuvantes durante a irrigação. Assim, a água destilada esterilizada foi usada como irrigante (VINOTHKUMAR et al., 2007).

A irrigação convencional com seringas tem sido defendida como um método eficiente de aplicação de irrigante(76). Foi relatado que vários fatores físicos, como a anatomia do canal radicular (tamanho, curvatura, forma), o diâmetro e a profundidade da colocação da agulha, o desenho da ponta da agulha e a taxa de fluxo do irrigante, podem afetar a eficácia da irrigação e a extrusão do irrigante(9,101–103). Uma melhor compreensão das interações entre esses fatores pode levar a uma maior eficácia da irrigação do canal radicular durante a terapia endodôntica.

O volume de irrigante é conhecido por afetar a limpeza do canal radicular (84,85,103). Em ambos os artigos aqui apresentados, seja para análise das agulhas de irrigação, seja para os métodos adjuvantes ao PQM, utilizou-se o mesmo volume de irrigante entre os grupos testados para que esse fator não interferisse nos resultados.

O canal radicular foi padronizado para ser reto ou com curvatura menor que 20°, com aproximadamente o mesmo comprimento, e a agulha 30G foi usada para irrigação. Isso aumenta a profundidade da agulha em comparação com raízes severamente curvadas(104), e melhora a eficácia das soluções de irrigação(105,106).

O alargamento apical, pelo menos, para o tamanho 30-35 é considerado necessário para atingir o desbridamento e desinfecção do sistema de canais radiculares, pois permite que as agulhas de irrigação 27-30G sejam inseridas mais perto do CT e o irrigante supere os efeitos que limitam sua penetração(11,84,89,107). Em nosso estudo sobre cânulas irrigadoras, o canal foi preparado apicalmente até o tamanho 40, que é o tamanho apical mínimo para facilitar a remoção de debris (83).

Hsieh et al., 2007 (102) investigaram a influência do tamanho e da profundidade de inserção das agulhas irrigadoras e do diâmetro da lima apical mestre na distribuição

do fluxo durante a irrigação em canais radiculares. Todos esses fatores influenciaram para se obter uma irrigação satisfatória de todo o comprimento de trabalho. Nesse estudo, em canais preparados a partir do tamanho 35 e com agulha de calibre 27G inseridas a 3mm do ápice, foi possível observar uma irrigação bem-sucedida ao longo de todo o canal radicular preparado.

Segundo Ruddle et al., 2007 (108), além do formato das arestas laterais dos instrumentos endodônticos, dois fatores adicionais que influenciam a irrigação e seu potencial para limpar um sistema de canais radiculares são a conicidade do preparo e o diâmetro terminal de um canal. Estes podem influenciar o fluxo do irrigante e, portanto, o potencial de limpeza.

Vinothkumar et al. (10) avaliaram a influência de três desenhos de ponta de agulha na remoção de bactérias luminescentes geneticamente modificadas inoculadas em canais radiculares instrumentados, medindo o número de bactérias remanescentes após a irrigação, usando um luminômetro de tubo único. Concluíram que agulhas com terminação fechada com uma única saída lateral são eficientes na remoção mecânica das bactérias dos canais radiculares instrumentados. Embora todas as agulhas funcionem com o mesmo princípio, a Max-I-Probe (agulha com uma saída lateral e extremidade fechada) removeu significativamente mais bactérias quando comparada com a RC-Twents (agulha de extremidade fechada e duas saídas laterais) e a agulha hipodérmica convencional. Esta descoberta está essencialmente de acordo com um estudo anterior, indicando que a abertura lateral exclusiva dessas agulhas com extremidade fechada produz turbulência ascendente que melhora a limpeza completa dos canais radiculares(91).

Boutsioukis et al. 2009 (86) observaram que as agulhas de irrigação devem ser colocadas a 1 mm do CT para garantir a troca de fluidos. O fluxo turbulento do irrigante leva a uma substituição mais eficiente. Assim, em termos de eficiência de reposição, de acordo com os resultados do estudo (86), uma vazão de (0,01-0,26 mL/s) deve ser combinada com a colocação da agulha de irrigação dentro de 1 mm do CT, a fim de obter uma troca de irrigante aceitável.

Em outro estudo, Boutsioukis et al., (88) observaram que a substituição do irrigante estendeu-se além de 2 mm apicalmente em agulhas com extremidade aberta, ao passo que foi limitada em 1 a 1,5 mm apicalmente em agulhas com extremidade fechada. As agulhas abertas criaram um jato em direção ao ápice e reposição máxima de irrigante. Dentro deste grupo, a agulha com duas saídas laterais parecia menos

eficiente em termos de substituição de irrigante do que com apenas uma saída lateral ou múltiplas saídas laterais. Dentro do grupo de extremidade fechada, a agulha com ventilação lateral e a agulha com dupla ventilação lateral criaram uma série de vórtices e uma substituição de irrigante menos eficiente; a agulha com ventilação lateral foi um pouco mais eficiente dentre as agulhas de extremidade fechada. O padrão de fluxo das agulhas fechadas era diferente em comparação com as agulhas abertas. O fluxo foi mais direcionado para a parede do canal radicular no lugar do ápice(88).

Tem sido sugerido que a agulha com abertura lateral é mais eficiente do que as biseladas e entalhadas na remoção de corante (91) ou bactérias bioluminescentes (10). Esses estudos avaliaram principalmente a capacidade de cada agulha de trocar o irrigante no canal radicular, em vez de separar detritos ou microrganismos da parede, porque tanto as partículas de corante quanto as bactérias bioluminescentes estavam em suspensão.

A entrega dos irrigantes usando uma seringa e agulha e a ativação por uma lima ultrassônica são os métodos de irrigação mais populares. Não há evidências de que qualquer método de irrigação adjuvante, incluindo a ativação ultrassônica, possa melhorar o resultado a longo prazo do tratamento do canal radicular além do que pode ser alcançado pela instrumentação e irrigação com seringa (109)

Em um estudo de Mayer et al., (93) foi feita uma avaliação da eficácia da remoção de esfregaço e resíduos de debris nos canais radiculares com PUI e IC. Nenhuma diferença significativa foi determinada entre as duas técnicas de irrigação.

Şahbaz et al., (77) observaram que uma melhor limpeza do terço coronal foi alcançada através da PUI, em comparação com irrigação convencional, enquanto que no terço médio observou-se uma melhor limpeza dos debris com a IC.

Vários estudos *ex vivo* (110–113) e um ensaio clínico(67) não encontraram nenhuma diferença significativa entre a irrigação com seringa e uma variedade de outros métodos, incluindo irrigação por pressão negativa, ativação sônica e ultrassônica, em relação à remoção de restos de tecidos moles, detritos de tecidos duros, bactérias ou biofilme do canal radicular principal ou da cicatrização de periodontite apical em dentes com um único canal/raiz e anatomia relativamente simples(111–115). Em contraste, estudos que chegaram à conclusão oposta, geralmente, não alargaram os canais para um tamanho adequado ou colocaram as agulhas muito longe do CT(84,110,116). Portanto, a irrigação com seringa parece ser um método de irrigação suficiente para dentes com um único canal radicular e

anatomia simples. No entanto, o fluxo desenvolvido não pode penetrar muito longe dentro de irregularidades anatômicas, como sulcos (38,117,118), istmos (39,55,111,119,120) e canais laterais (121,122), de modo que os métodos de ativação do irrigante podem ser úteis em casos com anatomia mais complexa.

Nakamura et al., (67) em um estudo clínico randomizado, compararam a eficácia da ativação ultrassônica com a irrigação não ativada na remoção de bactérias e endotoxinas dos canais radiculares. Segundo esse estudo, a ativação ultrassônica foi mais eficaz do que a irrigação não ativada para reduzir o número de bactérias, mas não os níveis de endotoxinas nos canais radiculares de dentes com periodontite apical.

A eficácia da ativação ultrassônica parece ter sido superestimada nos primeiros estudos *in vitro* e *ex vivo* (VAN DER SLUIS et al., 2006), o que provavelmente contribuiu para sua adoção prematura por grande parte dos endodontistas e cirurgiões-dentistas. As evidências atuais indicam que ela é claramente mais eficaz do que a irrigação com seringa, no que diz respeito ao desbridamento de extensões ovais não instrumentadas, istmos e canais laterais, mas há informações muito limitadas sobre seu efeito antimicrobiano nessas áreas e nenhum ensaio clínico encontrou ainda qualquer melhora no resultado do tratamento a longo prazo (123).

Van der sluis et al., (118) observaram um melhor desempenho da irrigação ativada por ultrassom com 3 ciclos. O irrigante combinado com o método de lavagem intermitente produz um efeito cumulativo ao longo de 3 ciclos de renovação/ativação.

Em nosso estudo, observamos que a ativação ultrassônica proporcionou uma maior descontaminação dos túbulos dentinários em relação a irrigação convencional. Esses resultados corroboram com os achados de outros estudos (67,76,111)

Diferentes técnicas foram desenvolvidas para melhorar a desinfecção do canal radicular. Dentre essas técnicas, a aPDT tem ganhado atenção especial, pois pode melhorar a taxa de sucesso. Pode ser aplicada como complemento ao tratamento químico-mecânico (46).

Muhammad et al., (MUHAMMAD et al., 2014) avaliaram a capacidade de dois protocolos de aPDT diferentes em interromper o crescimento do biofilme microbiano no espaço do canal radicular, comparando sua eficiência com a PUI, usando soluções de EDTA 17% e NaOCl 2,6%. A irrigação ultrassônica apresentou os melhores resultados para romper os biofilmes microbianos ($P < 0,0001$). Nas condições deste estudo, PUI usando EDTA e as soluções de NaOCl mostraram-se eficazes para

eliminar um biofilme de sete dias criado *in vitro*. A aPDT não foi eficaz para este fim. A terapia fotodinâmica usando uma luz não colimada e uma concentração otimizada de agente fotossensibilizante pode ter um papel na ruptura do biofilme e na diminuição da carga bacteriana do biofilme microbiano intacto, porém estes efeitos foram estatisticamente inferiores aos obtidos pela PUI.

Em relação ao efeito da aPDT em *C. albicans*, alguns estudos indicam que a aPDT é uma nova alternativa promissora para o tratamento de candidíase oral, ou mesmo infecções endodônticas (125,126), no entanto, a eficácia antimicrobiana variável foi relatada (127). Dois estudos *ex vivo* mostraram uma redução significativa no número de *C. albicans* após o tratamento, mas não houve eliminação completa do microrganismo(128).

Uma revisão sistemática e meta-análise (129) mostrou que, embora os parâmetros de aPDT possam variar de um estudo para outro, todos os estudos clínicos randomizados encontraram uma redução na carga microbiana com o uso adjuvante de aPDT. Portanto, o uso de aPDT adjuvante ao desbridamento químico-mecânico convencional do sistema de canais radiculares infectados oferece benefícios adicionais.

Estudos *in vivo* (130,131) observaram que a aPDT provocou uma redução substancial na diversidade e contagem microbiana, de infecções primária e secundária.

Silva et al., (132) realizaram um estudo microbiológico clínico e molecular em que a aPDT foi utilizada como adjuvante ao tratamento endodôntico. Os dentes foram submetidos a preparo químico-mecânico, seguido de aPDT, resultando em uma redução significativa na incidência de *E. faecalis* antes da obturação do canal radicular em dentes com infecções endodônticas primárias.

Miranda et al., (133) avaliaram a cicatrização de dentes com lesões apicais após tratamento convencional e com o uso de aPDT. Esses autores observaram que, em termos de evolução clínica, todos os dentes de ambos os grupos apresentaram redução no tamanho das lesões ao longo do tempo. No entanto, na avaliação radiográfica final (6 meses de acompanhamento), os dentes do grupo aPDT apresentaram escores significativamente mais baixos do que os dentes tratados apenas com terapia convencional.

O aPDT tem duas grandes vantagens em comparação com os agentes químicos convencionais de irrigação do canal radicular. Em primeiro lugar, a atividade

microbiocida do aPDT está confinada a áreas que foram tratadas por fotossensibilizador e luz com comprimento de onda específico, sem danificar os tecidos do hospedeiro e perturbando a microbiota normal em outras regiões que não as áreas infectadas. Em segundo lugar, o desenvolvimento de resistência ao aPDT é improvável devido ao seu modo de ação multialvo.

Além disso, diferentemente dos antibióticos, que possuem microrganismos alvos específicos, o oxigênio reativo derivado de uma reação fotodinâmica possui um mecanismo de ação inespecífico, evitando o desenvolvimento de resistência microbiana (49). Outro ponto positivo é que o aPDT não exerce efeitos citotóxicos significativos para a célula do hospedeiro (134).

Para obter os melhores resultados, existem alguns fatores que devem ser levados em consideração, como a concentração do FS, comprimento de onda do laser, potência de saída, tempo de irradiação, tempo de incubação e o tipo de ponteiros utilizados (por exemplo, pontas planas ou difusor) (46,130)

Yildirim et al., (YILDIRIM et al., 2013), avaliando os efeitos de diferentes durações de exposição à luz na redução de *E. faecalis*, concluíram que a irradiação por 1 minuto é adequada para alcançar o efeito antimicrobiano.

De acordo com a revisão sistemática (POURHAJIBAGHER; BAHADOR, 2019), pode-se observar que os estudos que adotaram azul de metileno como fotossensibilizador indicaram que o uso adjuvante de aPDT ao procedimento químico-mecânico poderia trazer benefícios adicionais, quando comparado ao procedimento químico-mecânico sozinho, em termos de redução da carga microbiana.

No que diz respeito ao próprio fotossensibilizador, as fenotiazinas e os xantenos são os mais comumente testados quanto à eficácia antibacteriana. Selecionamos o azul de metileno (AM), que se enquadra na categoria de fenotiazinas catiônicas e é eficaz contra diferentes bactérias endodônticas como *Enterococcus* ssp. e cepas resistentes a drogas (RABELLO et al., 2017). O elevado efeito antibacteriano do AM é atribuído à sua hidrofiliidade, baixo peso molecular, cationicidade e alta produção de oxigênio singleto(52,126,137). Shrestha & Kishen (138) relataram que a produção de oxigênio singleto é menos prejudicada pelos restos pulpares, dentina e lipopolissacarídeos (LPS) presentes nos canais radiculares ao usar AM do que outro fotossensibilizador(52,137).

Garcez et al., (137) testaram a concentração de fotossensibilizador e avaliaram o fenômeno de blindagem óptica e irradiação de energia mínima para otimizar a aPDT

para sugerir um protocolo para tratamento clínico. A produção de ROS foi inversamente proporcional à concentração de AM. A blindagem óptica limitou a penetração da luz em altas concentrações de AM. Uma concentração de AM de cerca de 0,05 por 1 min e irradiação de energia em torno de 10 J, com uso de um laser de baixa potência emitindo a 660 nm (o que significa cerca de 2 a 4 min de irradiação usando equipamentos com potência de 40 a 100 mW), preferencialmente acoplado a uma fonte óptica fibra ou difusor, parece ser um protocolo eficaz para aPDT endodôntica.

No presente trabalho, embora a aPDT tenha desempenhado algum efeito antimicrobiano, seguindo os protocolos descritos existentes na literatura, seu efeito foi comparável ao grupo controle de irrigação convencional e menor do que aquele obtido com a PUI e o XP Endo Finisher.

Duque et al., (74) avaliaram a limpeza do canal e do istmo realizada por diferentes sistemas de agitação do irrigante (Easy Clean em rotação contínua e movimento reciprocante, ultrassom, Endoactivador e irrigação convencional). Ao final das 3 etapas de agitação, observou-se diferença estatística apenas em 2 mm, onde o sistema Easy Clean em rotação contínua foi mais eficiente que a irrigação convencional ($P < 0,05$). Easy Clean em rotação contínua, Easy Clean em movimento reciprocante, o Endoactivador e PUI não apresentaram diferenças estatísticas ao final de cada procedimento ($P > 0,05$). Os resultados de limpeza do canal obtidos após os procedimentos mostraram que a capacidade de remoção de detritos foi semelhante para todos os sistemas, exceto na porção de 2 mm (ápice), onde o Easy Clean em rotação contínua foi mais eficiente que a irrigação convencional ($P < 0,05$). O Easy Clean em movimento recíproco não apresentou diferença estatisticamente significativa com os demais grupos estudados, ao contrário da situação observada recentemente por Kato et al., (KATO et al., 2016), em que o Easy Clean foi mais eficiente que o PUI. Isso pode ter ocorrido devido ao tipo de análise realizada. Apesar de Kato et al., (KATO et al., 2016) analisarem a limpeza de irregularidades em paredes curvas do canal radicular, neste estudo foi analisada apenas a limpeza no canal principal sem curvatura. É importante observar que a porcentagem de debris de dentina remanescentes no canal após 3 passos de agitação foi significativamente menor no istmo, corroborando os resultados obtidos por Adcock et al., (111). Esses resultados corroboram os achados de Van der Sluis et al., (118), que encontraram a necessidade de 3 passos de agitação com duração de 20 segundos, com renovação

da solução irrigante, para obter uma melhor limpeza tanto do canal quanto do istmo, indicando a presença de um efeito cumulativo. Duque et al., (DUQUE et al., 2017) concluíram que os métodos com agitação da solução irrigadora promoveram melhor limpeza do canal e do istmo, principalmente com o sistema Easy Clean utilizado em rotação contínua e em baixa velocidade. É necessário realizar 3 passos de agitação de 20 segundos cada para garantir uma melhor limpeza do canal e do istmo.

Silva et al., (139) compararam quatro protocolos finais de irrigação: PUI, EndoVac, Self Adjusting File (SAF) e Easy Clean na remoção de detritos de tecido duro acumulados de canais mesiais de molares inferiores por meio de microtomografia computadorizada (micro-CT). Todos os protocolos finais de irrigação mostraram a mesma eficácia na remoção de debris.

Aveiro et al., (140) avaliaram em um ensaio clínico a eficácia da ativação recíproca com o instrumento Easy Clean e ultrassônica de 6% de hipoclorito de sódio (NaOCl) na redução da carga microbiana, bem como nos níveis de lipopolissacarídeo (LPS) e ácido lipoteicoico (LTA) em dentes com infecções endodônticas primárias e concluíram que a ativação de 6% NaOCl reduziu os níveis de LPS e LTA sem diferenças entre os grupos. No entanto, a ativação ultrassônica foi associada a uma maior redução na carga microbiana dentro dos canais radiculares.

Bao et al., (59) usaram um modelo de biofilme multiespécies usando dentes uniradiculares com um sulco artificial padronizado no terço apical do canal radicular para investigar a eficácia de 3 diferentes técnicas de irrigação. Dentro da ranhura, o XPF reduziu significativamente mais o biofilme (97,06% e 98,96%) do que PUI (94% e 94,28%) e IC (73% e 73,19%), o que indica que a XPF tem excelente potencial para eliminar as bactérias do biofilme de áreas de difícil acesso. Os 2 grupos XPF apresentaram a melhor eficácia de remoção de biofilme tanto dentro quanto fora do sulco, seguido pelos 2 grupos PUI. O grupo XPF usando o protocolo de 3 etapas apresentou melhor eficiência antibiofilme que o grupo XPF com irrigação contínua dentro do sulco ($P < 0,05$). O XP-endo Finisher, como técnica de agitação de irrigação, pode ajudar a remover o biofilme de áreas de difícil acesso no sistema de canais radiculares e o protocolo de irrigação em 3 etapas foi mais eficaz do que irrigação contínua quando XPF foi usado. Este resultado corrobora o achado de Druttman e Stock (141), que notaram que a eficácia da substituição do irrigante foi aumentada quando o número de ciclos de irrigação aumentou, envolvendo agitação alternada do canal usando uma lima manual e irrigação com seringa. O possível motivo pode ser a

mistura frequente do líquido no canal, a qual melhorou a renovação (141,142). Isso significa que a solução de irrigação contendo muitos detritos e material de biofilme (por exemplo, solto pela agitação do XPF) é trazida para fora e o irrigante fresco tem uma maior capacidade de continuar a limpeza, dissolvendo e destacando biofilme. Assim, após 3 ciclos, um efeito cumulativo foi alcançado. Além disso, Macedo et al., (143) encontraram que 3 ciclos consecutivos de renovação/ativação ultrassônica de NaOCl poderia produzir um aumento cumulativo na taxa de reação do NaOCl.

Azim et al., (AZIM et al., 2016) compararam a capacidade de remoção bacteriana de canais radiculares, particularmente de túbulos dentinários, através de 4 sistemas de irrigação diferentes: (1) IC, (2) agitação sonora com EndoActivator, (3) XPF ou (4) Transmissão fotoacústica induzida por fótons (PIPS). Corroborando com nossos achados, a XP Endo teve a maior redução bacteriana em comparação com outras 3 técnicas ($P < 0,05$). A análise do MCVL mostrou que o XP Endo teve o maior nível de bactérias mortas.

Carvalho et al., (144) investigaram a eficácia do XPF, associado às limas XP-Endo Shaper ou Reciproc Blue na redução da carga bacteriana em canais radiculares ovais durante o preparo químico-mecânico (usando solução salina 0,9% (NaCl) ou hipoclorito de sódio 2,5% (NaOCl), e concluíram que o XPF foi usado com sucesso para reduzir a contagem de unidades formadoras de colônias de *E. faecalis*.

Os métodos mais comumente usados para avaliar a eficácia da irrigação são microscopia eletrônica de varredura, microscopia óptica, análise seccional do canal radicular, análise microbiológica e, mais recentemente, a microscopia confocal de varredura a laser(22,61,93,94,110,139,145–147).

Nos artigos apresentados, a análise microbiológica foi realizada pelo método de cultura microbiológica avaliando a quantidade de unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL). No entanto, este método tem algumas limitações, porque apenas os microrganismos que estão no canal radicular principal podem ser detectados usando pontas de papel. Em nosso estudo, acrescentou-se a essa análise a observação da viabilidade microbiana em profundidade dos túbulos dentinários que podem ser medidas por microscopia confocal a laser.

4. CONCLUSÃO

Os autores concluíram que:

- A descontaminação intratubular de biofilme multiespécie foi mais bem realizada pelas agulhas de irrigação de extremidade aberta e de extremidade fechada com duas aberturas laterais.
- A descontaminação intratubular do biofilme misto foi melhor realizada pelos instrumentos XP-Endo Finisher e PUI.
- Não houve diferença significativa entre a descontaminação alcançada com a utilização de irrigação convencional, terapia fotodinâmica e Easy Clean.

REFERÊNCIAS

1. Siqueira JF, Rôças IN. Clinical Implications and Microbiology of Bacterial Persistence after Treatment Procedures. *Journal of Endodontics*. 2008.
2. Schilder H. Cleaning and shaping the root canal. *Dent Clin North Am*. 1974;18(2).
3. Ove A. Peters, PD Dr med dent MF. Current Challenges and Concepts in the Preparation of Root Canal Systems: A Review. *J Endod*. 2004;30(8).
4. Peters OA, Laib A, Göhring TN, Barbakow F. Changes in root canal geometry after preparation assessed by high-resolution computed tomography. *J Endod*. 2001;27(1).
5. Gulabivala K, Patel B, Evans G, Ng YL. Effects of mechanical and chemical procedures on root canal surfaces. *Endod Topics*. 2005;10(1).
6. Nguy D, Sedgley C. The Influence of Canal Curvature on the Mechanical Efficacy of Root Canal Irrigation In Vitro Using Real-Time Imaging of Bioluminescent Bacteria. *J Endod*. 2006;32(11).
7. Khademi A, Yazdizadeh M, Feizianfard M. Determination of the Minimum Instrumentation Size for Penetration of Irrigants to the Apical Third of Root Canal Systems. *J Endod*. 2006;32(5).
8. Lee SJ, Wu MK, Wesselink PR. The effectiveness of syringe irrigation and ultrasonics to remove debris from simulated irregularities within prepared root canal walls. *Int Endod J*. 2004;37(10).
9. Boutsoukakis C, Lambrianidis T, Kastrinakis E, Bekiaroglou P. Measurement of pressure and flow rates during irrigation of a root canal ex vivo with three endodontic needles. *Int Endod J*. 2007;40(7).

10. Vinothkumar TS, Kavitha S, Lakshminarayanan L, Gomathi NS, Kumar V. Influence of Irrigating Needle-Tip Designs in Removing Bacteria Inoculated Into Instrumented Root Canals Measured Using Single-Tube Luminometer. *J Endod.* 2007;33(6).
11. Falk KW, Sedgley CM. The influence of preparation size on the mechanical efficacy of root canal irrigation in vitro. *J Endod.* 2005;31(10).
12. Usman N, Baumgartner JC, Marshall JG. Influence of instrument size on root canal debridement. *J Endod.* 2004;30(2).
13. van der Sluis LWM, Versluis M, Wu MK, Wesselink PR. Passive ultrasonic irrigation of the root canal: A review of the literature. *International Endodontic Journal.* 2007.
14. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. Vol. 284, *Science.* 1999.
15. Neelakantan P, Romero M, Vera J, Daood U, Khan AU, Yan A, et al. Biofilms in Endodontics—Current status and future directions. Vol. 18, *International Journal of Molecular Sciences.* 2017.
16. de Paz LC. Redefining the Persistent Infection in Root Canals: Possible Role of Biofilm Communities. *J Endod.* 2007;33(6).
17. Ricucci D, Siqueira JF. Biofilms and apical periodontitis: Study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. *J Endod.* 2010;36(8).
18. Dumani A, Yoldas O, Yilmaz S, Koksall F, Kayar B, Akcimen B, et al. Polymerase chain reaction of enterococcus faecalis and candida albicans in apical periodontitis from turkish patients. *J Clin Exp Dent.* 2012;
19. Poptani B, Sharaff M, Archana G, Parekh V. Detection of Enterococcus faecalis and Candida albicans in previously root-filled teeth in a population of Gujarat with polymerase chain reaction. *Contemp Clin Dent.* 2013;
20. Murad CF, Sassone LM, Faveri M, Hirata R, Figueiredo L, Feres M. Microbial diversity in persistent root canal infections investigated by checkerboard DNA-DNA hybridization. *J Endod.* 2014;
21. Tennert C, Fuhrmann M, Wittmer A, Karygianni L, Altenburger MJ, Pelz K, et al. New bacterial composition in primary and persistent/secondary endodontic infections with respect to clinical and radiographic findings. *J Endod.* 2014;

22. Al-Nazhan S, Al-Sulaiman A, Al-Rasheed F, Alnajjar F, Al-Abdulwahab B, Al-Badah A. Microorganism penetration in dentinal tubules of instrumented and retreated root canal walls. In vitro SEM study . Restor Dent Endod. 2014;
23. Zhang C, Du J, Peng Z. Correlation between *Enterococcus faecalis* and Persistent Intraradicular Infection Compared with Primary Intraradicular Infection: A Systematic Review. Journal of Endodontics. 2015.
24. Arias CA, Murray BE. The rise of the *Enterococcus*: Beyond vancomycin resistance. Nature Reviews Microbiology. 2012.
25. Siqueira JF, Sen BH. Fungi in endodontic infections. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2004;
26. Vaghela D, Venkateshbabu N, Arathi G, Kandaswamy D, Jamini N. Disinfection of dentinal tubules with two different formulations of calcium hydroxide as compared to 2% chlorhexidine: As intracanal medicaments against *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*: An in vitro study. Journal of Conservative Dentistry. 2011;
27. Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. In vitro growth and analysis of candida biofilms. Nat Protoc. 2008;
28. Calzavara-Pinton P, Rossi MT, Sala R, Venturini M. Photodynamic antifungal chemotherapy. Photochemistry and Photobiology. 2012.
29. Kim SL, Gordon SM, Shrestha NK. Distribution of streptococcal groups causing infective endocarditis: a descriptive study. Diagn Microbiol Infect Dis. 2018;91(3).
30. Nakano K, Nemoto H, Nomura R, Inaba H, Yoshioka H, Taniguchi K, et al. Detection of oral bacteria in cardiovascular specimens. Oral Microbiol Immunol. 2009;24(1).
31. Baker JL, Faustoferri RC, Quivey RG. Acid-adaptive mechanisms of *Streptococcus mutans*—the more we know, the more we don't. Vol. 32, Molecular Oral Microbiology. 2017.
32. Nomura R, Ogaya Y, Nakano K. Contribution of the collagen-binding proteins of *Streptococcus mutans* to bacterial colonization of inflamed dental pulp. PLoS One. 2016;11(7).
33. Lima AR, Herrera DR, Francisco PA, Pereira AC, Lemos J, Abranches J, et al. Detection of *Streptococcus mutans* in symptomatic and asymptomatic infected root canals. Clin Oral Investig. 2021;25(6).

34. Nair PNR, Henry S, Cano V, Vera J. Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after “one-visit” endodontic treatment. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*. 2005;99(2).
35. Dutner J, Mines P, Anderson A. Irrigation trends among american association of endodontists members: A web-based survey. *J Endod*. 2012;38(1).
36. Willershausen I, Wolf TG, Schmidtman I, Berger C, Ehlers V, Willershausen B, et al. Survey of root canal irrigating solutions used in dental practices within Germany. *Int Endod J*. 2015;48(7).
37. Boutsoukakis C, van der Sluis LWM. Syringe Irrigation: Blending Endodontics and Fluid Dynamics. *Em: Endodontic Irrigation*. 2015.
38. Jiang LM, Lak B, Eijssvogels LM, Wesselink P, van der Sluis LWM. Comparison of the cleaning efficacy of different final irrigation techniques. *J Endod*. 2012;38(6).
39. Paqué F, Boessler C, Zehnder M. Accumulated hard tissue debris levels in mesial roots of mandibular molars after sequential irrigation steps. *Int Endod J*. 2011;44(2).
40. Kawashima N, Wadachi R, Suda H, Yeng T, Parashos P. Root canal medicaments. *Int Dent J*. 2009;59(1).
41. Huang Z. A review of progress in clinical photodynamic therapy. *Technology in Cancer Research and Treatment*. 2005.
42. Garcez AS, Nuñez SC, Hamblin MR, Suzuki H, Ribeiro MS. Photodynamic therapy associated with conventional endodontic treatment in patients with antibiotic-resistant microflora: A preliminary report. *J Endod*. 2010;
43. Garcez AS, Ribeiro MS, Tegós GP, Núñez SC, Jorge AOC, Hamblin MR. Antimicrobial photodynamic therapy combined with conventional endodontic treatment to eliminate root canal biofilm infection. *Lasers Surg Med*. 2007;
44. George S, Kishen A. Influence of photosensitizer solvent on the mechanisms of photoactivated killing of *Enterococcus faecalis*. *Photochem Photobiol*. 2008;
45. Ng R, Singh F, Papamanou DA, Song X, Patel C, Holewa C, et al. Endodontic photodynamic therapy ex vivo. *J Endod*. 2011;
46. Chiniforush N, Pourhajibagher M, Shahabi S, Kosarieh E, Bahador A. Can antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) enhance the endodontic treatment? *Journal of Lasers in Medical Sciences*. 2016.

47. Costa ACBP, De Campos Rasteiro VM, Pereira CA, Da Silva Hashimoto ESH, Beltrame M, Junqueira JC, et al. Susceptibility of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to erythrosine- and LED-mediated photodynamic therapy. *Arch Oral Biol.* 2011;
48. Chui C, Aoki A, Takeuchi Y, Sasaki Y, Hiratsuka K, Abiko Y, et al. Antimicrobial effect of photodynamic therapy using high-power blue light-emitting diode and red-dye agent on *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontal Res.* 2013;
49. Konopka K, Goslinski T. Photodynamic therapy in dentistry. *Journal of Dental Research.* 2007.
50. Oda DF, Duarte MAH, Andrade FB, Moriyama LT, Bagnato VS, de Moraes IG. Antimicrobial action of photodynamic therapy in root canals using LED curing light, curcumin and carbopol gel. *Int Endod J.* 2019;
51. Paschoal MA, Tonon CC, Spolidório DMP, Bagnato VS, Giusti JSM, Santos-Pinto L. Photodynamic potential of curcumin and blue LED against *Streptococcus mutans* in a planktonic culture. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2013;
52. Lim EJ, Oak CH, Heo J, Kim YH. Methylene blue-mediated photodynamic therapy enhances apoptosis in lung cancer cells. *Oncol Rep.* 2013;
53. Hamblin MR, Hasan T. Photodynamic therapy: A new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochemical and Photobiological Sciences.* 2004.
54. St. Denis TG, Dai T, Izikson L, Astrakas C, Anderson RR, Hamblin MR, et al. All you need is light, antimicrobial photoinactivation as an evolving and emerging discovery strategy against infectious disease. *Virulence.* 2011.
55. Burleson A, Nusstein J, Reader A, Beck M. The In Vivo Evaluation of Hand/Rotary/Ultrasound Instrumentation in Necrotic, Human Mandibular Molars. *J Endod.* 2007;
56. Spoleti P, Siragusa M, Spoleti MJ. Bacteriological evaluation of passive ultrasonic activation. *J Endod.* 2003;
57. Castelo-Baz P, Martín-Biedma B, Cantatore G, Ruíz-Piñón M, Bahillo J, Rivas-Mundiña B, et al. In vitro comparison of passive and continuous ultrasonic irrigation in simulated lateral canals of extracted teeth. *J Endod.* 2012;
58. Haapasalo M, Wang Z, Shen Y, Curtis A, Patel P, Khakpour M. Tissue dissolution by a novel Multisonic Ultracleaning system and sodium hypochlorite. *J Endod.* 2014;

59. Bao P, Shen Y, Lin J, Haapasalo M. In Vitro Efficacy of XP-endo Finisher with 2 Different Protocols on Biofilm Removal from Apical Root Canals. *J Endod.* 2017;
60. Elnaghy AM, Mandorah A, Elsaka SE. Effectiveness of XP-endo Finisher, EndoActivator, and File agitation on debris and smear layer removal in curved root canals: a comparative study. *Odontology.* 2017;
61. Alves FRF, Marceliano-Alves MF, Sousa JCN, Silveira SB, Provenzano JC, Siqueira JF. Removal of root canal fillings in curved canals using either reciprocating single- or rotary multi-instrument systems and a supplementary step with the XP-Endo Finisher. *J Endod.* 2016;
62. FKG SWISS ENDO. Xp-Endo finisher. Disponível em: <https://www.fkg.ch/sites/default/files201610_fkg_xp_endo_finisher_brochure_v2_pt_web_0.pdf>. 2018.
63. Kato AS, Cunha RS, da Silveira Bueno CE, Pelegriane RA, Fontana CE, de Martin AS. Investigation of the efficacy of passive ultrasonic irrigation versus irrigation with reciprocating activation: An environmental scanning electron microscopic study. *J Endod.* 2016;
64. Simezo AP, da Silveira Bueno CE, Cunha RS, Pelegriane RA, Rocha DGP, de Martin AS, et al. Comparative Analysis of Dentinal Erosion after Passive Ultrasonic Irrigation versus Irrigation with Reciprocating Activation: An Environmental Scanning Electron Study. *J Endod.* 2017;
65. Pereira TC, da Silva Munhoz Vasconcelos LR, Graeff MSZ, Ribeiro MCM, Duarte MAH, de Andrade FB. Intratubular decontamination ability and physicochemical properties of calcium hydroxide pastes. *Clin Oral Investig.* 2019;23(3).
66. Nakamura VC, Cai S, Candeiro GTM, Ferrari PH, Caldeira CL, Gavini G. Ex vivo evaluation of the effects of several root canal preparation techniques and irrigation regimens on a mixed microbial infection. *Int Endod J.* 2013;
67. Nakamura VC, Pinheiro ET, Prado LC, Silveira AC, Carvalho APL, Mayer MPA, et al. Effect of ultrasonic activation on the reduction of bacteria and endotoxins in root canals: a randomized clinical trial. *Int Endod J.* 2018;51.
68. Fimple JL, Fontana CR, Foschi F, Ruggiero K, Song X, Pagonis TC, et al. Photodynamic Treatment of Endodontic Polymicrobial Infection In Vitro. *J Endod.* 2008;34(6).

69. Garcez AS, Arantes-Neto JG, Sellera DP, Fregnani ER. Effects of antimicrobial photodynamic therapy and surgical endodontic treatment on the bacterial load reduction and periapical lesion healing. Three years follow up. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2015;12(4).
70. Garcez AS, Fregnani ER, Rodriguez HM, Nunez SC, Sabino CP, Suzuki H, et al. The use of optical fiber in endodontic photodynamic therapy. Is it really relevant? *Lasers Med Sci.* 2013;28(1).
71. Boutsoukakis C, Kastrinakis E, Lambrianidis T, Verhaagen B, Versluis M, van der Sluis LWM. Formation and removal of apical vapor lock during syringe irrigation: A combined experimental and Computational Fluid Dynamics approach. *Int Endod J.* 2014;47(2).
72. Kato AS, Cunha RS, da Silveira Bueno CE, Pelegriane RA, Fontana CE, de Martin AS. Investigation of the efficacy of passive ultrasonic irrigation versus irrigation with reciprocating activation: An environmental scanning electron microscopic study. *J Endod* [Internet]. 2016;42(4):659–63. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2016.01.016>
73. Pedrinha VF CCMVEE. Impact of irrigation protocols with some chelators and mechanical agitation on intratubular decontamination. *Braz Oral Res.* 2021;35.
74. Duque JA, Duarte MAH, Canali LCF, Zancan RF, Vivan RR, Bernardes RA, et al. Comparative Effectiveness of New Mechanical Irrigant Agitating Devices for Debris Removal from the Canal and Isthmus of Mesial Roots of Mandibular Molars. *J Endod.* 2017;
75. de Andrade FB, Arias MPC, Maliza AGA, Duarte MAH, Graeff MSZ, Amoroso-Silva PA, et al. A new improved protocol for in vitro intratubular dentinal bacterial contamination for antimicrobial endodontic tests: Standardization and validation by confocal laser scanning microscopy. *Journal of Applied Oral Science.* 2015;23(6).
76. van der Sluis LWM, Gambarini G, Wu MK, Wesselink PR. The influence of volume, type of irrigant and flushing method on removing artificially placed dentine debris from the apical root canal during passive ultrasonic irrigation. *Int Endod J.* 2006;39(6).
77. Şahbaz C, Adigüzel Ö. An evaluation of the efficiency of different irrigation systems on the smear layer. *Journal of International Dental and Medical Research.* 2014;7(1).

78. Byström A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the effect of 0.5 percent sodium hypochlorite in endodontic therapy. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*. 1983;55(3).
79. Haapasalo M, Ørstavik D. In vitro Infection and Disinfection of Dentinal Tubules. *J Dent Res*. 1987;66(8).
80. Pinheiro ET, Gomes BPFA, Ferraz CCR, Sousa ELR, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J*. 2003;36(1).
81. Love RM. *Enterococcus faecalis* - A mechanism for its role in endodontic failure. *Int Endod J*. 2001;34(5).
82. Distel JW, Hatton JF, Gillespie MJ. Biofilm formation in medicated root canals. *J Endod*. 2002;28(10).
83. Khan S, Niu LN, Eid AA, Looney SW, Didato A, Roberts S, et al. Periapical pressures developed by nonbinding irrigation needles at various irrigation delivery rates. *J Endod*. 2013;39(4).
84. Huang TY, Gulabivala K, Ng YL. A bio-molecular film ex-vivo model to evaluate the influence of canal dimensions and irrigation variables on the efficacy of irrigation. *Int Endod J*. 2008;41(1).
85. Sedgley C, Applegate B, Nagel A, Hall D. Real-time imaging and quantification of bioluminescent bacteria in root canals in vitro. *J Endod*. 2004;30(12).
86. Boutsoukakis C, Lambrianidis T, Kastrinakis E. Irrigant flow within a prepared root canal using various flow rates: A Computational Fluid Dynamics study. *Int Endod J*. 2009;42(2).
87. Boutsoukakis C, Verhaagen B, Versluis M, Kastrinakis E, van der Sluis LWM. Irrigant flow in the root canal: Experimental validation of an unsteady Computational Fluid Dynamics model using high-speed imaging. *Int Endod J*. 2010;43(5).
88. Boutsoukakis C, Verhaagen B, Versluis M, Kastrinakis E, Wesselink PR, van der Sluis LWM. Evaluation of Irrigant Flow in the Root Canal Using Different Needle Types by an Unsteady Computational Fluid Dynamics Model. *J Endod*. 2010;36(5).
89. Boutsoukakis C, Lambrianidis T, Verhaagen B, Versluis M, Kastrinakis E, Wesselink PR, et al. The effect of needle-insertion depth on the irrigant flow in

- the root canal: Evaluation using an unsteady computational fluid dynamics model. *J Endod*. 2010;36(10).
90. Chen JE, Nurbakhsh B, Layton G, Bussmann M, Kishen A. Irrigation dynamics associated with positive pressure, apical negative pressure and passive ultrasonic irrigations: A computational fluid dynamics analysis. *Australian Endodontic Journal*. 2014;40(2).
 91. Kahn F, Rosenberg P, Gliksberg J. An in vitro evaluation of the irrigating characteristics of ultrasonic and subsonic handpieces and irrigating needles and probes. *J Endod*. 1º de maio de 1995;21(5):277–80.
 92. Boutsoukakis C, Lambrianidis T, Vasiliadis L. Clinical relevance of standardization of endodontic irrigation needle dimensions according to the ISO 9626:1991 and 9626:1991/Amd 1:2001 specification. *Int Endod J*. 2007;40(9).
 93. Mayer BE, Peters OA, Barbakow F. Effects of rotary instruments and ultrasonic irrigation on debris and smear layer scores: A scanning electron microscopic study. *Int Endod J*. 2002;35(7).
 94. Hülsmann M, Rummelin C, Schäfers F. Root canal cleanliness after preparation with different endodontic handpieces and hand instruments: A comparative SEM investigation. *J Endod*. 1997;23(5).
 95. Gulabivala K, Stock CJR, Lewsey JD, Ghorri S, Ng YL, Spratt DA. Effectiveness of electrochemically activated water as an irrigant in an infected tooth model. *Int Endod J*. 2004;37(9).
 96. Shen Y, Gao Y, Lin J, Ma J, Wang Z, Haapasalo M. Methods and models to study irrigation. *Endod Topics*. 2012;27(1).
 97. Kishen A, Haapasalo M. Biofilm models and methods of biofilm assessment. *Endod Topics*. 2010;22(1).
 98. Chávez De Paz LE. Development of a multispecies biofilm community by four root canal bacteria. *J Endod*. 2012;38(3).
 99. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1998;85(1).
 100. Siqueira JF, Rôças IN, Alves FRF, Silva MG. Bacteria in the apical root canal of teeth with primary apical periodontitis. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*. 2009;107(5).

101. Nguy D, Sedgley C. The Influence of Canal Curvature on the Mechanical Efficacy of Root Canal Irrigation In Vitro Using Real-Time Imaging of Bioluminescent Bacteria. *J Endod.* 2006;32(11).
102. Hsieh YD, Gau CH, Kung Wu SF, Shen EC, Hsu PW, Fu E. Dynamic recording of irrigating fluid distribution in root canals using thermal image analysis. *Int Endod J.* 2007;40(1).
103. Sedgley CM, Nagel AC, Hall D, Applegate B. Influence of irrigant needle depth in removing bioluminescent bacteria inoculated into instrumented root canals using real-time imaging in vitro. *Int Endod J.* 2005;38(2).
104. Tay FR, Gu L sha, Schoeffel GJ, Wimmer C, Susin L, Zhang K, et al. Effect of Vapor Lock on Root Canal Debridement by Using a Side-vented Needle for Positive-pressure Irrigant Delivery. *J Endod.* 2010;36(4).
105. Azimian S, Bakhtiar H, Azimi S, Esnaashari E. In vitro effect of XP-Endo finisher on the amount of residual debris and smear layer on the root canal walls. *Dent Res J (Isfahan).* 2019;16(3).
106. Silva EJNL, Belladonna FG, Zuolo AS, Rodrigues E, Ehrhardt IC, Souza EM, et al. Effectiveness of XP-endo Finisher and XP-endo Finisher R in removing root filling remnants: a micro-CT study. *Int Endod J.* 2018;51(1).
107. Boutsoukakis C, Gogos C, Verhaagen B, Versluis M, Kastrinakis E, van der Sluis LWM. The effect of apical preparation size on irrigant flow in root canals evaluated using an unsteady Computational Fluid Dynamics model. *Int Endod J.* 2010;43(10).
108. Ruddle CJ. Hydrodynamic disinfection tsunami endodontics. Vol. 26, *Dentistry Today.* 2007.
109. Boutsoukakis C, Arias-Moliz MT. Present status and future directions – irrigants and irrigation methods. Vol. 55, *International Endodontic Journal.* 2022.
110. Azim AA, Aksel H, Zhuang T, Mashtare T, Babu JP, Huang GTJ. Efficacy of 4 Irrigation Protocols in Killing Bacteria Colonized in Dentinal Tubules Examined by a Novel Confocal Laser Scanning Microscope Analysis. *J Endod.* 2016;
111. Adcock JM, Sidow SJ, Looney SW, Liu Y, McNally K, Lindsey K, et al. Histologic evaluation of canal and isthmus debridement efficacies of two different irrigant delivery techniques in a closed system. *J Endod.* 2011;37(4).

112. Howard RK, Kirkpatrick TC, Rutledge RE, Yaccino JM. Comparison of debris removal with three different irrigation techniques. *J Endod.* 2011;37(9).
113. Souza LC, Brito PRR, Machado de Oliveira JC, Alves FRF, Moreira E JL, Sampaio-Filho HR, et al. Photodynamic Therapy with Two Different Photosensitizers as a Supplement to Instrumentation/Irrigation Procedures in Promoting Intracanal Reduction of *Enterococcus faecalis*. *J Endod.* 2010;36(2).
114. Alves FRF, Andrade-Junior C v., Marceliano-Alves MF, Pérez AR, Rôças IN, Versiani MA, et al. Adjunctive Steps for Disinfection of the Mandibular Molar Root Canal System: A Correlative Bacteriologic, Micro–Computed Tomography, and Cryopulverization Approach. *J Endod.* 2016;
115. Liang YH, Jiang LM, Jiang L, Chen XB, Liu YY, Tian FC, et al. Radiographic healing after a root canal treatment performed in single-rooted teeth with and without ultrasonic activation of the irrigant: A randomized controlled trial. *J Endod.* 2013;39(10).
116. Kishen A, Shrestha A, del Carpio-Perochena A. Validation of Biofilm Assays to Assess Antibiofilm Efficacy in Instrumented Root Canals after Syringe Irrigation and Sonic Agitation. *J Endod.* 2018;44(2).
117. Amato M, Vanoni-Heineken I, Hecker H, Weiger R. Curved versus straight root canals: The benefit of activated irrigation techniques on dentin debris removal. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology.* 2011;
118. van der Sluis LWM, Vogels MPJM, Verhaagen B, Macedo R, Wesselink PR. Study on the Influence of Refreshment/Activation Cycles and Irrigants on Mechanical Cleaning Efficiency During Ultrasonic Activation of the Irrigant. *J Endod.* 2010;36(4).
119. Leoni GB, Versiani MA, Silva-Sousa YT, Bruniera JFB, Pécora JD, Sousa-Neto MD. Ex vivo evaluation of four final irrigation protocols on the removal of hard-tissue debris from the mesial root canal system of mandibular first molars. *Int Endod J.* 2017;
120. Versiani MA, Alves FRF, Andrade-Junior C v., Marceliano-Alves MF, Provenzano JC, Rôças IN, et al. Micro-CT evaluation of the efficacy of hard-tissue removal from the root canal and isthmus area by positive and negative pressure irrigation systems. *Int Endod J.* 2016;49(11).

121. de Gregorio C, Estevez R, Cisneros R, Paranjpe A, Cohenca N. Efficacy of different irrigation and activation systems on the penetration of sodium hypochlorite into simulated lateral canals and up to working length: An in vitro study. *J Endod*. 2010;36(7).
122. de Gregorio C, Paranjpe A, Garcia A, Navarrete N, Estevez R, Esplugues EO, et al. Efficacy of irrigation systems on penetration of sodium hypochlorite to working length and to simulated uninstrumented areas in oval shaped root canals. *Int Endod J*. 2012;45(5).
123. Retsas A, Boutsoukis C. An update on ultrasonic irrigant activation. *Endo EPT*. 2019;13(2).
124. Muhammad OH, Chevalier M, Rocca JP, Brulat-Bouchard N, Medioni E. Photodynamic therapy versus ultrasonic irrigation: Interaction with endodontic microbial biofilm, an ex vivo study. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2014;11(2).
125. Sabino CP, Garcez AS, Núñez SC, Ribeiro MS, Hamblin MR. Real-time evaluation of two light delivery systems for photodynamic disinfection of *Candida albicans* biofilm in curved root canals. *Lasers Med Sci*. 2015;30(6).
126. Lyon JP, Rezende RR, Rabelo MP, de Lima CJ, Moreira LM. Synergic Effect of Photodynamic Therapy with Methylene Blue and Surfactants in the Inhibition of *Candida albicans*. *Mycopathologia*. 2013;175(1–2).
127. Silva Garcez A, Núñez SC, Lage-Marques JL, Jorge AOC, Ribeiro MS. Efficiency of NaOCl and laser-assisted photosensitization on the reduction of *Enterococcus faecalis* in vitro. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*. 2006;102(4).
128. de Oliveira BP, Aguiar CM, Câmara AC, de Albuquerque MM, Correia ACR de B, Soares MF de LR. The efficacy of photodynamic therapy and sodium hypochlorite in root canal disinfection by a single-file instrumentation technique. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2015;12(3).
129. Pourhajibagher M, bahador A. Adjunctive antimicrobial photodynamic therapy to conventional chemo-mechanical debridement of infected root canal systems: A systematic review and meta-analysis. Vol. 26, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2019.
130. Pourhajibagher M, Bahador A. An in vivo evaluation of microbial diversity before and after the photo-activated disinfection in primary endodontic infections:

- Traditional phenotypic and molecular approaches. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2018;22.
131. Pourhajibagher M, Ghorbanzadeh R, Parker S, Chiniforush N, Bahador A. The evaluation of cultivable microbiota profile in patients with secondary endodontic infection before and after photo-activated disinfection. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2017;18.
 132. da Silva CC, Chaves Júnior SP, Pereira GLD, Fontes KBF da C, Antunes LAA, Póvoa HCC, et al. Antimicrobial Photodynamic Therapy Associated with Conventional Endodontic Treatment: A Clinical and Molecular Microbiological Study. *Photochem Photobiol.* 2018;94(2).
 133. de Miranda RG, Colombo APV. Clinical and microbiological effectiveness of photodynamic therapy on primary endodontic infections: a 6-month randomized clinical trial. *Clin Oral Investig.* 2018;22(4).
 134. Xu Y, Young MJ, Battaglino RA, Morse LR, Fontana CR, Pagonis TC, et al. Endodontic Antimicrobial Photodynamic Therapy: Safety Assessment in Mammalian Cell Cultures. *J Endod.* 2009;35(11).
 135. Yildirim C, Karaarslan ES, Ozsevik S, Zer Y, Sari T, Usumez A. Antimicrobial efficiency of photodynamic therapy with different irradiation durations. *Eur J Dent.* 2013;7(4).
 136. Rabello DGD, Corazza BJM, Ferreira LL, Santamaria MP, Gomes APM, Martinho FC. Does supplemental photodynamic therapy optimize the disinfection of bacteria and endotoxins in one-visit and two-visit root canal therapy? A randomized clinical trial. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2017;19.
 137. Garcez AS, Hamblin MR. Methylene blue and hydrogen peroxide for photodynamic inactivation in root canal - A new protocol for use in endodontics. *Eur Endod J.* 2017;2(1).
 138. Shrestha A, Kishen A. The effect of tissue inhibitors on the antibacterial activity of chitosan nanoparticles and photodynamic therapy. *J Endod.* 2012;38(9).
 139. Silva EJNL, Carvalho CR, Belladonna FG, Prado MC, Lopes RT, De-Deus G, et al. Micro-CT evaluation of different final irrigation protocols on the removal of hard-tissue debris from isthmus-containing mesial root of mandibular molars. *Clin Oral Investig.* 2019;23(2):681–7.
 140. Aveiro E, Chiarelli-Neto VM, de-Jesus-Soares A, Zaia AA, Ferraz CCR, Almeida JFA, et al. Efficacy of reciprocating and ultrasonic activation of 6% sodium

- hypochlorite in the reduction of microbial content and virulence factors in teeth with primary endodontic infection. *Int Endod J*. 2020;53(5):604–18.
141. DRUTTMAN ACS, STOCK CJR. An in vitro comparison of ultrasonic and conventional methods of irrigant replacement. *Int Endod J*. 1989;22(4).
 142. Bronnec F, Bouillaguet S, Machtou P. Ex vivo assessment of irrigant penetration and renewal during the final irrigation regimen. *Int Endod J*. 2010;
 143. Macedo RG, Verhaagen B, Wesselink PR, Versluis M, van der Sluis LWM. Influence of refreshment/activation cycles and temperature rise on the reaction rate of sodium hypochlorite with bovine dentine during ultrasonic activated irrigation. *Int Endod J*. 2014;47(2).
 144. Carvalho MC, Zuolo ML, Arruda-Vasconcelos R, Marinho ACS, Louzada LM, Francisco PA, et al. Effectiveness of XP-Endo Finisher in the reduction of bacterial load in oval-shaped root canals. *Braz Oral Res*. 2019;33.
 145. Siqueira JF, Alves FRF, Almeida BM, MacHado De Oliveira JC, Rôças IN. Ability of chemomechanical preparation with either rotary instruments or self-adjusting file to disinfect oval-shaped root canals. *J Endod*. 2010;
 146. Lin J, Shen Y, Haapasalo M. A comparative study of biofilm removal with hand, rotary nickel-titanium, and self-adjusting file instrumentation using a novel in vitro biofilm model. *J Endod*. 2013;
 147. Martinho FC, Gomes APM, Fernandes AMM, Ferreira NS, Endo MS, Freitas LF, et al. Clinical comparison of the effectiveness of single-file reciprocating systems and rotary systems for removal of endotoxins and cultivable bacteria from primarily infected root canals. *J Endod*. 2014;