

DANNA MOTA MOREIRA

Cirurgiã-Dentista

**INFLUÊNCIA DE SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS AUXILIARES DE USO
ENDODÔNTICO E AGENTES REDUTORES NAS PROPRIEDADES
BIOMECÂNICAS DA DENTINA RADICULAR**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia
de Piracicaba, da Universidade de Campinas,
para a obtenção do Título de Doutor em Clínica
Odontológica – Área de Endodontia.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Augusto Zaia

Piracicaba

2011

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

Bibliotecária: Elis Regina Alves dos Santos – CRB-8ª / 8099

M813i Moreira, Danna Mota.
Influência de substâncias químicas auxiliares de uso endodôntico e agentes redutores nas propriedades biomecânicas da dentina radicular / Danna Mota Moreira. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2011.

Orientador: Alexandre Augusto Zaia.
Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Birrefringência. 2. Propriedades mecânicas. I. Zaia, Alexandre Augusto. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

(eras/fop)

Título em Inglês: Effects of reducing agents and endodontics auxiliary chemical solutions on biomechanical properties of root dentin

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Birefringence. 2. Mechanical properties

Área de Concentração: Endodontia

Titulação: Doutor em Clínica Odontológica

Banca Examinadora: Alexandre Augusto Zaia, Luiz Valdrighi, Ivaldo Gomes de Moraes, Giulio Gavini, Mario Fernando de Goes

Data da Defesa: 11-02-2011

Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica



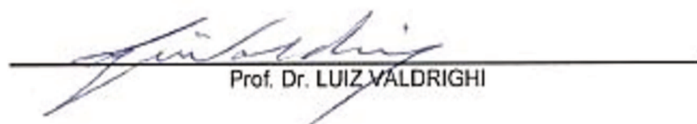
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba




A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 11 de Fevereiro de 2011, considerou a candidata DANNA MOTA MOREIRA aprovada.



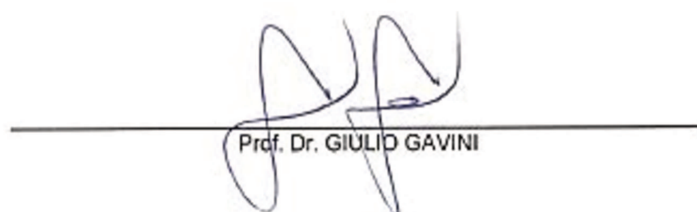
Prof. Dr. ALEXANDRE AUGUSTO ZAIA



Prof. Dr. LUIZ VALDRIGHI



Prof. Dr. IVALDO GOMES DE MORAES



Prof. Dr. GIULIO GAVINI



Prof. Dr. MÁRIO FERNANDO DE GOES

Dedicatória

Dedico esse trabalho aos meus pais **Odanir e Leticia**. Em cada momento que olho para o dia de ontem e relembro as dificuldades enfrentadas e alegrias vividas, vejo como é forte a presença de vocês dois em minha vida. Obrigada por vocês sonharem comigo. Amo muito vocês!

Ao meu irmão **Rafael**, que em momento algum deixou de me apoiar e escutar com toda paciência e amor. Obrigada por sempre me apoiar e pelos constantes exemplos de caráter e integridade. Amo você!

Ao **José Flávio Affonso de Almeida**, por estar sempre ao meu lado, compartilhando sonhos e angústias. Obrigada pelo carinho e paciência em todos os momentos. E, principalmente, por me mostrar o verdadeiro amor.

À **Deus**, que em sua magnitude me guia e fortalece no seu amor, mostrando que cada obstáculo da vida na verdade é uma prova do seu amor.

Agradecimentos Especiais

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Alexandre Augusto Zaia**, pela oportunidade de descobrir o meu caminho e a mim mesma. Obrigada pelo apoio, carinho e ensinamentos científicos e de vida.

Ao **Prof. Dr. Sergio Roberto Peres Line** pela inestimável contribuição para a realização desse trabalho. Sem a sua ajuda parte dessa realização não existiria. Obrigada por toda a atenção dispensada.

À **Profa. Dra. Judith Pessoa Andrade Feitosa** pela acolhida carinhosa e apoio na redação desse trabalho. Obrigada por tamanha demonstração de humildade e grandeza de espírito.

Ao **Prof. Mário Fernando de Góes**, pelo constante apoio para que eu pudesse continuar minha caminhada realizando mais um sonho. Obrigada pelas longas conversas.

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, na pessoa do seu Diretor, **Prof. Dr. Jacks Jorge Junior**, pelo apoio necessário para a realização do meu crescimento científico e profissional.

À **Profa. Dra. Renata C. Matheus R. Garcia**, coordenadora geral do curso de Pós-Graduação e ao **Prof. Dr. Márcio de Moraes**, coordenador do curso de Pós-Graduação em Clínica Odontológica da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP.

Aos docentes da Endodontia **Prof. Dr. Luiz Valdrighi**, **Prof. Dr. Francisco José de Souza Filho**, **Profa. Dra. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes**, **Prof. Dr. Caio Cezar Randi Ferraz** e **José Flávio Affonso de Almeida** pelo estímulo e atenção dispensada sempre que solicitados. Obrigada pelo exemplo de vida que cada um me transmitiu de forma particular.

Aos membros da banca de qualificação **Prof. Dr. Flávio Henrique Baggio Aguiar**, **Prof. Dr. Caio César Randi Ferraz** e **Prof. Dr. Mário Alexandre Coelho Sinhoretí**. pela contribuição inestimável a esse trabalho, assim como, inestimável é o meu carinho e admiração pela pessoa de cada um.

Ao **Prof. Dr. Antônio Francisco Iemma**, pela carinhosa e paciente contribuição na realização desse trabalho.

À **profa. Altair Antoninha Del Bel Cury**, pelo apoio constante e exemplo de seriedade e caráter. Obrigada por todo carinho.

Aos colegas de mestrado **Carlos Vieira Andrade Júnior, Emmanuel João Nogueira Leal da Silva, Fernanda Freitas Lins, Karine Schell de Moraes Nicastro, Marcos Sergio Endo, Maria Rachel Figueiredo Penalva Monteiro, Shaiana Tashy Kawagoe** que tornaram cada momento dividido, momentos únicos, momentos de riso, de choro e de amor. Obrigada por me darem estes momentos.

Aos colegas de doutorado **Ana Carolina M. Oliveira, Ana Carolina Rocha Lima Caiado, Antonio Batista, Carlos Augusto M. S. Pantoja, Carlos Roberto Berger, Daniel Rodrigo H. Morante, Douglas Cechin, Estela Marta Doffo de Winocur, Fernanda G. C. Signoretti, Francisco Montagner, Frederico Canato Martinho, Gabriel Rocha Campos, Giselle P. C. Abi Rached, Juliana Melo da Silva, Letícia Maria Menezes Nóbrega, Máira do Prado, Marcos Roberto dos Santos Frozoni, Nilton Vivacqua Gomes, Noboru Imura, Ricardo Ferreira, Wanderson Miguel Maia Chiesa** obrigada pela amizade, pelo cuidado e amor dados em cada minuto de convivência com vocês. Jamais esquecerei cada singelo momento de alegria passado com cada um de vocês.

Às estagiárias da Disciplina de Endodontia **Ariane Marinho, Cláudia Suzuki, Thais Mageste, Thiago Farias**, pela ajuda e atenção dispensadas e também pelos risos.

À todos os **colegas de pós-graduação** que passaram por minha vida nestes últimos 8 anos. Meu profundo agradecimento pela atenção e apoio em todos os momentos dessa jornada.

Aos meus queridos colegas do **Grupo Pós de Pesquisa em Endodontia**. Muito obrigada pelo carinho e torcida.

Aos funcionários da Disciplina de Endodontia **Ana Cristina Godoy, Daiane Scutton e Wanderly Lima de Almeida Pavinatto**. A contribuição de vocês foi muito maior do que um simples apoio técnico. Vocês contribuíram para a realização de um sonho. Obrigada.

Aos funcionários **Adriano Luis Martins, Eliene Aparecida Orsini Narvais Romani, Geovania Caldas Almeida, Marcos Blanco Cangiani, Maria Aparecida Santiago Varella, Mônica Aparecida Barnabe e Selma Aparecida Barbosa Segalla**. Meu profundo agradecimento não só pela a inestimável ajuda técnica e científica para a realização desse trabalho, mas também por todo o carinho e apoio dispensado em todos os momentos.

À **Ana Carolina Machado Rocha Lima**, minha grande companheira em Piracicaba. Muito obrigada por todos os momentos de alegria, por todas as palavras de carinho e conforto. Não existem palavras que expressem meu profundo agradecimento e carinho por você

Aos meus grandes amigos de Piracicaba, **Francisco Montagner, Juliana Santos, Thais Accorsi e Vanessa Berber**. O meu profundo agradecimento por vocês fazerem parte da minha vida. Obrigada por compartilharem comigo o melhor de cada um.

Às grandes colaboradoras deste trabalho, **Maria Malerba Colombi Humel e Shaiana Tashy Kawagoe**. Obrigada pela inestimável ajuda na concepção deste trabalho.

Ao colega **Bruno Barreto**, pela ajuda sem tamanho na realização deste trabalho. Obrigada pela ajuda e carinho com que disponibilizou seu tempo em ajudar na interpretação deste trabalho.

Ao colega **Luciano Gonçalves**, por toda orientação despendida na realização deste trabalho.

Aos **colegas da área de Dentística**, que em todos os momentos que busquei por apoio, sempre encontrei algum sorriso acolhedor. Obrigada por toda ajuda despendida para a realização deste trabalho.

Aos meus avós, **Lauro Alaor Moreira (in memorian), Maria Odnira Cruz Moreira (in memorian), José de Almeida Mota e Zaira Góes Mota**. Obrigada por me fazerem acreditar no impossível.

Às minhas eternas melhores amigas de Fortaleza, **Adhele Furlani, Andréa de Aquino, Candice Rangel e Lina Barsi**. Obrigada pelo amor e apoio mesmo de longe. Não há nada mais reconfortante do que ter a certeza de ter amigas de verdade.

À todos os **funcionários** da FOP. Todos vocês contribuíram de alguma forma para que esse momento se realizasse. Muitas vezes com um simples bom dia e um sorriso. Obrigada pela ajuda e pelos sorrisos.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** pelo apoio financeiro.

À todas as pessoas que participaram, contribuindo para a realização desse trabalho, direta ou indiretamente, meu agradecimento.

*"Nossa maior glória não está
em jamais cair, mas em
levantar a cada queda."*

Confúcio

Resumo

Dentre os protocolos de irrigação mais utilizados mundialmente, a associação do hipoclorito de sódio (NaOCl) e o EDTA merece destaque. Entretanto, estes agentes químicos podem causar efeitos deletérios nas propriedades químicas e físicas da dentina, além da ação oxidativa do NaOCl interferir no comportamento de materiais restauradores. O uso de agentes redutores tem demonstrado minimizar os efeitos deletérios do NaOCl previamente a procedimentos restauradores. No primeiro estudo que compõe esta tese teve-se como objetivo avaliar os efeitos do ácido ascórbico 10% e/ou ascorbato de sódio 10% após a irrigação com NaOCl 5,25%, EDTA 17% ou cloreto de sódio 0,9% no colágeno presente na matriz orgânica da parede dentinária do canal radicular de incisivos bovinos. Foram utilizados oitenta incisivos bovinos aleatoriamente divididos em oito grupos (n=10): G1(Controle): cloreto de sódio 0,9%; G2: NaOCl 5,25% + EDTA 17%; G3: NaOCl 5,25% + EDTA 17% + ácido ascórbico 10%; G4: NaOCl 5,25% + EDTA 17% + ascorbato de sódio 10%; G5: NaOCl 5,25%; G6: EDTA 17%; G7: ácido ascórbico 10%; G8: ascorbato de sódio 10%. Os espécimes foram submetidos à instrumentação e irrigação com as diferentes substâncias químicas auxiliares e em seguida submetidos ao processamento histológico para análise em microscopia de polarização. Os grupos que demonstraram alteração no padrão de birrefringência foram submetidos à análise de absorvância para a confirmação da perda de proteína. Foi possível concluir que o uso do ácido ascórbico 10% e/ou ascorbato de sódio 10% conseguiu restabelecer os valores de retardo óptico antes diminuídos pelo uso de NaOCl 5,25%, associado ou não ao EDTA 17%. Já no segundo estudo, este teve como objetivo avaliar os efeitos do ácido ascórbico 10% e/ou ascorbato de sódio 10% após a irrigação com NaOCl 5,25%, EDTA 17% ou cloreto de sódio 0,9% na microdureza Knoop e resistência flexural da dentina radicular bovina. A distribuição dos grupos foi feita de forma

similar ao primeiro estudo. Foram utilizados 80 dentes bovinos para o teste de microdureza Knoop e 120 barras de dentina para o ensaio de flexão de 3-pontos. O NaOCl 5,25% reduziu de forma significativa os valores de microdureza Knoop, chegando a afetar a dureza mesmo em grandes profundidades na dentina radicular bovina. A aplicação de ascorbato de sódio conseguiu reverter os valores previamente reduzidos de microdureza. Ficou comprovado que o NaOCl 5,25% afeta de forma negativa a resistência flexural, mas ao se fazer uso do ácido ascórbico após o protocolo de irrigação com NaOCl e EDTA, os valores de resistência flexural foram restabelecidos, chegando mesmo a equiparar-se ao grupo controle.

Palavras-chave: Irrigantes endodônticos, birrefringência, propriedades mecânicas, agentes redutores

Abstract

Among the auxiliary chemical substances used in Endodontics during chemical-mechanical preparation, sodium hypochlorite (NaOCl) and EDTA have been the most widely recommended. However, irrigant solutions used in endodontic therapy might yield changes in the chemical and physical properties of dentin. Besides, these reagents compromised the bond strengths of some adhesives on root dentin. The aim of the first study was to evaluate the effect of 10% acid ascorbic or 10% sodium ascorbate on organic matrix collagen of bovine dentin root canal walls after irrigation with 5.25% sodium hypochlorite, 17% EDTA or 0.9% sodium chloride. Eighty bovine incisors were randomly divided into eight groups (n=10) according to: G1(Control): 0.9% Sodium Chloride; G2: 5.25% NaOCl + 17% EDTA; G3: 5.25% NaOCl + 17% EDTA + 10% ascorbic acid; G4: 5,25% NaOCl + 17% EDTA + 10% sodium ascorbate; G5: 5.25% NaOCl; G6: 17% EDTA; G7: 10% ascorbic acid; G8: 10% sodium ascorbate. Teeth were chemomechanically prepared and submitted to histological processing to be analyzed under polarized light microscopy. Absorbance assay was also performed to confirm the loss of collagen. It is possible to conclude that groups treated with 5.25% NaOCl (G2 and G5) presented a significantly different birefringence pattern compared with the control group ($p<0.05$). The birefringence values reduced could be reversed by the application of either 10% ascorbic acid or 10% sodium ascorbate after 5.25% NaOCl and 17% EDTA irrigation. The absorbance assay of G2 and G5 confirmed the loss of collagen ($p<0.05$). The second study aimed to evaluate the effect of 10% ascorbic acid or 10% sodium ascorbate application after 5.25% NaOCl, 17% EDTA or 0.9% sodium chloride irrigation in the Knoop microhardness and flexural strength on root dentin. Eighty bovine incisors were

randomly divided into eight groups (n=10): G1 (Control): 0.9% Sodium Chloride; G2: 5.25% NaOCl + 17% EDTA; G3: 5.25% NaOCl + 17% EDTA + 10% ascorbic acid; G4: 5.25% NaOCl + 17% EDTA + 10% sodium ascorbate; G5: 5.25% NaOCl; G6: 17% EDTA; G7: 10% ascorbic acid; G8: 10% sodium ascorbate. Teeth were chemomechanically prepared and submitted to Knoop microhardness. Standardized plano-parallel dentin bars were prepared and randomly divided into the same eight groups (n=15) cited above. The dentin bars were then loaded to failure in a three-point bend test. Root canal irrigation with 5.25% NaOCl reduced the microhardness of dentin in all distances tested. The microhardness values increased in all distances when sodium ascorbate was used after 5.25% NaOCl and 17% EDTA irrigation. By exposing the dentin bars to 5.25% NaOCl, whether it was associated or not to 17% EDTA, the flexural strength decreased. However, values increased when 10% ascorbic acid or 10% sodium ascorbate were used after 5.25% NaOCl and 17% EDTA irrigation.

Keywords: Auxiliary chemical solutions, birefringence, mechanical properties, reducing agents

Sumário

1.INTRODUÇÃO	01
2.CAPÍTULOS	06
Capítulo 1: Effects of reducing agents on birefringence dentin collagen after use of different endodontics auxiliary chemical substances	06
Capítulo 2: Effects of reducing agents and endodontics auxiliary chemical substances on mechanical properties of bovine root dentin	27
4.CONSIDERAÇÕES GERAIS	47
5.CONCLUSÃO	50
6.REFERÊNCIAS	51
APÊNDICE	53
1-Detalhamento da Metodologia	53
2-Detalhamento dos Resultados	69
ANEXO 1	85
ANEXO 2	86

Introdução

O emprego de substâncias químicas auxiliares no preparo de canais radiculares tem como função primordial a eliminação de microrganismos, além de contribuir na limpeza, principalmente, no que diz respeito à sua ação sobre os componentes orgânicos e inorgânicos. São utilizadas durante a instrumentação do sistema de canais radiculares, desempenhando ações químicas e físicas concomitantemente com a ação mecânica dos instrumentos endodônticos. Também são utilizadas para remover a “smear layer” que se forma ao longo das paredes dos canais radiculares durante o preparo químico-mecânico (Safavi *et al.*, 1990; Lopes *et al.*, 2004). Até o presente momento, não há um agente químico que exerça todas as funções desejadas.

Dentre estas substâncias propostas para uso em Endodontia, destaca-se o hipoclorito de sódio, que tem sido utilizado por um longo período como substância química auxiliar do canal radicular, em diferentes concentrações. Sabe-se, porém, que o hipoclorito de sódio danifica os componentes orgânicos da dentina, principalmente o colágeno (Nikaido *et al.*, 1999; Ishizuka *et al.*, 2001; Morris *et al.*, 2001, Moreira *et al.*, 2009).

Em estudo realizado por Oyarzún *et al.*, (2002), estes autores testaram a hipótese de que uma solução de NaOCl 5%, utilizada por 2 minutos, produziria alterações estruturais e moleculares no colágeno e nas glicosaminoglicanas presentes na dentina mineralizada e desmineralizada. Os resultados deste estudo sugeriram que o NaOCl 5% induz alterações no colágeno e nas glicosaminoglicanas da dentina e mostraram o papel protetor da hidroxiapatita na estabilidade orgânica da matriz.

Uma ferramenta interessante no estudo da análise estrutural de sistemas biológicos, como as fibras de colágenos, consiste na microscopia de polarização. O uso deste tipo de microscopia tem-se revelado como uma fonte de

análise da birrefringência em fibras colágenas. A birrefringência consiste em uma anisotropia óptica devido à diferença de índices de refração do objeto em estudo, o que significa uma propagação da luz com diferentes velocidades e em diferentes direções no corpo birrefringente. Alterando a propagação do feixe de luz, nota-se uma alteração no brilho característico do objeto visto apenas em microscopia de polarização (Vidal & Mello, 1987; Espírito Santo *et al.*, 2006).

O estudo acurado da birrefringência constitui em um meio extremamente valioso não só para a determinação da ordem molecular de biopolímeros, como também para pesquisa das variações dos seus graus de agregação e estabilidade físico-química, como por exemplo, para resolver problemas de organização e fisiologia dos feixes de colágeno (Vidal & Mello, 1987).

Moreira *et al.* (2009), demonstraram que a exposição da parede dentinária de dentes bovinos ao NaOCl 5,25% por um período de 30 minutos, associado ou não ao EDTA 17%, gera uma desorganização morfológica da matriz orgânica dentinária com perda de estrutura na área próxima ao canal radicular. Este fato demonstra o efeito de desnaturação protéica que esta substância gera no colágeno dentinário, que pôde ser confirmado pela alteração da birrefringência ao se mensurar o retardo óptico das amostras em que esta solução foi utilizada.

Segundo Nikaido *et al.* (1999), após a utilização de irrigantes químicos no canal radicular, como o NaOCl, seus resíduos e subprodutos podem difundir-se na dentina ao longo dos túbulos, afetando assim, a penetração da resina na estrutura dentinária ou a polimerização dos monômeros na matriz dentinária desmineralizada. Acredita-se que isso diminua a resistência de união à dentina quando da utilização de determinados materiais adesivos.

Uma justificativa para esta diminuição dos valores de resistência de união à dentina é a dissociação do hipoclorito de sódio em subprodutos como o oxigênio. Este oxigênio poderia causar uma forte inibição da polimerização dos materiais adesivos e cimentos resinosos (Nikaido & Nakabayashi, 1988; Titley *et*

al., 1988; Morris *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2006) assim como, prejudicar a penetração da resina na dentina condicionada por ácido (Torneck *et al.*, 1990).

Algumas ligações moleculares encontradas no colágeno tipo I e II também são rompidas pelo hipoclorito de sódio formando cloraminas e radicais derivados de proteínas (Hawkins & Davies, 1999). A presença destes radicais-livres na dentina deve competir com os radicais-livres vinílicos gerados durante a polimerização do adesivo, resultando em um fechamento prematuro da cadeia molecular do adesivo e polimerização incompleta (Lai *et al.*, 2001).

A resistência de união à dentina também depende, em grande parte, da distribuição da tensão que, por sua vez, está intimamente relacionado com as propriedades físico-mecânicas do substrato dentinário. Por meio do conhecimento das propriedades da dentina e de seu comportamento diante de diferentes estímulos é que poderá existir um melhor entendimento dos efeitos de uma série de procedimentos dentários e os princípios que influenciam a relação dente-restauração (Plotino *et al.*, 2007). Qualquer alteração nestas propriedades pode influenciar de forma negativa o desempenho dos materiais restauradores e comprometer a longevidade do processo restaurador e mesmo da estrutura dental.

O teste micromecânico da dureza é um método indireto de avaliação das alterações químicas e das mudanças superficiais da estrutura dentária (Craig *et al.*, 1959). Fuentes *et al.* (2004), afirmaram que o decréscimo dos valores de microdureza após a utilização de NaOCl 5% se deve à remoção dos componentes orgânicos e minerais da dentina, resultando na presença de uma frágil camada na interface adesiva que poderia levar à falhas prematuras.

A resistência à flexão determina a resistência à fratura de um material (Grande *et al.*, 2007). Sim *et al.* (2001), mensuraram o efeito do NaOCl 0,5% e 5,25% no módulo de elasticidade e resistência flexural na dentina de segundos pré-molares humanos, recém-extraídos. Após a análise dos resultados, verificou-se uma diminuição estatisticamente significativa no módulo de elasticidade e resistência flexural para as amostras irrigadas com NaOCl 5,25%. Os autores concluíram que a alteração nas propriedades mecânicas da dentina ocasionadas

pelo NaOCl 5,25% é suficiente para alterar suas propriedades adesivas na ausência de esmalte.

Acreditando ser a ação oxidante residual do NaOCl uma das causas da diminuição da resistência de união, autores passaram a sugerir o uso do ácido ascórbico ou de seu sal, o ascorbato de sódio, por serem estes agentes redutores (Lai *et al.*, 2001; Morris *et al.*, 2001; Weston *et al.*, 2007). Este composto, também chamado de vitamina C, é uma substância biocompatível, amplamente utilizada na indústria alimentícia como antioxidante, em medicina na área de cosmética, como indutor da formação de colágeno e na odontologia, como coadjuvante na prevenção da doença periodontal (Silva, 2005; Celik *et al.*, 2010).

O ácido ascórbico oxida-se facilmente na presença de oxigênio e umidade, assim, com a intenção de torná-lo mais estável nos tecidos biológicos orais, formulou-se um composto estabilizado de ascorbato de sódio contendo grupos fosfato, também conhecido como sal trissódico de monofosfato-ascorbil-2 (DSM, 2010).

O aumento observado na resistência de união após o uso de ácido ascórbico ou ascorbato de sódio foi observado em alguns estudos citados na literatura científica. Este fenômeno pode ser explicado pela habilidade deste agente redutor doar dois elétrons para alcançar os radicais livres que são formados durante a polimerização da resina após o uso de substâncias oxidantes (Lai *et al.*, 2001; Nagpal *et al.*, 2007).

Morris *et al.* (2001), investigaram os efeitos do NaOCl 5%, do RC-Prep, do ácido ascórbico 10% e do ascorbato de sódio 10%, associados ou não, na resistência de união do cimento C&B Metabond nas superfícies radiculares de dentes bovinos. Foram realizados ensaios de microtração e as superfícies fraturadas foram examinadas por meio de microscopia eletrônica de varredura para a classificação dos modos de fratura. A análise dos resultados mostrou uma redução estatisticamente significativa na resistência de união, tanto para o NaOCl

5%, quanto para o RC-Prep, mas essa diminuição foi completamente revertida com a aplicação do ácido ascórbico 10% ou do ascorbato de sódio 10%.

No contexto da adesão dentinária, é possível que, restaurando o potencial redox do substrato oxidado, o ácido ascórbico ou ascorbato de sódio permitam que a polimerização dos radicais livres do adesivo ocorra sem a finalização precoce, revertendo assim o comprometimento da adesão causado pela presença de oxigênio residual (Morris *et al.*, 2001; Yiu *et al.*, 2002). Deve-se, entretanto, considerar a possibilidade de alterações estruturais que este agente redutor pode causar ao substrato e investigar as possíveis interações quando associado a outras opções de substâncias químicas auxiliares de uso endodôntico. Assim, a aplicação clínica segura desses agentes antioxidantes carece de maiores investigações para averiguação de possíveis efeitos benéficos dessas substâncias nas propriedades físicas e mecânicas da dentina radicular, bem como, o efeito nas características da matriz orgânica do substrato dentinário.

Esta tese está baseada na resolução CCPG/02/06 UNICAMP que regulamenta o formato alternativo para teses de Mestrado e Doutorado. O trabalho encontra-se dividido em dois capítulos principais. No primeiro estudo que compõe esta tese teve-se como objetivo avaliar os efeitos do ácido ascórbico 10% e/ou ascorbato de sódio 10% após a irrigação com NaOCl 5,25%, EDTA 17% ou cloreto de sódio 0,9% no colágeno presente na matriz orgânica da parede dentinária do canal radicular de incisivos bovinos por meio da análise quantitativa da birrefringência. Já o segundo estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do ácido ascórbico 10% e/ou ascorbato de sódio 10% após a irrigação com NaOCl 5,25%, EDTA 17% ou cloreto de sódio 0,9% na microdureza Knoop e resistência flexural da dentina radicular bovina.

Capítulo 1

Effects of reducing agents on birefringence dentin collagen after use of different endodontics auxiliary chemical substances

ABSTRACT

Dentin collagen alteration after treatment with chemical substances can be observed by quantitative analysis of birefringence by polarized light microscopy (PLM). Biocompatible reducing agents such as ascorbic acid and sodium ascorbate have been studied to reverse the negative effects of oxidants. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of 10% acid ascorbic or 10% sodium ascorbate on organic matrix collagen of bovine dentin root canal walls after irrigation with 5.25% sodium hypochlorite, 17% EDTA, or 0.9% sodium chloride. Eighty bovine incisors were randomly divided into eight groups (n=10) according to: G1(Control): 0.9% Sodium Chloride; G2: 5.25% sodium hypochlorite (NaOCl) + 17% ethylenediaminetetraacetic (EDTA); G3: 5.25% NaOCl + 17% EDTA + 10% ascorbic acid; G4: 5.25% NaOCl + 17% EDTA + 10% sodium ascorbate; G5: 5.25% NaOCl; G6: 17% EDTA; G7: 10% ascorbic acid; G8: 10% sodium ascorbate. Teeth were chemomechanically prepared and submitted to histological processing to be analyzed under PLM. Absorbance assay was also performed to confirm the loss of collagen. Groups treated with 5.25% NaOCl (G2 and G5) presented a significantly different birefringence pattern compared with the control group ($p < 0.05$). The measurement of the optical retardations of G4 indicated that this group was not statistically different from the G1. Although the measurement of the optical retardations of G3 was statistically different from the control group, the results were significantly higher than G2. The birefringence of G6, G7 and G8 were not statistically different from G1. The absorbance assay of G2 and G5 confirmed the loss of collagen ($p < 0.05$). It is possible to conclude that the reductions in the optical retardations values could be reversed by the application of either 10%

ascorbic acid or 10% sodium ascorbate after 5.25% sodium hypochlorite and 17% EDTA irrigation. The 5.25% NaOCl solution, whether associated or not associated with 17% EDTA, causes birefringence alterations and loss of dentin collagen. These alterations reduced the ability of Sirius red to bind with collagen fiber molecules.

Key words: Birefringence, collagen, auxiliary chemical solutions, reducing agents

Introduction

One of the primary objectives of the endodontic therapy is the microbial reduction, which in turn promotes the normal healing process of the periodontal tissues (Byström & Sundqwist, 1981). However, elimination of microorganisms from infected root canals is a hard task, mainly considering the complex anatomy of the root canal pulp space (Peters *et al.*, 2001). The chemical-mechanical preparation concept relates to the use of chemically active irrigating solutions in combination with mechanical cleansing (Marending *et al.*, 2007).

Among the auxiliary chemical substances used in Endodontics during chemical-mechanical preparation, sodium hypochlorite, in different concentrations, has been the most widely recommended irrigant solution (Zehnder, 2006). This endodontic irrigant has the ability to destroy a broad spectrum of microbes and to dissolve organic materials; however, it is known that sodium hypochlorite solution has injurious effects and that it alters the organic components of dentin, specially collagen, which contributes considerably to the mechanical properties of dentin (Slutzky-Goldberg *et al.*, 2004; Marending *et al.*, 2007).

The effects of sodium hypochlorite on resin-dentin bond strength have been extensively investigated (Nikaido *et al.*, 1999; Ishizuka *et al.*, 2001; Ari *et al.*, 2003; Santos *et al.*, 2006). It is thought that sodium hypochlorite leads to oxidation of some component in the dentin matrix and this may interfere with the penetration of monomers to within the demineralized dentin structure. In addition, sodium hypochlorite breaks down to sodium chloride and oxygen. Oxygen from such chemicals causes strong inhibition of the interfacial polymerization of resin bonding materials. The generation of oxygen bubbles at the resin-dentin interface may also interfere with resin infiltration into the tubules and intertubular dentin (Rueggeberg *et al.*, 1990; Nikaido *et al.*, 1999; Ari *et al.*, 2003; Celik *et al.*, 2010).

The residual sodium hypochlorite could be neutralized by the application of biocompatible reducing agents (eg, ascorbic acid and sodium ascorbate) to the oxidized dentin, which restoring the redox potential of dentin and converting the microenvironment of the dentin from an oxidized substrate to a reduced substrate,

thus facilitating complete polymerization (Morris *et al.*, 2001; Nagpal *et al.*, 2007; da Cunha *et al.*, 2010).

According to Lai *et al.* (2001), although the reducing agents reverse the compromised bond strength, this phenomenon may be system-specific. However, the authors affirm that clinical implication of this would be that by means of the use of an antioxidant such as sodium ascorbate, clinicians can acid-etch and bond immediately to endodontically treated teeth that were irrigated with sodium hypochlorite, without compromising the clinical performance or longevity of these restorations.

Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) is another substance often used with sodium hypochlorite as chelating agent to rid the root canal system of the smear layer, that consisting of dentin particles embedded in an amorphous mass of organic material that forms on the canal walls during the instrumentation procedure (Torabinejad *et al.*, 2002). In radicular dentin, EDTA is a calcium binder of hydroxyapatite crystals, causing changes in the microstructure of the dentin and changes in the calcium to phosphorus ratio. Changes in the mineral content ratio may alter the original proportion of organic and inorganic components, which in turn reduces the microhardness, increases the permeability and solubility of the root canal dentin, and increases the adherence and adhesion force of *E. faecalis* to dentin, an important bacteria associated with post-treatment endodontic infections (Rotstein *et al.*, 1996; Kishen *et al.*, 2008; Ballal *et al.*, 2010).

Dentin collagen alteration after treatment with chemical substances can be observed by polarized light microscopy (PLM). Quantitative analysis of birefringence by PLM is a useful method to investigate the macromolecular orientation and organization of collagen fibers in connective tissues (Vilarta & Vidal, 1989). The collagen's birefringence may be increased by dyeing the tissue with Sirius red stain. Sirius red molecules bind in parallel with collagen fiber molecules, enhanced their birefringence under PLM (Constantine & Mowry, 1968; Piérard, 1989).

In previous work (Moreira *et al.*, 2009), it was possible to observe that 5.25% NaOCl, whether associated or not associated with 17% EDTA, causes alteration in the dentin collagen by a quantitative analysis of birefringence by PLM. Little information exists regarding the consequences of the use of the ascorbic acid/sodium ascorbate in dentin collagen after irrigation with 5.25% sodium hypochlorite. Thus, the aim of the present study is to evaluate the effect of 10% acid ascorbic or 10% sodium ascorbate on organic matrix collagen of bovine dentin root canal walls after irrigation with 5.25% sodium hypochlorite, 17% EDTA, or 0.9% sodium chloride.

Material and methods

Eighty bovine incisors, stored in a 0.2% thymol solution and frozen to maintain freshness, were selected for this study. The teeth were randomly divided into eight groups (n=10) according to the auxiliary chemical substance employed: G1(Control): 0.9% Sodium Chloride; G2: 5.25% sodium hypochlorite (NaOCl) + 17% ethylenediaminetetraacetic (EDTA); G3: 5.25% NaOCl + 17% EDTA + 10% ascorbic acid; G4: 5.25% NaOCl + 17% EDTA + 10% sodium ascorbate; G5: 5.25% NaOCl; G6: 17% EDTA; G7: 10% ascorbic acid; G8: 10% sodium ascorbate.

The teeth were prepared according to Moreira *et al.* (2009). The apexes of the teeth were sealed with wax (Wilson, Polidental Indústria e Comércio Ltda, Cotia, SP, Brasil) and the whole outer surface of the tooth was covered with a layer of cianoacrylate (Super Bonder®-Loctite, Itapevi, SP, Brasil).

Crowns were separated from roots by a horizontal cut made 3mm under the amelocemental junction with a carborundum disc (Vipi, Pirassununga, SP, Brasil). The root samples were fixed with wax and screwed to a metallic apparatus. To prevent any leakage of endodontic irrigants around the external surface of the root, a polyether impression material (Impregum® Soft, 3M ESPE, Sumaré, SP, Brasil) was used to seal the area around the root canal entrance and the metallic apparatus.

Pulp tissue and predentine were removed using #6 Gates-Glidden burs (Maillefer, Ballaigues, VD, Switzerland) and a #130 file (Maillefer, Ballaigues, VD, Switzerland). During instrumentation, irrigation protocols were performed according to the previously specified groups. All groups used a total volume of 10 ml for irrigation.

All root canals were then filled with the respective auxiliary chemical substances for different periods of time as shown in Table 1:

Table 1. Irrigation times and protocols for tested auxiliary chemical substances

Irrigation protocols		Total time of auxillary chemical substance in contact with root canal
Group 1	0.9% sodium chloride solution	30 min
Group 2	5.25% sodium hypochlorite + 17% EDTA	30 min 3 min
Group 3	5.25% sodium hypochlorite + 17% EDTA + 10% ascorbic acid	30 min 3 min 10 min
Group 4	5.25% sodium hypochlorite + 17% EDTA + 10% sodium ascorbate	30 min 3 min 10 min
Group 5	5.25% sodium hypochlorite	30 min
Group 6	17% EDTA	3 min
Group 7	10% ascorbic acid	10 min
Group 8	10% sodium ascorbate	10 min

Five milliliters of sodium chloride was used followed by the renewal of the sodium hypochlorite (pH 11.2) and sodium chloride (pH 6) solutions every 3 minutes and 1.5 minute for EDTA (pH 7.4) solution during the period in which the auxiliary chemical substances were placed in contact with the root canal dentin. After rinsing with 10 ml of sodium chloride, the canals were drying with Capillary Tips (Ultradent Products Inc, South Jordan, Utah, USA) and paper points. Then, the samples were rinsed with 10 ml of freshly prepared 10% ascorbic acid (pH 2.05) or 10% sodium ascorbate (pH 7.15) for 10 min, followed by the renewal of the solutions every 5 minutes and a final rinsing with 10 ml of sodium chloride. Samples were stored in 10% formaldehyde for 48 hours. After this period, each sample was cut transversally and standardized in 7 mm length, corresponding to the medium third of root canal. Then, they were submitted to histological processing to be analyzed under polarized light microscopy (PLM).

Polarized Light Microscopy

After fixation, the samples were decalcified in 5% nitric acid and 4% formaldehyde over a period of 3 to 5 weeks. The samples were dehydrated with alcohol, cleared in xylene, embedded in paraffin and 7- μ m-thick slices were obtained. The sections were stained with 1% Sirius Red in saturated picric acid (picrosirius) and mounted in Vetec Synthetic Canada Balsam (Vetec, Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brazil).

Each stained slide was examined under a Leica DM LP microscope (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Hesse, Germany) which had polarizing filters. The optical retardations of the transverse section of the roots were measured by compensating for the phase difference using a Brace-Köhler compensator (Wild Leitz Wetzlar, Hesse, Germany), and polychromatic light (Pearse, 1972; do Espírito Santo *et al.*, 2006). Four measurements were performed for each section in different areas at a distance approximately 200 μ m from the root canal.

Data were statistically analyzed by using parametric statistical methods and submitted to Fisher's analysis of variance. Multiple comparison were made using Tukey's honest significance difference test at $\alpha = 0.05$.

Quantitative analysis of organic matrix (Absorbance assay)

The groups investigated with polarizing microscopy that revealed alteration of birefringence were also analyzed with light microscopy. The purpose of this analysis was to confirm the loss of collagen. A Leica DM LP microscope equipped with a green filter (546 nm) was used. Images were captured on a Leica DFC280 digital camera, with 96 DPI resolution and 1280 x 1024 pixels. All images were captured at the same light intensity, which was controlled by a voltage potentiometer, and with a 20x objective. Measurements were performed in the nearest region of the root canal, with a measured area of 0.2 mm². The images were analyzed with the Image J software (National Institutes of Health, Bethesda,

MD, USA). Data were determined by Kruskal-Wallis analysis of variance with Dunn's multiple comparison test. The significance limit was set at 5% ($p < 0.05$).

Results

Polarized Light Microscopy

The analysis of the images obtained for groups 2, 3, 4, 5, 6, 7 and 8 using PLM when stained with Sirius red revealed a prevalence of red and yellow shades. This was also observed for the control group (Fig. 1). The birefringence pattern did not change when specimens were rotated. The collagen of groups treated with 5.25% sodium hypochlorite (groups 2 and 5) was more disorganized near the root canal. The images revealed that there was a loss of collagen in this region when compared with the control group (group 1). The organic matrix, especially near the root canal, showed a loose organization pattern when compared with the normal morphologic pattern of bovine dentin structure observed by PLM.

The results obtained by measuring the optical retardations indicate that groups treated with 5.25% sodium hypochlorite, whether associated or not associated with 17% EDTA (G2 and G5), were statistically different (5% significance level) from the others groups (Table 2). The organic matrix of groups treated with 10% ascorbic acid or 10% sodium ascorbate after 5.25% sodium hypochlorite and 17% EDTA irrigation (G3 and G4) showed some areas with a loose organization pattern and others with the normal morphologic pattern of bovine dentin structure observed by PLM. The measurement of the optical retardations of group 4 indicated that this group was not statistically different from the control group. Although the measurement of the optical retardations of group 3 was statistically different from the control group, the results were significantly higher than group 2 (Table 2).

The birefringence of 17% EDTA, 10% ascorbic acid and 10% sodium ascorbate (groups 6, 7, and 8) showed a uniformness in their fibrillar network similar to that of the control group. Data indicate that 17% EDTA, 10% ascorbic acid and 10% sodium ascorbate (groups 6, 7, and 8) were not statistically different from the control group (Table 2).

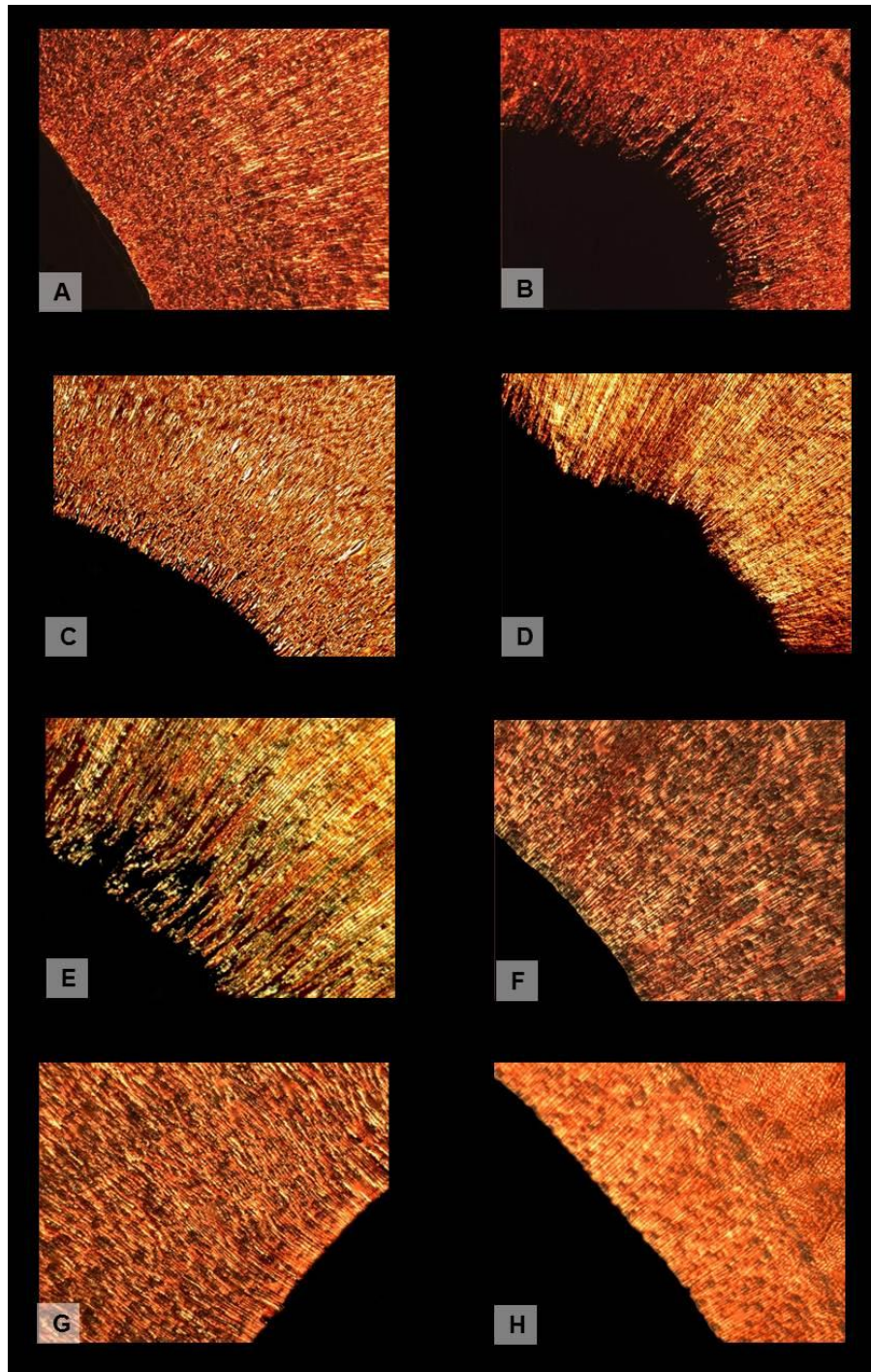


Figure 1 - Picrosirius stain using polarized light microscopy (A) Control group; (B) 5.25% NaOCl + 17% EDTA (G2); (C) 5.25% NaOCl + 17% EDTA + 10% ascorbic acid (G3); (D) 5.25% NaOCl + 17% EDTA + 10% sodium ascorbate (G4); (E) 5.25% NaOCl (G5); (F) 17% EDTA (G6); (G): 10% ascorbic acid (G7); (H) 10% sodium ascorbate (G8). In A, image with prevalence of red and yellow shades. Organic matrix showed uniformness of fibrillar network. In B and E, revealed areas with disorganized pattern near the root canal. The organic matrix demonstrated loss of dentin structure. In C, D, F, G and H the organic matrix showed uniformness of fibrillar network. All figures have the same magnification (200x).

Table 2. Maximum and minimum value, standard deviation and point estimate for optic retardation variable (nm)*

Group	Irrigation Protocols	OR minimum	OR Maximum	Point estimate	Standard Deviation	
1	Sodium chloride solution	35.43	43.82	39.63	5.45	A
2	NaOCl + EDTA	15.33	18.69	17.01	2.35	C
3	NaOCl+ EDTA + AA	30.60	36.80	33.70	4.33	B
4	NaOCl+ EDTA + AS	34.36	37.55	35.95	2.23	AB
5	NaOCl	19.91	21.94	20.93	1.42	C
6	EDTA	32.87	37.09	34.98	2.95	AB
7	AA	34.42	41.41	37.92	4.89	AB
8	AS	34.54	39.08	36.81	3.18	AB

NaCl, sodium chloride; NaOCl, sodium hypochlorite; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; AA, ascorbic acid; SA, sodium ascorbate.

*Means followed by the same letter did not show any statistical significant difference.

Quantitative analysis of organic matrix (Absorbance assay)

The groups 2, 3 and 5 were submitted to quantitative analysis of organic matrix. The results obtained indicate that groups treated with 5.25% sodium hypochlorite, whether associated or not associated with 17% EDTA (G2 and G5), were statistically different from the control group ($p < 0.05$) (Table 3). These findings confirmed the loss of collagen dentin. The analysis of the images obtained for group 3 revealed no differences in absorbance ($p > 0.05$) when compared to control group.

Table 3. Quantitative analysis of organic matrix (Absorbance assay). Medians, maximum and minimum values and medium posts

Groups	Medians	Minimum values (%)	Maximum values (%)	Medium posts
1	36.92	26.08	48.75	27.70 ^a
2	49.99	42.39	59.45	10.80 ^b
3	30.40	23.98	38.69	32.40 ^a
5	49.61	39.55	59.82	11.10 ^b

Different letters in superscript mean statistically significant difference - Kruskal Wallis and Dunn tests ($p < 0.05$).

Discussion

Developments in adhesive dentistry created new opportunities for the restoration of endodontically treated teeth. However, some studies showed that bond strengths of some adhesives were compromised by the use of the sodium hypochlorite solution, the most widely endodontic irrigant used (Prati *et al.*, 1999; Ishizuka *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2006). Sodium hypochlorite breaks down to sodium chloride and oxygen. Oxygen demonstrated a negative effect on polymerization of the adhesive system that caused reduction of bond strength (Prati *et al.*, 1999; Celik *et al.*, 2010).

Besides, there are the formation of chloramines and protein-derived radical intermediates (Hawkins and Davies, 1999). The presence of these reactive residual free-radicals in sodium hypochlorite treated dentin may compete with the propagating vinyl free radicals generated during light-activation of the adhesive, resulting in premature chain termination and incomplete polymerization (Lai *et al.*, 2001). If decreased bond strength to NaOCl-treated dentin is the result of the oxidizing effect of this irrigant, it may be possible to reverse this reaction by a biocompatible antioxidant (Morris *et al.*, 2001; Celik *et al.*, 2010).

Sodium hypochlorite solution has also others injurious effects and that it alters the organic components of dentin, specially collagen (Nikaido *et al.*, 1999). In previous work (Moreira *et al.*, 2009), it was possible to observe that 5.25% NaOCl, whether associated or not associated with 17% EDTA, causes alterations in the dentin collagen by a quantitative analysis of birefringence by PLM. Thus, this present work intended to evaluate the effect of 10% ascorbic acid or 10% sodium ascorbate application after 5.25% NaOCl and 17% EDTA irrigation in the birefringence of the dentin collagen.

The results of the current study show that bovine root dentin is a structure with weak birefringence. Collagen molecules in dentin do not have a preferential orientation, which can be shown by a uniform brightness that does not change when the slides are rotated. When bovine root dentin was exposed to 5.25% NaOCl for 30 minutes, whether it was associated or not to 17% EDTA, a

morphologic disorganization and structure loss of the dentin organic matrix was observed closer to the root canal. This was confirmed by the low optical retardation measurement values. These results are according to Moreira *et al* (2009). It was also possible to confirm structure loss by absorbance assay in groups 2 and 5. This procedure was proposed to exclude the possibility of presence of non-birefringent collagen fibrils in PLM.

Sodium hypochlorite is an efficient organic solvent that causes dentin degeneration because of the dissolution of collagen by breaking down bonds between carbon atoms and disorganizing the proteic primary structure (Ishizuka *et al.*, 2001). The dentin collagen matrix is highly cross-linked. Cross-linking is believed to be one of the major factors that characterize the calcifiability of dentin and bone collagens (Kuboki *et al.*, 1993). Pyridinoline cross-links are of particular importance because their function is to help maintain the structure of the collagen fibrils and make them more resistant to collagenolysis or proteolytic degradation.

According to Daumer *et al* (2000), pyridinoline cross-links that occur in collagen types I and II can be disrupted by sodium hypochlorite. They also suggest that oxidation and disruption of the pyridinoline cross-links could result in the loss of functional interactions of collagens, destabilization of the structural integrity of collagen fibrils, and/or an increase in the susceptibility of collagen to proteolytic degradation. Any of these changes would result in potentially irreversible damage of the tissue.

Other relevant consideration concerns to certain staining conditions required for Sirius red use. The staining depends on the structure of dyes and the free spaces available in proteins (Puchtler *et al.*, 1988). Sodium hypochlorite solution blocks amino groups by chlorination and this fact reduces the uptake of the dye to 15%. This finding suggests that the interaction between collagen and Sirius red is due to mainly to the reaction of its sulphonic acid groups with the basic groups of collagen (Junqueira *et al.*, 1979). Thus, in the current study, the low optical retardation measurement values could be a result of the disorganization and dissolution of collagen with consequent alterations of staining conditions.

The results obtained from the samples in which 10% ascorbic acid or 10% sodium ascorbate were used after 5.25% sodium hypochlorite and 17% EDTA irrigation, showed some areas with the normal morphologic pattern of bovine dentin structure observed by PLM and others with a slightly less organized pattern than samples in which 5.25% sodium hypochlorite and 17% EDTA were used without an antioxidant solution. The measurement of the optical retardations of group 4 indicated that this group was not statistically different from the control group. Although the measurement of the optical retardations of group 3 was statistically different from the control group, the results were significantly higher than group 2. The acidic pH might have caused this different behavior from sodium ascorbate. Otherwise, group 3 was not statistically different from the control group in the absorbance assay. Perhaps, the protein loss was not enough to differ from the control group.

The antioxidant ability of ascorbic acid and its salt in biological systems was previously reported (Carr *et al.*, 2000; Lai *et al.*, 2001; Morris *et al.*, 2001; Weston *et al.*, 2007). Ascorbic acid and its sodium salts are capable of reducing a variety of oxidative compounds, among them free radicals, by the ability of these reducing agents to donate two high-energy electrons, decreasing the concentration of radicals and the extent of protein fragmentation (Hawkins & Davies, 1999; VanDuijn *et al.*, 2000). It is possible that ascorbic acid and sodium ascorbate minimize the sodium hypochlorite residual effects, especially N-chloramines that exhibit a much longer effective lifetime (Smallwood, 1994; Daumer *et al.*, 2000). Besides, these reducing agents could restore the optimal staining conditions for Sirius red.

Application of 17% EDTA alone did not promote morphologic structure alterations of the dentin organic matrix by PLM. The optical retardation values were not statistically different from the control group. Although EDTA does not have the capacity to dissolve organic tissues, changes in the mineral content ratio may alter the original proportion of organic and inorganic components, which in turn reduces the microhardness, increases the permeability and solubility of the root canal

dentin, and inhibits resistance to bacterial ingress and permitting coronal leakage (Rotstein *et al.*, 1996; Ballal *et al.*, 2010).

The application of 10% ascorbic acid and 10% sodium ascorbate alone did not also promote morphologic structure alterations of the dentin organic matrix. The optical retardation values were similar to 17% EDTA and control groups. However, there is no reason in the scientific literature for the use of ascorbic acid or its salt without a previous sodium hypochlorite treatment. According to Lai *et al* (2001), application of sodium ascorbate alone did not improve the bond strengths of both Single Bond and Excite to etched dentin.

Therefore, it is possible to conclude that 5.25% NaOCl, whether associated or not associated with 17% EDTA, causes alterations of dentin collagen detected by alteration of birefringence. The absorbance assay confirmed significant reduction in the amount of protein in the organic matrix. These alterations created changes in chemical properties of the dentin collagen, reducing the ability of Sirius red to bind with collagen fibril molecules. The reductions in the optical retardations values could be reversed by the application of either 10% ascorbic acid or 10% sodium ascorbate after 5.25% sodium hypochlorite and 17% EDTA irrigation.

References

1. Ari H, Yaşar E, Belli S. Effects of NaOCl on bond strengths of resin cements to root canal dentin. *J Endod.* 2003 Apr;29(4):248-51.
2. Ballal NV, Mala K, Bhat KS. Evaluation of the effect of maleic acid and ethylenediaminetetraacetic Acid on the microhardness and surface roughness of human root canal dentin. *J Endod.* 2010 Aug;36(8):1385-8. Epub 2010 Jun 14.
3. Byström A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in the endodontic therapy. *Scand Dent Res* 1981;89:321-8.
4. Carr AC, Tijerina T, Frei B. Vitamin C protects against and reverses specific hypochlorous acid- and chloramine-dependent modifications of low-density lipoprotein. *Biochem J.* 2000; 346(Pt 2):491-499.
5. Celik C, Erkut S, Gulsahi K, Yamanel K, Kucukesmen C. Effect of sodium ascorbate on bond strength of different adhesive systems to NaOCl-treated dentin. *Aust Endod J.* 2010 Apr;36(1):12-8.
6. Constantine VS, Mowry RW. Selective staining of human dermal collagen. II—The use of Picosirius Red F3BA with polarization microscopy. *J Invest Dermatol* 1968;50: 419–23.
7. da Cunha LF, Furuse AY, Mondelli RF, Mondelli J. Compromised bond strength after root dentin deproteinization reversed with ascorbic acid. *J Endod.* 2010 Jan;36(1):130-4.
8. Daumer KM, Khan AU, Steinbeck MJ. Chlorination of pyridinium compounds. Possible role of hypochlorite, N-chloramines, and chlorine in the oxidation of pyridinoline cross-links of articular cartilage collagen type II during acute inflammation. *J Biol Chem.* 2000 Nov 3;275(44):34681-92.
9. do Espírito Santo AR, Novaes PD, Line SRP. Anisotropic properties of enamel organic extracellular matrix. *Eur J Oral Sci.* 2006; 114(Suppl. 1): 333-337.

10. Hawkins CL, Davies MJ. Hypochlorite-induced oxidation of proteins in plasma: formation of chloramines and nitrogen-centred radicals and their role in protein fragmentation. *Biochem J.* 1999 Jun 1;340 (Pt 2):539-48.
11. Ishizuka T, Kataoka H, Yoshioka T, Suda H, Iwasaki N, Takahashi H, Nishimura F. Effect of NaOCl treatment on bonding to root canal dentin using a new evaluation method. *Dent Mater J* 2001; 20: 24–33.
12. Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J.* 1979; 11(4): 447- 455.
13. Kishen A, Sum CP, Mathew S, Lim CT. Influence of irrigation regimens on the adherence of *Enterococcus faecalis* to root canal dentin. *J Endod* 2008;34: 850–4.
14. Kuboki Y, Okuguchi M, Takita H, Kimura M, Tsuzaki M, Takakura A, Tsunazawa S, Sakiyama F, Hirano H. Amino-terminal location of pyridinoline in dentin collagen. *Connect Tissue Res.* 1993;29(2):99-110.
15. Lai SC, Mak YF, Cheung GS, Osorio R, Toledano M, Carvalho RM, Tay FR, Pashley DH. Reversal of compromised bonding to oxidized etched dentin. *J Dent Res.* 2001; 80(10):1919-24.
16. Marending M, Paque´ F, Fischer J, et al. Impact of irrigant sequence on mechanical properties of human root dentin. *J Endod* 2007;33:1325–8.
17. Moreira DM, Almeida JF, Ferraz CC, Gomes BP, Line SR, Zaia AA. Structural analysis of bovine root dentin after use of different endodontics auxiliary chemical substances. *J Endod.* 2009; 35(7):1023-7.
18. Morris MD, Lee KW, Agee KA, Bouillaguet S, Pashley DH. Effects of sodium hypochlorite and RC-Prep on bond strengths of resin cement to endodontic surfaces. *J Endod.* 2001; 27: 753-57.
19. Nagpal R, Tewari S, Gupta R. Effect of various surface treatments on the microleakage and ultrastructure of resin-tooth interface. *Oper Dent.* 2007 Jan-Feb;32(1):16-23.

20. Nikaido T, Takano Y, Sasafuchi Y, *et al.* Bond strengths to endodontically-treated teeth. *Am J Dent* 1999;12:177–80.
organic extracellular matrix. *Eur J Oral Sci* 2006;114:333–7.
21. Pearse AGE. *Histochemistry: theoretical and applied*. 3rd ed. London: Churchill Livingstone;1972.
22. Peters OA, Laib A, Gohring TN *et al.* Changes in root canal geometry after preparation assessed by high resolution computed tomography. *J Endod* 2001 27: 1-6.
23. Piérard GE. Sirius red polarization method is useful to visualize the organization of connective tissues but not the molecular composition of their fibrous polymers. *Matrix* 1989;9:68–71.
24. Prati C, Chersoni S, Pashley DH. Effect of removal of surface collagen fibrils on resin-dentin bonding. *Dent Mater* 1999; 15 (5): 323–31.
25. Puchtler H, Meloan SN, Waldrop FS. Are micro-dye reactions for collagens quantitative? Chemical and histochemical considerations. *Histochemistry*. 1988;88(3-6):243-56.
26. Rotstein I, Dankner E, Goldman A, *et al.* Histochemical analysis of dental hard tissues following bleaching. *J Endod* 1996;22:23–6.
27. Rueggeberg FA, Margeson DH. The effect of oxygen inhibition on an unfilled/filled composite system. *J Dent Res* 1990;69:1652–8.
28. Santos JN, Carrilho MR, de Goes MF, *et al.* Effect of chemical irrigants on the bond strength of a self-etching adhesive to pulp chamber dentin. *J Endod* 2006;32:1088–90.
29. Slutzky-Goldberg I, Maree M, Liberman R *et al.* Effect of sodium hypochlorite on dentin microhardness. *J Endod* 2004 30:880-882
30. Smallwood CL. Drinking water criteria document for chloramines. Health and Ecological Criteria Division: Office of Science and Technology: Office of Water. Technical Support Services. Cincinnati: Environmental Criteria and Assessment Office; 1994.

31. Torabinejad M, Handysides R, Khademi A, Bakland L. Clinical implications of the smear layer in endodontics: a review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002;94:658–66.
32. VanDuijn MM, Tijssen K, VanSteveninck J, Van Den Broek PJ, Van Der Zee J. Erythrocytes reduce extracellular ascorbate free radicals using intracellular ascorbate as an electron donor. *J Biol Chem*. 2000; 275:27720-27725.
33. Vilarta R, Vidal BC. Anisotropic and biomechanical properties of tendons modified by exercise and denervation: aggregation and macromolecular order in collagen bundles. *Matrix* 1989;9:55–61.
34. Weston CH, Ito S, Wadgaonkar B, Pashley DH. Effects of time and concentration of sodium ascorbate on reversal of NaOCl-induced reduction in bond strengths. *J Endod*. 2007 Jul;33(7):879-81. Epub 2007 May 11.
35. Zehnder M. Root canal irrigants. *J Endod* 2006;32:389 –98.

Capítulo 2

Effects of reducing agents and endodontics auxiliary chemical substances on mechanical properties of bovine root dentin

ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate the effect of 10% ascorbic acid or 10% sodium ascorbate application after 5.25% NaOCl and 17% EDTA irrigation in the mechanical properties of dentin. Eighty bovine incisors were randomly divided into eight groups (n=10): G1 (Control): 0.9% Sodium Chloride; G2: 5.25% NaOCl + 17% EDTA; G3: 5.25% NaOCl + 17% EDTA + 10% ascorbic acid; G4: 5.25% NaOCl + 17% EDTA + 10% sodium ascorbate; G5: 5.25% NaOCl; G6: 17% EDTA; G7: 10% ascorbic acid; G8: 10% sodium ascorbate. Teeth were chemomechanically prepared and submitted to Knoop microhardness. Standardized plano-parallel dentin bars were prepared and randomly divided into the same eight groups (n=15) cited above. The dentin bars were then loaded to failure in a three-point bending test. The results indicated that 5.25% NaOCl reduced the microhardness of dentin in all distances tested. The microhardness values increased in all distances when sodium ascorbate was used (G4). There was improvement only until 200 μ m depth when 10% ascorbic acid was used after 5.25% NaOCl and 17% EDTA irrigation. Exposure to 17% EDTA used for 3 minutes decreased the microhardness value until 100 μ m depth. By exposing the dentin bars to 5.25% NaOCl, whether it was associated or not to 17% EDTA, (G2 and G5) the flexural strength decreased. However, values increased when 10% ascorbic acid or 10% sodium ascorbate were used after 5.25% NaOCl and 17% EDTA irrigation. Therefore, it is possible to conclude that NaOCl solution significantly reduced the Knoop microhardness of root canal dentin and it may penetrate deeper into the intact dentin. Nevertheless, 10% sodium ascorbate application after 5.25% NaOCl and 17% EDTA irrigation reversed the low Knoop

microhardness values. It was found that 5.25% NaOCl and 17% EDTA irrigation significantly affect flexural strength. Data indicated that 10% ascorbic acid and 10% sodium ascorbate reversed the low flexural strength values.

Key words: Auxiliary chemical solutions, reducing agents, mechanical properties

Introduction

Knowledge of the mechanical properties of dentin is important for understanding how masticatory strains are distributed throughout a tooth, and for predicting how stresses and strains are altered by dental restorative procedures, endodontic procedures, age and disease. Besides, based on the combination of its constituents and its specific geometry, dentin is considered an anisotropic substrate structurally (Huo, 2005; Plotino *et al.*, 2007).

Microhardness is defined as the resistance to local deformation and its tests are based on the induced permanent surface deformation that remains after removal of the load (Fuentes *et al.*, 2003). This test determination can provide indirect evidence of mineral loss or gain in the dental hard tissues (Ari *et al.*, 2004; Sayin *et al.*, 2007). The flexural strength parameter determines the resistance to fracture of a sample. Higher values indicate that a sample is more resistant to fracture, lower values that it is less so. The flexural strength is determined by the highest load a sample can withstand and depends on the specimen configuration (Plotino *et al.*, 2007).

Previous studies reported that mechanical properties such as hardness, flexural strength, and elastic modulus of dentin were significantly reduced with the use of sodium hypochlorite and EDTA (Grigoratos *et al.*, 2001; Mareending *et al.*, 2007; Sayin *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2007). Sodium hypochlorite (NaOCl), in different concentrations, has been the most widely recommended irrigant solution (Zehnder, 2006). This solution has injurious effects and it alters the organic components of dentin, specially collagen, which contributes considerably to the mechanical properties of dentin (Slutzky-Goldberg *et al.*, 2004; Mareending *et al.*, 2007; Moreira *et al.*, 2009).

Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) is another substance often used with NaOCl as chelating agent to rid the root canal system of the smear layer. This process can cause changes in the microstructure of the dentin and changes in the calcium to phosphorus ratio. Changes in the mineral content ratio may alter the

original proportion of organic and inorganic components, which in turn modifies some properties of dentin (Rotstein *et al.*, 1996; Ballal *et al.*, 2010).

Ascorbic acid and its sodium salts are well-known antioxidants and are capable of reducing a variety of oxidative compounds, especially free radicals by the ability of these reducing agents to donate two electrons, decreasing the concentration of radicals and the extent of protein fragmentation (Hawkins & Davies, 1999; VanDuijn *et al.*, 2000). The antioxidant ability of ascorbic acid and sodium ascorbate to neutralize and reverse the oxidizing effects of sodium hypochlorite on bond strength of enamel and dentin, by restoring the altered redox potential of the oxidized bonding substrate, it has been already known (Morris *et al.*, 2001; Nagpal *et al.*, 2007; da Cunha *et al.*, 2010).

However, there is little information about the benefits of use of ascorbic acid and its salt in endodontic procedures. Thus, the aim of the present study is to evaluate the effect of 10% ascorbic acid or 10% sodium ascorbate application after 5.25% NaOCl and 17% EDTA irrigation in the mechanical properties of dentin.

Material and Methods

Knoop Microhardness

Eighty bovine incisors, stored in a 0.2% thymol solution and frozen to maintain freshness, were selected for this study. The teeth were randomly divided into eight groups (n=10) according to the auxiliary chemical substance employed: G1(Control): 0.9% Sodium Chloride; G2: 5.25% sodium hypochlorite (NaOCl) + 17% ethylenediaminetetraacetic (EDTA); G3: 5.25% NaOCl + 17% EDTA + 10% ascorbic acid; G4: 5.25% NaOCl + 17% EDTA + 10% sodium ascorbate; G5: 5.25% NaOCl; G6: 17% EDTA; G7: 10% ascorbic acid; G8: 10% sodium ascorbate.

The teeth were prepared according to Moreira *et al.* (2009). The apexes of the teeth were sealed with wax (Wilson, Polidental Indústria e Comércio Ltda, Cotia, SP, Brasil) and the whole outer surface of the tooth was covered with a layer of cianoacrylate (Super Bonder®-Loctite, Itapevi, SP, Brasil).

Crowns were separated from roots by a horizontal cut made 3mm under the amelocemental junction with a carborundum disc (Vipi, Pirassununga, SP, Brasil). The root samples were fixed with wax and screwed to a metallic apparatus. To prevent any leakage of endodontic irrigants around the external surface of the root, a polyether impression material (Impregum® Soft, 3M ESPE, Sumaré, SP, Brasil) was used to seal the area around the root canal entrance and the metallic apparatus.

Pulp tissue and predentine were removed using #6 Gates-Glidden burs (Maillefer, Ballaigues, VD, Switzerland) and a #130 file (Maillefer, Ballaigues, VD, Switzerland). During instrumentation, irrigation protocols were performed according to the previously specified groups. All groups used a total volume of 10 ml for irrigation.

All root canals were then filled with the respective auxiliary chemical substances for different periods of time as shown in Table 1:

Table 1. Irrigation times and protocols for tested auxiliary chemical substances

Irrigation protocols		Total time of auxiliary chemical substance in contact with root canal
Group 1	0.9% sodium chloride solution	30 min
Group 2	5.25% sodium hypochlorite + 17% EDTA	30 min 3 min
Group 3	5.25% sodium hypochlorite + 17% EDTA + 10% ascorbic acid	30 min 3 min 10 min
Group 4	5.25% sodium hypochlorite + 17% EDTA + 10% sodium ascorbate	30 min 3 min 10 min
Group 5	5.25% sodium hypochlorite	30 min
Group 6	17% EDTA	3 min
Group 7	10% ascorbic acid	10 min
Group 8	10% sodium ascorbate	10 min

Five milliliters of sodium chloride was used followed by the renewal of the sodium hypochlorite (pH 11.2) and sodium chloride (pH 6) solutions every 3 minutes and 1.5 minute for EDTA (pH 7.4) solution during the period in which the auxiliary chemical substances were placed in contact with the root canal dentin. After rinsing with 10 ml of sodium chloride, the canals were drying with Capillary Tips (Ultradent Products Inc, South Jordan, Utah, USA) and paper points. Then, the samples were rinsed with 10 ml of freshly prepared 10% ascorbic acid (pH 2.05) or 10% sodium ascorbate (pH 7.15) for 10 min, followed by the renewal of the solutions every 5 minutes and a final rinsing with 10 ml of sodium chloride. Samples were stored in 10% formaldehyde for 48 hours.

After this period, each sample was cut transversally and standardized in 7 mm length, corresponding to medium third of root canal. Each 7 mm – sample was embedded in polystyrene resin to facilitate handling and microhardness testing. The included sample were finished with wet 180-, 400-, 600- and 1,200-grit Al₂O₃ abrasive paper and then polished with 3, 1 and ¼ µm diamond paste (Arotec

Ind. Com., São Paulo, Brazil) using a polishing cloth. Microhardness was measured by means of a Knoop indenter under 50 g load and 20 seconds dwell time (HMV-2T, Shimadzu, Japan). Twenty-four indentations were made in each specimen, six in each side (buccal, lingual, mesial, distal) in the depth of 50,100, 200, 500, 1,000 and 1,500 μm from root canal. The orientation of the dentinal tubules was perpendicular to the direction of indenter and was equal for all specimens. Values were converted into Knoop Hardness Numbers (KHN) and the average of the values was calculated.

One specimen was randomly selected from each group for surface morphology evaluation under a Scanning Electron Microscope (SEM) (Jeol-JSM 5600LV;Noran Instruments, Tokyo, Japan) operated at 15 kV.

Flexural strength

Preparation of dentin specimens

Forty bovine incisors, stored in a 0.2% thymol solution and frozen to maintain freshness, were selected for this study. Crowns were separated from roots by a horizontal cut made 3mm under the amelocemental junction with a carborundum disc (Vipi, Pirassununga, SP, Brasil). Plano-parallel dentin bars were prepared by using a precision saw machine (Isomet 1000; Buhler Ltd, Lake Bluff, IL). These resulted in 2.00 X 2.00 mm dentin bars at least 10.00 mm long. The dentin bars were stored in distilled water solution until further usage.

Treatment of dentin bars with test solutions

The dentin bars were randomly divided into eight groups (n=15) according to the auxiliary chemical substance employed: G1(Control): 0.9% Sodium Chloride; G2: 5.25% sodium hypochlorite (NaOCl) + 17% ethylenediaminetetraacetic (EDTA); G3: 5.25% NaOCl + 17% EDTA + 10% ascorbic acid; G4: 5.25% NaOCl + 17% EDTA + 10% sodium ascorbate; G5:

5.25% NaOCl; G6: 17% EDTA; G7: 10% ascorbic acid; G8: 10% sodium ascorbate. Specimens were immersed individually in containers containing 5 mL of the respective solutions at 37°C and were kept in orbital shaker table during the experimental sequence, according to the different periods of time as shown in Table 1.

Five milliliters of sodium chloride was used followed by the renewal of the sodium hypochlorite (pH 11.2) and sodium chloride (pH 6) solutions every 3 minutes, 5 minutes for ascorbic acid (pH 2.05) and sodium ascorbate (pH 7.15) and 1.5 minute for EDTA (pH 7.4) solution during the period in which the auxiliary chemical substances were placed in contact with the root canal dentin. A final rinsing with 10 ml of sodium chloride was realized.

Three-Point Bending Test

Mechanical tests were performed with a universal testing machine (Instron 4411, Norwood, MA, EUA) directly after treatment with test and control solutions. A specimen holder with 2 cylindrical supports and a span of 8 mm was used. The orientation of the dentinal tubules was perpendicular to the direction of load and was equal for all specimens. The cross-head speed of the testing machine was set to 0.5 mm/min, and the bars were tested until failure. Flexural strength (MPa) was calculated using the Bluehill 2 software (Instron Corporation, Norwood, MA, EUA).

Statistical analysis

Data of the three tests were statistically analyzed by using parametric statistical methods and submitted to Fisher's analysis of variance. Multiple comparison were made using Tukey's honest significance difference test at $\alpha=0.05$.

Results

Knoop microhardness

The results of Knoop microhardness among the different experimental groups at the different distances of the root canal dentin are demonstrated in Figure 1. The distribution of mean values showed a similar behavior among the different experimental groups in which the microhardness values found nearest to the pulp are lower than in the peripheral dentin. There was no significant difference within the groups, from 1000 μm until 1500 μm depth.

The results obtained indicate that groups treated with 5.25% sodium hypochlorite (G2, G3 and G5) were statistically different from the control group in almost all distances (Table 2). The microhardness values were not statistically different between G1 and G2 at 200 μm depth and between G1 and G5 at 50 μm depth. The data indicated a statistically significant difference between the KHN values of the G2 and G3 until 200 μm (Table 2). After this distance, there was no significant difference between these groups. However, the microhardness values increased in all distances when sodium ascorbate was used after 5.25% sodium hypochlorite and 17% EDTA irrigation (G4).

Root canal irrigation with 17% EDTA (G6) decreased the microhardness value until 100 μm depth while changes in microhardness were found in all distances at G7. There was no significant difference to the control group when sodium ascorbate was used alone (G8). Only at 500 μm depth, when sodium ascorbate had higher mean value than G1.

All groups tested with 17% EDTA (groups 2, 3, 4 and 6) revealed regions of structural loss near the root canal in the SEM images. The loss of dentin appeared as a decrease of intertubular dentin and a consequent enlargement of the dentin canaliculi created by the demineralizing property of this substance. SEM images of groups 3 and 4 showed crystals adsorbed to the root dentin (Figure 2).

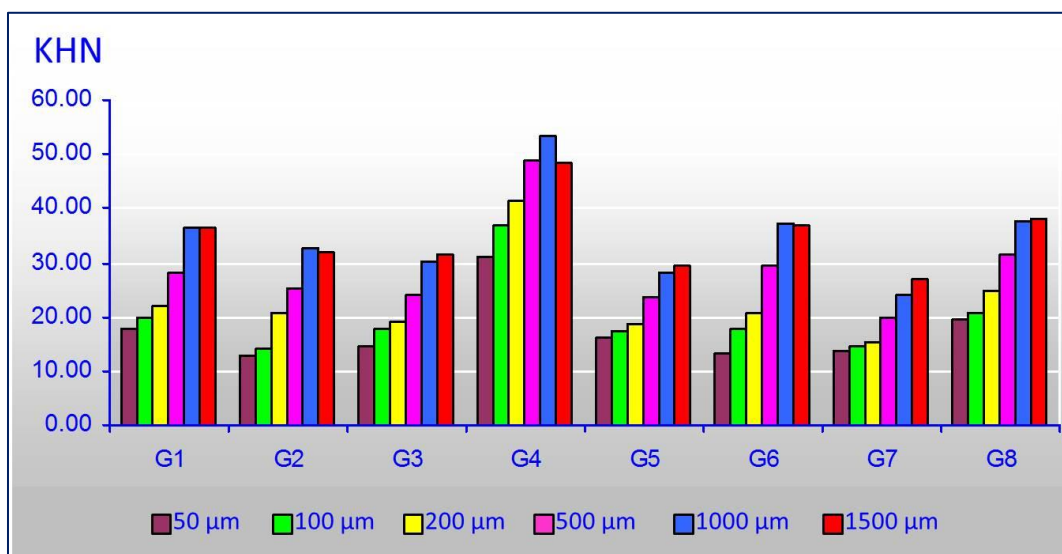


Figure 1 – Distribution of mean Knoop microhardness values of different experimental groups at the different distances of the root canal dentin.

Table 2 – Mean KHN values of different experimental at the different distances of the root canal system

	50μm	100μm	200μm	500μm	1000μm	1500μm
G1	17.85 ^{bc,D}	20.05 ^{b,C}	21.79 ^{b,C}	28.31 ^{c,B}	36.41 ^{b,A}	36.24 ^{b,A}
G2	12.76 ^{e,D}	14.23 ^{d,D}	20.69 ^{bc,C}	25.43 ^{d,B}	32.52 ^{c,A}	31.88 ^{c,A}
G3	14.54 ^{d,D}	17.84 ^{c,CD}	19.02 ^{c,C}	23.85 ^{de,B}	30.30 ^{cd,A}	31.50 ^{c,A}
G4	31.04 ^{a,C}	36.71 ^{a,B}	41.24 ^{a,B}	48.90 ^{a,A}	53.20 ^{a,A}	48.28 ^{a,A}
G5	16.17 ^{c,C}	17.17 ^{c,C}	18.65 ^{c,C}	23.71 ^{e,B}	28.06 ^{d,AB}	29.33 ^{cd,A}
G6	13.43 ^{de,D}	17.90 ^{c,C}	20.70 ^{bc,C}	29.43 ^{bc,B}	37.26 ^{b,A}	36.89 ^{b,A}
G7	13.60 ^{d,D}	14.51 ^{d,CD}	15.44 ^{d,CD}	19.78 ^{f,BC}	24.16 ^{e,AB}	27.03 ^{d,A}
G8	19.33 ^{b,D}	20.73 ^{b,D}	24.78 ^{b,C}	31.60 ^{b,B}	37.74 ^{b,A}	38.21 ^{b,A}

Different capital letters for each line indicate that there was significant difference ($p < 0.05$).

Different minuscule letters for each column indicate that there was significant difference ($p < 0.05$).

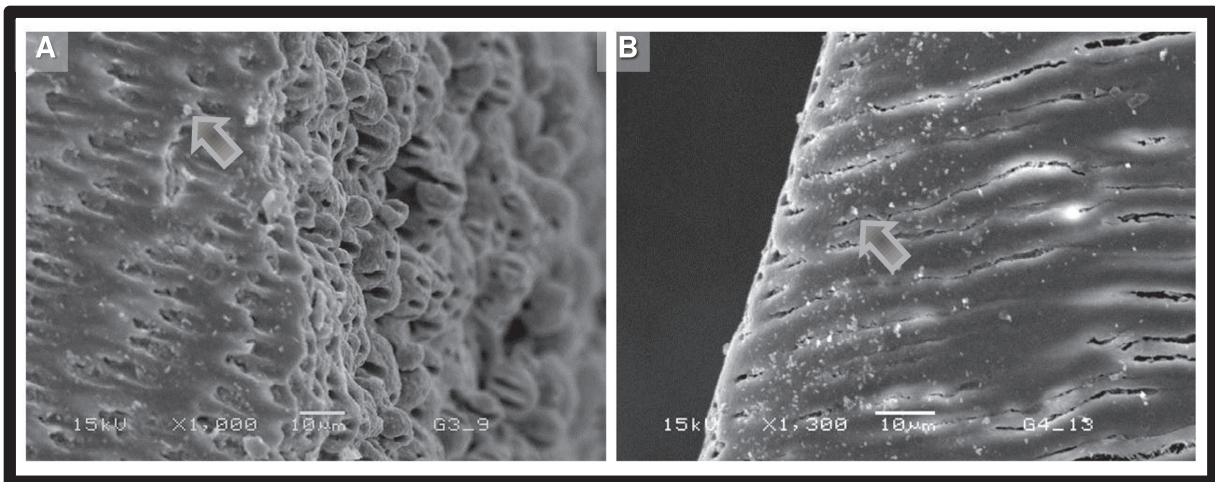


Figure 2 – SEM images (x1000). (A) Group 3 – 5.25% NaOCl + 17% EDTA + 10% ascorbic acid. (B) Group 4 – 5.25% NaOCl + 17% EDTA + 10% sodium ascorbate. Images showed crystals adsorbed to the root dentin (arrows).

Flexural strength

The means and standard deviations of the flexural strength calculated from the three-bending test are presented in Table 3. Statistical analysis showed a significant reduction in the flexural strength after treatment with 5.25% NaOCl, whether associated or not associated with 17% EDTA (G2 and G5). However, treatment of the dentin bars with 10% ascorbic acid after 5.25% sodium hypochlorite and 17% EDTA irrigation (G3) reversed the compromised flexural strength values and was not significantly different from the control group (G1).

Although the flexural strength of the dentin bars treated with 10% sodium ascorbate after 5.25% sodium hypochlorite and 17% EDTA irrigation (G4) had been significantly lower than control group, the mean value was higher than G2 and G5.

Data indicated that 17% EDTA and 10% sodium ascorbate (groups 6 and 8) were statistically different from the control group and the mean values were higher than G1. The flexural strength of 10% ascorbic acid (G7) was not statistically different from groups 1, 6 and 8.

Table 3 - Flexural strength values (means \pm standard deviations) of dentin bars after irrigation protocols

Group	Irrigation Protocols	Flexural strength (MPa)
1	Sodium chloride solution	191.57 \pm 23.40 ^b
2	NaOCl + EDTA	138.12 \pm 40.30 ^d
3	NaOCl+ EDTA + Ascorbic Acid	176.24 \pm 30.37 ^{bc}
4	NaOCl+ EDTA + Sodium ascorbate	155.74 \pm 34.49 ^c
5	NaOCl	140.00 \pm 41.27 ^d
6	EDTA	232.57 \pm 43.40 ^a
7	Ascorbic acid	212.80 \pm 52.65 ^{ab}
8	Sodium ascorbate	222.99 \pm 49.13 ^a

Identical superscript letters indicate that there was no significant difference.

Discussion

Success in endodontic therapy depends on chemomechanical debridement of the root canal system through the use of instruments and effective irrigating solutions (Saleh & Ettman, 1999; Ballal *et al.*, 2010). However, irrigant solutions used in endodontic therapy might yield changes in the chemical and physical properties of dentin (Grigoratos *et al.*, 2001; Marending *et al.*, 2007; Sayin *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2007).

Determination of microhardness can provide valuable evidence of mineral loss or gain in dental hard tissues with special regard to the effects of irrigating solutions on dentin hardness (Ari *et al.*, 2004; Sayin *et al.*, 2007). In our study, the Knoop microhardness test was used because previous studies have shown that the chief characteristic of this test is its sensitivity to surface effects and textures (Fuentes *et al.*, 2003; Kinney *et al.*, 2003).

There was a similar behavior among the different experimental groups in which the microhardness values found nearest to the pulp are lower than in the peripheral dentin. These results support previous findings indicating that dentin microhardness is location related, and its value is decreased as the indentations are closer to the pulp space (Slutzky-Goldberg *et al.*, 2004; Oliveira *et al.*, 2007). Pashley *et al.* (1985) reported an inverse correlation between dentin microhardness and tubular density and speculated that the decrease in hardness observed on approaching the pulp was due to increased tubule density or to possible changes in mineral density. Kinney *et al.* (1996), by means of a modified atomic force microscope, showed that the decrease in hardness as a function of depth was caused by a decrease in the stiffness of intertubular dentin matrix due to a heterogeneous distribution of the mineral phase within the collagen matrix. The fact that there was no significant difference in microhardness within the groups from the 1000 μm until 1500 μm depth probably is due to the stability of organic and inorganic proportion.

Root canal irrigation with 5.25% NaOCl reduced the microhardness of dentin in all distances tested. It is known that sodium hypochlorite solution and its

byproducts have injurious effects and that it alters the organic components of dentin, specially collagen, which contributes considerably to the mechanical properties of dentin (Nikaido *et al.*, 1999). The presence of N-chloramines in sodium hypochlorite treated dentin may diffuse a considerable distance and hence might cause damage at remote sites (Hawkins and Davies, 1999). This finding is according to previous studies (Saleh & Ettman, 1999; Slutzky-Goldberg *et al.*, 2004; Oliveira *et al.*, 2007).

It was found that 17% EDTA, a chelating agent, used for 3 minutes decreased the microhardness value until 100 μm depth. Several studies have shown that EDTA is capable of decreasing the microhardness of root canal dentin (Ari *et al.*, 2004; Ballal *et al.*, 2010). Changes in the mineral content ratio may alter the original proportion of organic and inorganic components, which in turn reduces the microhardness, increases the permeability and solubility of the root canal dentin, and inhibits resistance to bacterial ingress and permitting coronal leakage (Panighi & G'Sell, 1992; Rotstein *et al.*, 1996).

The microhardness values increased in all distances when sodium ascorbate was used after 5.25% sodium hypochlorite and 17% EDTA irrigation. It is possible that this reducing agent minimize the sodium hypochlorite residual effects, especially N-chloramines that exhibit much longer effective lifetime (~18 h) than HOCl. Besides, SEM images showed crystals adsorbed to the root dentin and these particles may contribute for the increasing Knoop microhardness. These particles were also observed in previous studies (Lai *et al.*, 2001; Oskoe *et al.*, 2010).

It was observed that there was improvement only until 200 μm depth when 10% ascorbic acid was used after 5.25% NaOCl and 17% EDTA irrigation. After this, microhardness mean values were not statistically different from G2. G3 was also statistically different from the control group in all distances. Changes in microhardness were also found in all distances at G7. It is possible that ascorbic acid may alter mineral content due to its low pH (2.05). This acidic pH might have caused demineralization of the root canal dentin and subsequent reduction in the

microhardness. In study realized by Lai *et al.* (2001), ascorbic acid did not use to avoid the potential double-etching effect of this mild acid on etched dentin. The authors preferred to use sodium ascorbate because its pH is neutral.

Other mechanical property tested in the present study was flexural strength. In general, flexural strength is mainly affected by flaws or alterations on a specimen's surface. By exposing the dentin surface to 5.25% NaOCl, whether it was associated or not to 17% EDTA, the surface structure is degraded, which might explain the decrease in flexural strength. This finding is according to previous studies (Sim *et al.*, 2001; Marending *et al.*, 2007; Mai *et al.*, 2010).

The decline in flexural strength is probably attributed to the generation of a brittle layer of apatite crystallites that are not supported by a structurally intact collagen matrix. It is well-known that the mineral component in hard connective tissues contributes to strength and elastic modulus, whereas the collagen component is responsible for toughness of the tissues (Wang *et al.*, 2001). Destruction of the collagen matrix in mineralized tissues results in a less tough, more brittle substrate that might precipitate fatigue crack propagation during cyclic stresses (Kruzic & Ritchie, 2008). This might increase the susceptibility of the root-treated teeth to post-treatment crown or root fracture.

The reduction in mean flexural strength in the NaOCl experimental group has to be interpreted with caution, as both sides of the dentin bars were simultaneously exposed to irrigants. According to Mai *et al.* (2010), clinically, it is expected a milder scenario with irrigants diffusing only from the pulpal side of the canal space. However, precaution must be taken to underestimate the extent of damage, as NaOCl may penetrate far deeper into the intact dentin, causing biochemical damage to the organic components of the mineralized collagen. This affirmative is in accordance with the present findings of the microhardness in which it was possible observed alterations until 1500 μm depth when NaOCl was used.

The flexural strength values increased when 10% ascorbic acid or 10% sodium ascorbate were used after 5.25% NaOCl and 17% EDTA irrigation. It is possible that ascorbic acid and sodium ascorbate, which decreased the

concentration of radicals and the extent of protein fragmentation, minimize the sodium hypochlorite detrimental effects, especially chloramines that are more persistent (Smallwood, 1994). The better behavior of ascorbic acid may be attributed to its acidic pH. This mild acid may remove the brittle layer of apatite crystallites that are not supported by a structurally intact collagen matrix. Thus, changes in the original proportion of organic and inorganic components may become the dentin bars more flexible when bended.

Data indicated that the mean values of 17% EDTA and 10% sodium ascorbate were higher than G1. However, the rationale for this occurrence is still unclear. Previous study observed that flexural strength of dentin did not decline after treatment with 17% EDTA only (Zhang *et al.*, 2010).

Therefore, the NaOCl solution significantly reduced the microhardness of root canal dentin and it may penetrate deeper into the intact dentin. Nevertheless, 10% sodium ascorbate application after 5.25% NaOCl and 17% EDTA irrigation reversed the low Knoop microhardness values. It was found that 5.25% NaOCl and 17% EDTA irrigation significantly affect flexural strength. Data indicated that 10% ascorbic acid and 10% sodium ascorbate reversed the low flexural strength values.

It is important to notice that 10% sodium ascorbate application to dentin surfaces for 10 min showed benefits, but in clinical conditions this time is impractical. Further studies should be undertaken on the effect of sodium ascorbate on the properties of dentin by chemical analytical methods and the minimum application time necessary.

References

1. Ari H, Erdemir A, Belli S. Evaluation of the effect of endodontic irrigation solutions on the microhardness and the roughness of root canal dentin. *J Endod* 2004;30: 792–5.
2. Ballal NV, Mala K, Bhat KS. Evaluation of the effect of maleic acid and ethylenediaminetetraacetic Acid on the microhardness and surface roughness of human root canal dentin. *J Endod*. 2010 Aug;36(8):1385-8. Epub 2010 Jun 14.
3. da Cunha LF, Furuse AY, Mondelli RF, Mondelli J. Compromised bond strength after root dentin deproteinization reversed with ascorbic acid. *J Endod*. 2010 Jan;36(1):130-4.
4. Fuentes V, Toledano M, Osorio R, Carvalho RM. Microhardness of superficial and deep sound human dentin. *J Biomed Mater Res A*. 2003 Sep 15;66(4):850-3.
5. Grigoratos D, Knowles J, Ng YL, Gulabivala K. Effect of exposing dentine to sodium hypochlorite and calcium hydroxide on its flexural strength and elastic modulus. *Int Endod J*. 2001 Mar;34(2):113-9.
6. Hawkins CL, Davies MJ. Hypochlorite-induced oxidation of proteins in plasma: formation of chloramines and nitrogen-centred radicals and their role in protein fragmentation. *Biochem J*. 1999 Jun 1;340 (Pt 2):539-48.
7. Huo B. An inhomogeneous and anisotropic constitutive model of human dentin. *Journal of Biomechanics* 38 (2005) 587–594.
8. Kinney JH, Balooch M, Marshall SJ, Marshall GW, Weih TM. Atomic force microscope measurements of the hardness and elasticity of peritubular and intertubular human dentin. *J Biomech Eng* 1996;118:133–135.
9. Kinney JH, Marshall SJ, Marshall GW. The mechanical properties of human dentin: a critical review and re-evaluation of the dental literature. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2003;14(1):13-29.
10. Kruzic JJ, Ritchie RO. Fatigue of mineralized tissues: cortical bone and dentin. *J Mech Behav Biomed Mater* 2008;1:3–17.

11. Lai SC, Mak YF, Cheung GS, Osorio R, Toledano M, Carvalho RM, Tay FR, Pashley DH. Reversal of compromised bonding to oxidized etched dentin. *J Dent Res*. 2001; 80(10):1919-24.
12. Mai S, Kim YK, Arola DD, Gu LS, Kim JR, Pashley DH, Tay FR. Differential aggressiveness of ethylenediamine tetraacetic acid in causing canal wall erosion in the presence of sodium hypochlorite. *J Dent*. 2010 Mar;38(3):201-6. Epub 2009 Oct 21.
13. Marending M, Paque´ F, Fischer J, et al. Impact of irrigant sequence on mechanical properties of human root dentin. *J Endod* 2007;33:1325–8.
14. Moreira DM, Almeida JF, Ferraz CC, Gomes BP, Line SR, Zaia AA. Structural analysis of bovine root dentin after use of different endodontics auxiliary chemical substances. *J Endod*. 2009; 35(7):1023-7.
15. Morris MD, Lee KW, Agee KA, Bouillaguet S, Pashley DH. Effects of sodium hypochlorite and RC-Prep on bond strengths of resin cement to endodontic surfaces. *J Endod*. 2001; 27: 753-57.
16. Nagpal R, Tewari S, Gupta R. Effect of various surface treatments on the microleakage and ultrastructure of resin-tooth interface. *Oper Dent*. 2007 Jan-Feb;32(1):16-23.
17. Nikaido T, Takano Y, Sasafuchi Y, *et al*. Bond strengths to endodontically-treated teeth. *Am J Dent* 1999;12:177–80.
18. Oliveira LD, Carvalho CA, Nunes W, Valera MC, Camargo CH, Jorge AO. Effects of chlorhexidine and sodium hypochlorite on the microhardness of root canal dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2007 Oct;104(4):e125-8. Epub 2007 Jul 26.
19. Oskoe PA, Navimipour EJ, Oskoe SS, Moosavi N. Effect of 10% sodium ascorbate on bleached bovine enamel surface morphology and microhardness. *Open Dent J*. 2010 Oct 21;4:207-10.
20. Panighi M, G'Sell C. Influence of calcium concentration on the dentine wettability by an adhesive. *J Biomed Mater Res* 1992;26:1081–9.

21. Pashley D, Okabe A, Parham P. The relationship between dentin microhardness and tubule density. *Endod Dent Traumatol* 1985;1:176-9.
22. Plotino G, Grande NM, Bedini R, Pameijer CH, Somma F. Flexural properties of endodontic posts and human root dentin. *Dent Mater*. 2007 Sep;23(9):1129-35. Epub 2006 Nov 20.
23. Rotstein I, Dankner E, Goldman A, et al. Histochemical analysis of dental hard tissues following bleaching. *J Endod* 1996;22:23–6.
24. Saleh AA, Ettman WM. Effect of endodontic irrigation solutions on microhardness of root canal dentine. *J Dent* 1999;27: 43-6.
25. Sayin TC, Serper A, Cehreli ZC, Otlu HG. The effect of EDTA, EGTA, EDTAC, and tetracycline-HCl with and without subsequent NaOCl treatment on the microhardness of root canal dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2007 Sep;104(3):418-24.
26. Sim TP, Knowles JC, Ng YL, Shelton J, Gulabivala K. Effect of sodium hypochlorite on mechanical properties of dentine and tooth surface strain. *Int Endod J*. 2001; 34(2):120-32.
27. Slutzky-Goldberg I, Maree M, Liberman R, Heling I. Effect of sodium hypochlorite on dentin microhardness. *J Endod* 2004; 30:880-2.
28. Smallwood CL. Drinking water criteria document for chloramines. Health and Ecological Criteria Division: Office of Science and Technology: Office of Water. Technical Support Services. Cincinnati: Environmental Criteria and Assessment Office; 1994.
29. VanDuijn MM, Tijssen K, VanSteveninck J, Van Den Broek PJ, Van Der Zee J. Erythrocytes reduce extracellular ascorbate free radicals using intracellular ascorbate as an electron donor. *J Biol Chem*. 2000; 275:27720-27725.
30. Wang X, Bank RA, TeKoppele JM, Agrawal CM. The role of collagen in determining bone mechanical properties. *J Orthop Res* 2001;19:1021–6.
31. Zhang K, Kim YK, Cadenaro M, Bryan TE, Sidow SJ, Loushine RJ, Ling JQ, Pashley DH, Tay FR. Effects of different exposure times and concentrations

- of sodium hypochlorite/ethylenediaminetetraacetic acid on the structural integrity of mineralized dentin. *J Endod*. 2010 Jan;36(1):105-9.
32. Zehnder M. Root canal irrigants. *J Endod* 2006;32:389 –98.

4. Considerações Gerais

Um dos grandes desafios da Endodontia atual recai no fato de ainda não existir nenhuma substância química auxiliar que preencha todos os requisitos necessários a um adequado agente químico. Dentre os protocolos de irrigação mais utilizados mundialmente, a associação do hipoclorito de sódio e EDTA merece destaque. Contudo, a literatura científica é vasta em demonstrar os efeitos deletérios, dentre os quais alterações nas propriedades químicas e físicas da dentina, bem como, no comportamento de determinados materiais restaurados (Prati *et al.*, 1999; Grigoratos *et al.*, 2001; Morris *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2006; Marending *et al.*, 2007; Moreira *et al.*, 2009).

O presente trabalho teve como propósito principal buscar alternativas para minimizar os efeitos negativos gerados pela irrigação com hipoclorito de sódio e EDTA sobre a estrutura dentinária. A escolha do ácido ascórbico e de seu sal sódico foi respaldada no fato de este agente ter uma conhecida ação antioxidante diante de uma série de compostos, especialmente os radicais livres (Celik *et al.*, 2010).

Estudos na Odontologia Restauradora já demonstravam benefícios no uso do ácido ascórbico e/ou ascorbato de sódio na resistência de união de diversos sistemas adesivos após o uso de hipoclorito de sódio (Lai *et al.*, 2001; Morris *et al.*, 2001; Weston *et al.*, 2007). Assim, diante de tal comportamento do ácido ascórbico/ascorbato de sódio, juntamente com os achados prévios em trabalho realizado por Moreira *et al.* (2009), buscou-se verificar possíveis benefícios do uso de ácido ascórbico 10% e/ou ascorbato de sódio 10% na organização do colágeno presente na matriz orgânica dentinária, assim como, nas propriedades mecânicas da dentina radicular após irrigação com hipoclorito de sódio 5,25% e EDTA 17%.

A análise quantitativa da birrefringência por meio da microscopia de polarização (Capítulo 1) revelou informações relevantes sobre características organizacionais e estruturais da matriz orgânica da dentina radicular bovina após a irrigação com hipoclorito de sódio 5,25% e EDTA 17%, e os efeitos do ácido ascórbico 10% e/ou ascorbato de sódio 10% diante de uma matriz orgânica alterada. Contudo, o efeito benéfico observado por tal metodologia não nos permite afirmar que esse comportamento aconteça de forma similar ao se analisar conjuntamente a matriz inorgânica. Assim, a realização do estudo das propriedades mecânicas (Capítulo 2) veio com o intuito de tentar observar os efeitos do ácido ascórbico 10% e/ou ascorbato de sódio 10% após a irrigação com hipoclorito de sódio 5,25% e EDTA 17% em determinadas propriedades mecânicas na dentina radicular bovina.

Dentro do contexto geral do presente trabalho, sugere-se que os agentes redutores testados tenham um papel não só de remover os resíduos e subprodutos do hipoclorito de sódio, mas também uma função protetora da estrutura dentinária ao minimizar os efeitos deletérios deste agente oxidante. Foi observada também a presença de cristais após o uso do ácido ascórbico e do ascorbato de sódio adsorvidos na superfície radicular. Entretanto, a importância da presença destas partículas e seu reflexo nas propriedades da dentina continuam incertos.

Os dados obtidos com a análise quantitativa da birrefringência e o teste de microdureza Knoop apontam um desempenho superior do ascorbato de sódio em relação ao ácido ascórbico. A opção por testar o ácido ascórbico foi feita em função da maior facilidade de obtenção comercial deste em relação ao ascorbato de sódio. Contudo, diante dos resultados da análise quantitativa da birrefringência e do teste de microdureza Knoop, foi possível observar que a atuação do ácido ascórbico foi inferior ou mesmo negativa em relação ao ascorbato de sódio. Provavelmente, este comportamento divergente se deva às diferenças de pH.

Considerando a avaliação da resistência à flexão, o uso do hipoclorito de sódio 5,25%, associado ou não ao EDTA 17%, por um tempo de 30 minutos

reduziu os valores de tal propriedade. Este resultado corrobora com estudos prévios (Sim *et al.*, 2001; Marending *et al.*, 2007; Mai *et al.*, 2010). O declínio dos valores de resistência flexural provavelmente é atribuído à formação de uma camada friável de cristais de apatita que perderam o suporte da matriz intacta do colágeno, danificada pelo hipoclorito de sódio (Wang *et al.*, 2001). Ao se fazer uso do ácido ascórbico após o protocolo de irrigação com hipoclorito de sódio e EDTA, os valores de resistência flexural foram restabelecidos, chegando mesmo a equiparar-se ao grupo controle. Tal desempenho não foi observado quando o ascorbato de sódio foi utilizado, contudo, os valores obtidos foram superiores aos do G2.

Refletindo no âmbito clínico, é importante chamarmos atenção que, mesmo diante dos benefícios alcançados com o uso do ácido ascórbico/ascorbato de sódio após a irrigação com hipoclorito de sódio e EDTA, a aplicação por 10 minutos parece-nos impraticável na rotina do tratamento endodôntico. Assim, torna-se evidente a necessidade de estudos futuros buscando o tempo mínimo necessário para aplicação de tais agentes redutores. Existem ainda muitas lacunas na compreensão do mecanismo exato de atuação dos agentes redutores e seus benefícios na terapia endodôntica. A partir do melhor entendimento destes fatores é que será possível o desenvolvimento de melhores estratégias terapêuticas.

Conclusão

De acordo com os resultados obtidos e dentro das limitações dos estudos realizados foi possível concluir que:

- O hipoclorito de sódio 5,25%, associado ou não ao EDTA 17%, provocou alterações na birrefringência do colágeno presente na matriz orgânica da dentina radicular de dentes bovinos, contudo, o uso do ácido ascórbico 10% e/ou ascorbato de sódio 10% conseguiu minimizar estas alterações.
- O hipoclorito de sódio 5,25% reduziu de forma significativa os valores de microdureza Knoop, contudo, a aplicação de ascorbato de sódio 10% reverteu os valores previamente reduzidos.
- O hipoclorito de sódio 5,25% afeta de forma negativa a resistência flexural, mas ao se fazer uso do ácido ascórbico após o protocolo de irrigação com hipoclorito de sódio e EDTA, os valores de resistência flexural foram restabelecidos.

Referências

1. Craig RG, Gehring PE, Peyton FA. Relation of structure to the microhardness of human dentine. J Dent Res. 1959; 38(3): 624-30. dentine sections. Arch Oral Biol. 1990; .35: 731-739.
2. DSM. Vitamin C. Heerlen. [acesso 2010 Dez 01]. Disponível em: <http://www.vitamin-basics.com>
3. Espírito Santo AR, Novaes PD, Line SRP. Anisotropic properties of the enamel organic extracellular matrix. Eur J Oral Sci. 2006; 114(Suppl. 1): 333-337.
4. Fuentes V, Ceballos L, Osorio R, Toledano M, Carvalho RM, Pashley DH. Tensile strength and microhardness of treated human dentin. Dent Mater. 2004; 20(6):522-9.
5. Grande NM, Plotino G, Lavorgna L, Ioppolo P, Bedini R, Pameijer CH, Somma F. Influence of different root canal-filling materials on the mechanical properties of root canal dentin. J Endod. 2007 Jul;33(7):859-63. Epub 2007 Apr 16.
6. Kaye H, Herold RC. Structure of human dentine - I - Phase contrast, polarization, interference and bright field microscopic observations on the lateral branch system. Arch. Oral Biol. 1966; 11: 355-368.
7. Lopes HP, Siqueira-Jr JF, Carlos Nelson Elias. Substâncias químicas empregadas no preparo dos canais radiculares. In: Lopes HP, Siqueira-Jr JF. Endodontia: Biologia e Técnica. 2. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A.; 2004. p. 535-579.
8. Nikaido T, Nakabayashi N. relationship between polymerization and adhesion to teeth. Adhesive Dent. 1988; 6: 229-34.

9. Oyarzun A, Cordero A, Whittle M. Immunohistochemical evaluation of the effects of sodium hypochlorite on dentin collagen and glycosaminoglycans. *J Endod* 2002;28:152–6.
10. Safavi KE, Spangberg LSW, Langeland K. Root canal dentine tubule disinfection. *J Endod*. 1990; 16: 207-10.
11. Silva APB. Efeito de um agente antioxidante e de solventes orgânicos adesivos sobre a resistência de união ao esmalte humano tratado com peróxido de carbamida a 10% [Dissertação]. Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2005.
12. Teixeira CS, Felipe MC, Felipe WT. The effect of application time of EDTA and NaOCl on intracanal smear layer removal: an SEM analysis. *Int Endod J*. 2005; 38(5): 285-90
13. Titley KC, Torneck CD, Smith DC, Adibfar A. Adhesion of composite resin to bleached and unbleached bovine enamel. *J Dent Res*. 1988; 67: 1523-28.
14. Torneck CD, Titley KC, Smith DC, Adibfar A. Influence of time of hydrogen peroxide exposure on the adhesion of composite resin to bleached bovine enamel. *J Endod*. 1990; 13: 123-8.
15. Vidal BC & Mello MLS. *Biologia Celular*. Rio de Janeiro: Livraria Atheneu; 1987.
16. Yiu CK, García-Godoy F, Tay FR, Pashley DH, Imazato S, King NM, Lai SC. A nanoleakage perspective on bonding to oxidized dentin. *J Dent Res*. 2002 Sep;81(9):628-32.

1. DETALHAMENTO DA METODOLOGIA

O delineamento experimental deste trabalho se deu em duas etapas. Em um primeiro momento, espécimes foram preparados para a análise da birrefringência em microscopia de polarização e ensaio mecânico de microdureza Knoop. Em uma segunda etapa experimental, espécimes foram preparados para o ensaio mecânico de resistência à flexão. Para ambas as etapas as seguintes substâncias químicas auxiliares foram utilizadas:

- Cloreto de sódio 0,9%¹
- Solução de hipoclorito de sódio 5,25%²
- Solução de EDTA 17%²
- Solução de ácido ascórbico 10%³
- Solução de ascorbato de sódio 10%³

1.1 Microscopia de polarização e ensaio mecânico de microdureza Knoop

Foram utilizados para a primeira etapa deste estudo um total de 80 incisivos bovinos, recém-extraídos, obtidos no Frigorífico Angelelli Ltda na cidade de Piracicaba, estado de São Paulo. Os dentes foram armazenados em timol 0,2% imediatamente após a sua extração e em seguida, congelados em freezer à temperatura de - 20°C.

¹ JP Indústria Farmacêutica S.A., Ribeirão Preto, SP, Brasil

² Farmácia Drogal, Piracicaba, SP, Brasil

³ Sigma Aldrich – St Louis, MO, USA

Os dentes foram aleatoriamente divididos em oito grupos com 10 dentes cada (n=10):

- **Grupo 1:** Cloreto de sódio 0,9% (controle)
- **Grupo 2:** Hipoclorito de sódio 5,25% + EDTA 17%
- **Grupo 3:** Hipoclorito de sódio 5,25% + EDTA 17% + ácido ascórbico 10%
- **Grupo 4:** Hipoclorito de sódio 5,25% + EDTA 17% + ascorbato de sódio 10%
- **Grupo 5:** Cloreto de sódio 0,9% + Hipoclorito de sódio 5,25%
- **Grupo 6:** Cloreto de sódio 0,9% + EDTA 17%
- **Grupo 7:** Cloreto de sódio 0,9% + ácido ascórbico 10%
- **Grupo 8:** Cloreto de sódio 0,9% + ascorbato de sódio 10%

1.1.2 Preparo e irrigação das amostras

Para esta etapa inicial, o design experimental esta de acordo com Moreira *et al.*, 2009. Inicialmente, os dentes foram descongelados e os mesmos foram limpos com auxílio de lâminas de bisturi número 15⁴ e curetas periodontais⁵. As coroas dentais foram seccionadas horizontalmente 3 mm abaixo da junção amelo-cementária utilizando-se um disco de carborundum⁶ montado em micro motor de baixa rotação.

Em seguida, foi realizado o vedamento do ápice radicular do dente bovino com cera utilidade⁷. Realizado o vedamento, os ápices dentais foram impermeabilizados com uma camada de adesivo de cianoacrilato⁸. Após estes procedimentos de impermeabilização dos ápices dentais, as amostras foram

⁴ Paramount, Paramount Surg Med Ltd, Chicago, IL, USA

⁵ Hu-Friedy do Brasil, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

⁶ Vipi, Pirassununga, SP, Brasil

⁷ Wilson, Polidental Indústria e Comércio Ltda, Cotia, SP, Brasil

⁸ Super Bonder®-Loctite, Itapevi, SP, Brasil

posicionadas e presas a um aparato metálico constituído de 10 perfurações, o que promoveu uma melhor estabilização das mesmas. Com o intuito de fixar melhor no aparato metálico, cada amostra foi presa utilizando cera utilidade⁷. Como complementação, foi feito o uso de um material de moldagem à base de poliéter⁹ para que a substância química auxiliar, que posteriormente seria utilizada, não afetasse a face externa da amostra (Figura 1).

Cada amostra foi submetida à remoção do tecido pulpar e pré-dentina por meio do uso de uma broca de Gates-Glidden¹⁰ #6, complementada por uma lima endodôntica¹⁰ #130. Durante a instrumentação, cada amostra foi irrigada com a substância química auxiliar de acordo com o grupo a qual pertenciam. Um volume total de 10 mL de cada solução foi utilizado ao longo do processo.

Após serem submetidas à etapa de remoção de pré-dentina e tecido pulpar, as amostras foram inundadas com a substância química auxiliar de acordo com o grupo ao qual pertenciam, conforme demonstrado na Tabela 1. Aqueles grupos em que as soluções de hipoclorito de sódio 5,25% (pH 11,2) e cloreto de sódio 0,9% (pH 6) foram utilizadas, estas permaneceram por 30 minutos em contato com a superfície do canal radicular. Para os grupos em que o EDTA 17% (pH 7,4) foi utilizado, este permaneceu por 3 minutos em contato com a superfície do canal radicular. Para os grupos em que as soluções de ácido ascórbico (pH 2,05) e ascorbato de sódio (pH 7,15) foram utilizadas, estas permaneceram em contato por 10 minutos.

⁹ Impregum® Soft, 3M ESPE, Sumaré, SP, Brasil

¹⁰ (Maillefer, Ballaigues, VD, Switzerland)



Figura 1 – Amostras fixadas com material de moldagem à base de poliéter em aparato metálico sendo submetidas ao processo de irrigação-aspiração.

TABELA 1 – Distribuição dos grupos e tempo de permanência de cada substância química auxiliar testada para análise da birrefringência e teste de microdureza

	Substância Química Auxiliar	Tempo de permanência
Grupo 1	Cloreto de sódio 0,9%	30 min
Grupo 2	Hipoclorito de sódio 5,25%	30 min
	EDTA 17%	3 min
Grupo 3	Hipoclorito de sódio 5,25%	30 min
	EDTA 17%	3 min
	Ácido ascórbico 10%	10 min
Grupo 4	Hipoclorito de sódio 5,25%	30 min
	EDTA 17%	3 min
	Ascorbato de sódio 10%	10 min
Grupo 5	Hipoclorito de sódio 5,25%	30 min
Grupo 6	EDTA 17%	3 min
Grupo 7	Ácido ascórbico 10%	10 min
Grupo 8	Ascorbato de sódio 10%	10 min

Os tempos de permanência do cloreto de sódio 0,9% e hipoclorito de sódio 5,25% foram assim propostos, com o intuito de simular aproximadamente o tempo clínico que estas substâncias químicas auxiliares permanecem em contato com a superfície da parede dentinária radicular. O que também justifica o menor tempo de permanência do EDTA 17% (3 minutos) visto, sua indicação de permanência de 1 a 5 minutos (Teixeira *et al.*, 2005).

A substância química auxiliar foi renovada a cada 3 minutos para os grupos em que o cloreto de sódio 0,9% e o hipoclorito de sódio 5,25% foram utilizados. Para os grupos em que o EDTA 17% foi utilizado, este foi renovado com 1 minuto e 30 segundos. Já quando foi feita a utilização do ácido ascórbico ou ascorbato de sódio, estes foram renovados com 5 minutos. A renovação foi feita utilizando 5 mL de cloreto de sódio 0,9% entre cada troca para cada amostra a fim de remover a substância química auxiliar previamente utilizada. Passado esses períodos, as amostras foram submetidas a uma irrigação final utilizando 10 mL de cloreto de sódio 0,9% para a total remoção da substância química auxiliar.

A etapa seguinte consistiu no uso do ácido ascórbico ou ascorbato de sódio para os grupos previamente determinados. Inicialmente, foi feita a secagem dos canais radiculares com cânulas de aspiração¹¹ acopladas com pontas sugadoras do tipo Capillary Tips¹², a fim de remover possíveis vestígios da substância química auxiliar anteriormente utilizada. De forma complementar, também foi utilizado pontas de papel absorvente¹³ para esta etapa de secagem dos canais radiculares. Posteriormente, foi feito o total preenchimento das amostras com a solução de ácido ascórbico 10% ou ascorbato de sódio 10%, recém-manipulada, por um período de 10 minutos. Tais soluções foram renovadas após 5 minutos de permanência, utilizando para tanto 5 mL de cloreto de sódio

¹¹ Golgran Instrumentos cirúrgicos e odontológicos Ltda, São Caetano do Sul, SP, Brasil

¹² Ultradent Products Inc, South Jordan, Utah, USA

¹³ Dentsply Maillefer, Petrópolis, RJ, Brasil

0,9% para cada amostra. Um banho final foi realizado com 10 mL de solução de cloreto de sódio 0,9% para a total remoção das respectivas soluções.

Após esta etapa de inundação com as substâncias químicas auxiliares e com o ácido ascórbico/ascorbato de sódio, cada raiz foi cortada em seu terço apical utilizando disco de carborundum¹⁴ a fim de que todas as amostras permanecessem com um tamanho padrão de 14 mm. Isso permitiu também um melhor contato da solução fixadora com a superfície dos espécimes.

As amostras foram em seguida armazenadas em formol 10% por um período de 48 horas. Após esse período de fixação, cada amostra foi segmentada em dois fragmentos transversais de 7 mm de altura cada, correspondendo ao terço médio. Um fragmento foi preparado para o ensaio mecânico de microdureza Knoop e o outro foi submetido ao processamento histológico para avaliação da birrefringência em microscopia de polarização.

1.1.3 Processamento histológico e análise da birrefringência em microscopia de polarização

Os espécimes selecionados para avaliação da birrefringência por meio de microscopia de polarização, após o período de fixação, foram lavados em água corrente por 24 horas e submetidos à descalcificação com uma solução de ácido nítrico 5% diluída em formol 10% buscando-se uma melhor conservação das amostras (Kaye & Herold, 1966). Decorrido o tempo necessário para a descalcificação, as amostras foram lavadas em água corrente por 24 horas. Após a lavagem, as amostras foram mantidas em álcool 70° “*overnight*”, seguindo-se com 3 trocas de 1 em 1 hora de álcool absoluto, 1 hora em álcool-xilol, 3 trocas de 45 em 45 minutos em xilol puro, 2 horas em banho de parafina e, por fim, inclusão em parafina.

¹⁴ Vipi, Pirassununga, SP, Brasil

Cortes teciduais foram obtidos com uma espessura de 7 μ m, montados em lâminas de vidro e corados com *Picrosirius*. Assim, as lâminas foram submetidas à dois banhos de 5 minutos cada em xilol puro e álcool absoluto e, posteriormente, a um banho de 5 minutos cada em álcool 90%, álcool 70% e álcool 50%. Foram lavadas em água corrente e permaneceram por 2 horas no corante *Picrosirius*. Após, foram novamente lavadas em água corrente e submetidas à banhos sequenciais de não mais do que 10 segundos em álcool 70%, álcool 95%, duas vezes em álcool absoluto e por fim, mantidas em xilol puro por 10 minutos. Lamínulas foram montadas sobre os cortes utilizando bálsamo do Canadá¹⁵. Foram confeccionadas um total de 20 lâminas para cada grupo.

Cada lâmina confeccionada foi analisada por meio do uso de microscópio óptico de polarização Leica DMLP¹⁶. Em cada corte histológico, foram escolhidas 4 áreas aleatórias para a realização da mensuração do retardo óptico. Para tanto, foi acoplado ao microscópio de polarização o condensador Brace-Köhler¹⁷, próprio para a devida mensuração. Os valores indicados pelo condensador, dados em ângulos, foram posteriormente transformados em nanômetros (nm) por meio da fórmula:

$$l' = l_0 \cdot \text{sen}[2\Delta]$$

Sendo Δ o valor do ângulo medido, l_0 referente ao valor constante de 52 (calibração de fábrica) e l' o valor do retardo óptico em nanômetros. Com os valores do retardo óptico convertidos em nanômetros, a análise estatística foi realizada.

¹⁵ Vetec, Duque de Caxias, RJ, Brazil

¹⁶ Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Hesse, Germany

¹⁷ Wild Leitz, Wetzlar, Hesse, Germany

1.1.4 Análise da absorbância da matriz orgânica da dentina vista ao microscópio de luz.

Os grupos analisados na microscopia de polarização que demonstraram alteração da birrefringência foram também submetidos à análise da absorbância. O objetivo desta análise foi confirmar a perda de estrutura proteica vista ao microscópio de polarização.

Os cortes foram analisados em microscópio Leica DM LP (Leica Microsystems®) equipado com filtro verde (546 nm) e capturados com câmera digital Leica DFC280 com resolução de 96 DPI e dimensões 1280 x 1024 pixels. As mensurações foram realizadas na região mais próxima do canal radicular com área padronizada em 0,2 mm². As imagens foram analisadas e mensuradas pelo software Image J (National Institutes of Health, USA – <http://rsb.info.nih.gov/ij>). Os dados foram submetidos à análise de variância método de Kruskal-Wallis e teste de comparações múltiplas de Dunn. O nível de significância foi de 5%.

1.1.5 Preparação das amostras para o teste de microdureza Knoop

Os fragmentos selecionados para o teste de microdureza Knoop, após o período de fixação em formol 10%, foram submetidos à lavagem em água corrente por 24 horas. Após este período, cada fragmento de dente bovino foi secado com lenço de papel absorvente¹⁸ e preparado para inclusão em resina de poliestireno¹⁹.

Inicialmente, um cilindro de PVC²⁰ com 15 mm de altura e 25 mm de diâmetro interno foi estabilizado em uma placa de cera utilidade²¹, sendo o mesmo submetido à ligeira pressão contra a cera para que penetrasse em torno de 2mm. Todo o contorno de cera utilidade ao redor do cilindro de PVC foi aquecido com o

¹⁸ Melhoramentos Papéis Ltda, Caieiras, SP, Brasil

¹⁹ Piraglass Ltda, Piracicaba, SP, Brazil

²⁰ Tigre S/A, Rio Claro, SP, Brasil

²¹ Wilson, Polidental Indústria e Comércio Ltda, Cotia, SP, Brasil

intuito de melhorar o vedamento e evitar que houvesse o escape da resina que posteriormente seria vertida. Toda a face interna do cilindro foi então isolada com vaselina sólida²². Posteriormente, o fragmento de dente bovino foi posicionado ao centro do cilindro, de forma que a luz do canal radicular ficasse perpendicular à superfície da placa de cera utilidade, sendo esta a superfície que seria analisada. Em seguida, foi vertida a resina de poliestireno no interior do cilindro até o completo preenchimento do mesmo. Com a polimerização da resina, o cilindro de PVC foi removido (Figura 2A).

A superfície a ser analisada recebeu acabamento e polimento com o objetivo de remover riscos superficiais provocados pelos discos de carborundum utilizados para a realização dos cortes dos segmentos radiculares, obtendo-se uma superfície plana com o menor número possível de irregularidades. O acabamento foi realizado com lixas de carvão de silício utilizadas em sequência crescente de granulação (180 – 400 – 600 – 1200), montadas em politriz elétrica giratória²³, sob refrigeração com água, em baixa rotação, durante 2 minutos por amostra (Figura 2C).

Depois de lixadas, as amostras foram devidamente polidas com discos de feltro²⁴ e pastas diamantadas²¹ em granulação decrescente (3, 1, 0,25 µm) durante 2 minutos cada (Figura 2B). Em cada granulação de lixa e de disco de feltro, as amostras foram imersas em água destilada e colocadas em cuba de ultrassom Ultrasonic Cleaner modelo T 1440 D²⁵ por 10 minutos para remoção de detritos. Ao final do processo de acabamento e polimento, as amostras foram mantidas em recipiente contendo água destilada e mantidas em temperatura ambiente até o momento da realização do teste de microdureza Knoop.

²² Clauvas Ind. Com. Vaselinas Industriais Ltda, São Paulo, SP, Brasil

²³ Arotec, São Paulo, SP, Brasil

²⁴ Arotec, São Paulo, SP, Brasil

²⁵ Odontobrás Ind. Com. Equip. Med. Odontol. Ltda, Ribeirão Preto, SP, Brasil

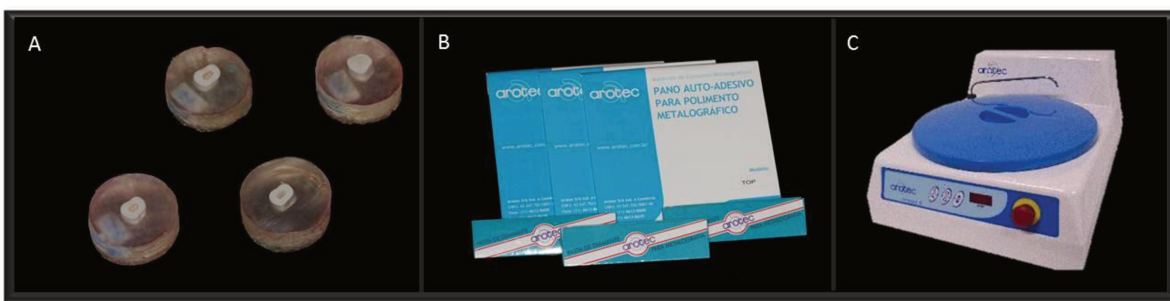


Figura 2 – (A) Amostras incluídas em resina de poliestireno; (B) Materiais utilizados para o acabamento e polimento das amostras para a realização do teste de microdureza de Knoop; (c) Politriz elétrica giratória.

1.1.6 Teste de microdureza de Knoop

Para a realização do ensaio de dureza Knoop é necessário que a superfície da amostra a ser medida esteja plana e perpendicular ao penetrador. Para tanto, foi utilizado um dispositivo cilíndrico com diâmetro interno de 35 mm e altura de 10 mm, no qual o corpo-de-prova foi sobreposto e mantido fixo com auxílio de cera utilidade. Sobre cada amostra, foi colocado um lenço de papel absorvente para proteger a superfície e o conjunto foi levado ao planificador manual-prensa para obtenção da superfície plana.

Após a planificação do conjunto base/amostra, o mesmo foi posicionado no microdurômetro modelo Shimadzu HMV-2T²⁶, acoplado com o penetrador tipo Knoop. O aparelho foi configurado para aplicar uma carga de 50 g durante 20 segundos, parâmetros estes, determinados de acordo com estudo piloto realizado previamente (Figura 3). Dentro do delineamento experimental deste estudo, determinou-se a realização de 6 penetrações em cada uma das paredes da amostra. A primeira penetração foi feita no ponto mais próximo do canal radicular a uma distância de 50 μm . A seguinte a 100 μm , a terceira a 200 μm , a quarta a 500 μm , a quinta a 1000 μm e a última a 1500 μm do ponto zero. A orientação dos túbulos dentinários foi estabelecida de forma perpendicular à direção do

²⁶ Shimadzu Corporation, Japão

penetrador de Knoop. Após a obtenção dos valores de microdureza Knoop para cada penetração dados em KHN, os dados foram submetidos à análise estatística.

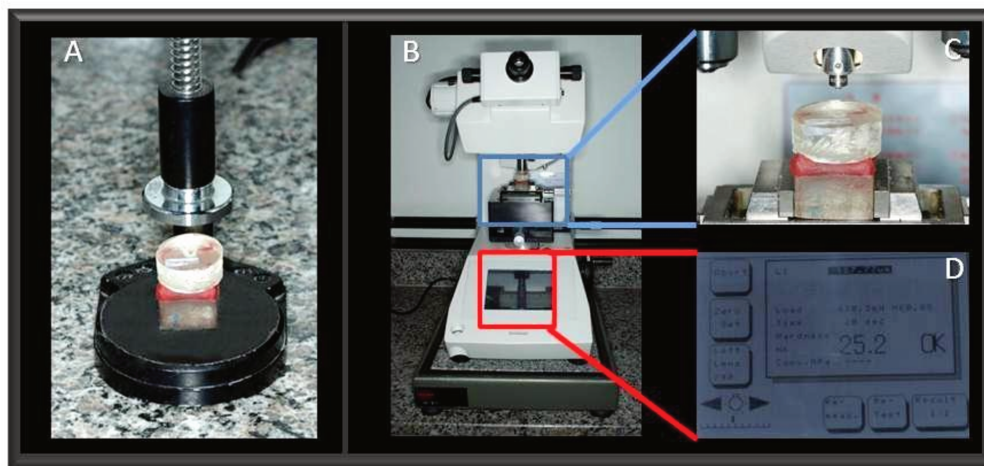


Figura 3 – (A) Amostra posicionada em dispositivo planificador; (B) Microdurômetro Shimadzu HMV-2T; (C) Amostra sendo submetida ao penetrador de Knoop; (D) Tela representativa do resultado da microdureza Knoop em KHN.

Um espécime de cada grupo foi selecionado aleatoriamente para análise da superfície morfológica da dentina radicular. Os espécimes foram armazenados em estufa à 37°C por um período de 24 horas após o que, foram submetidos ao processo de metalização. As amostras metalizadas foram analisados através do Microscópio Eletrônico de Varredura JSM 5600LV (JEOL, Tóquio, Honshu, Japão), operado em 15 kV.

1.2 Ensaio mecânico de resistência flexural

Foram utilizados para esta etapa do estudo 40 incisivos bovinos, recém-extraídos, obtidos no Frigorífico Angelelli Ltda na cidade de Piracicaba, estado de São Paulo. Os dentes foram armazenados em timol 0,2% imediatamente após a sua extração e em seguida, congelados em freezer à temperatura de - 20°C.

Os dentes foram aleatoriamente divididos em oito grupos com 8 dentes cada (n=8):

- **Grupo 1:** Cloreto de sódio 0,9% (controle)
- **Grupo 2:** Hipoclorito de sódio 5,25% + EDTA 17%
- **Grupo 3:** Hipoclorito de sódio 5,25% + EDTA 17% + ácido ascórbico 10%
- **Grupo 4:** Hipoclorito de sódio 5,25% + EDTA 17% + ascorbato de sódio 10%
- **Grupo 5:** Cloreto de sódio 0,9% + Hipoclorito de sódio 5,25%
- **Grupo 6:** Cloreto de sódio 0,9% + EDTA 17%
- **Grupo 7:** Cloreto de sódio 0,9% + ácido ascórbico 10%
- **Grupo 8:** Cloreto de sódio 0,9% + ascorbato de sódio 10%

1.2.1 Preparo das amostras para análise da resistência flexural

Os dentes foram descongelados e os mesmos foram limpos com auxílio de lâminas de bisturi número 15²⁷ e curetas periodontais²⁸. As coroas dentais foram seccionadas horizontalmente 3mm abaixo da junção amelo-cementária, utilizando-se um disco de carborundum²⁹ montado em micro motor de baixa rotação. Em seguida, as raízes foram novamente seccionadas no seu eixo longitudinal em sentido méso-distal obtendo-se assim, dois fragmentos.

²⁷ Paramount, Paramount Surg Med Ltd, Chicago, IL, USA

²⁸ Hu-Friedy do Brasil, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

²⁹ Vipi, Pirassununga, SP, Brasil

Cada fragmento foi fixado em placa de acrílico de 5 mm x 35 mm x 45 mm por meio de cera pegajosa³⁰ tendo uma das faces proximais posicionada paralela à superfície da placa. Seguiu-se com o seccionamento do fragmento por meio de dois cortes, utilizando disco diamantado de dupla face (10cm x 0,3mm)³¹ montado em cortadeira de precisão modelo Isomet 1000 Precision Saw³², com velocidade de 325 rpm (Figura 4A). O resultado deste seccionamento foi uma fatia central de aproximadamente 2mm de espessura (Figura 4B).

Esta fatia central obtida foi destacada da placa de acrílico e novamente fixada com cera pegajosa e um novo seccionamento foi realizado por meio de dois cortes laterais em sentido longitudinal, obtendo-se uma barra de dentina radicular com dimensões de 2 mm x 2 mm x 14 mm (Figura 4C). Posteriormente, foram realizados mais dois cortes transversais nas extremidades das barras para obtenção de amostras com dimensões de 2 mm x 2 mm x 10 mm (Figura 4D). Foram confeccionadas um total de 120 barras sendo 15 por grupo. As mesmas foram mantidas em recipiente contendo água destilada e congeladas até o momento da realização do tratamento com as respectivas substâncias químicas auxiliares.

³⁰ Asfer Indústria Química, São Caetano do Sul, SP, Brasil

³¹ Buehler Microstructural Analysis Division, Lake Bluff, Illinois, USA

³² Buehler Microstructural Analysis Division, Lake Bluff, Illinois, USA

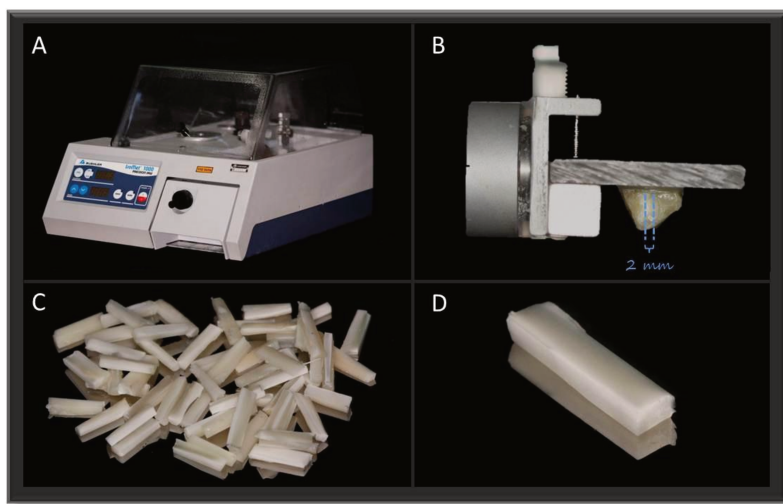


Figura 4 – (A) Cortadeira de precisão para preparo das amostras para ensaio mecânico de resistência flexural ; (B) Indicação dos dois cortes longitudinais realizados em cada amostra; (C) Segmentos destacados após os dois primeiros cortes; (D) Barra final obtida após os cortes transversais de dimensões 2 mm x 2 mm x 10 mm.

1.2.2 Tratamento das amostras para análise da resistência flexural

Inicialmente, as amostras foram descongeladas e mantidas em água destilada até o momento do experimento. Cada amostra foi colocada individualmente em recipientes, devidamente identificados e mantidos em mesa agitadora³³ modelo TE-420 durante todo o experimento. A água destilada contida nos recipientes foi aspirada e os espécimes foram imersos nas substâncias químicas auxiliares de acordo com o grupo ao qual pertenciam, conforme os tempos determinados na Tabela 2. Em cada recipiente foi colocado um volume total de 5 mL de substância química auxiliar, sendo esta renovada variando o tempo de acordo com a solução utilizada. Para os grupos controle e os demais grupos em que o hipoclorito de sódio 5,25% foi utilizado, esta renovação foi feita a cada 3 minutos. Já nas etapas em que foi utilizado o EDTA 17%, este foi renovado com o tempo de 1 minuto e 30 segundos. Para o ácido ascórbico e o ascorbato de sódio, esta renovação foi feita com 5 minutos. Como cuidado adicional, também foi

³³ Tecnal Equipamentos para Laboratório, Piracicaba, SP, Brasil

realizada irrigações com 5 mL de cloreto de sódio 0,9% por amostra durante a troca das substâncias químicas auxiliares, como entre o hipoclorito de sódio 5,25% e o EDTA 17%. Ao final da etapa de imersão nas substâncias químicas auxiliares, as amostras foram submetidas a uma irrigação final utilizando 5 mL de cloreto de sódio 0,9% para a total remoção da substância química auxiliar e mais uma vez mantidas em água destilada. As amostras foram submetidas imediatamente ao ensaio mecânico de resistência flexural.

TABELA 2 – Distribuição dos grupos e tempo de permanência de cada substância química auxiliar testada para a análise do módulo de elasticidade e resistência flexural

	Substância Química Auxiliar	Tempo de permanência
Grupo 1	Cloreto de sódio 0,9%	30 min
Grupo 2	Hipoclorito de sódio 5,25% EDTA 17%	30 min 3 min
Grupo 3	Hipoclorito de sódio 5,25% EDTA 17% Ácido ascórbico 10%	30 min 3 min 10 min
Grupo 4	Hipoclorito de sódio 5,25% EDTA 17% Ascorbato de sódio 10%	30 min 3 min 10 min
Grupo 5	Hipoclorito de sódio 5,25%	30 min
Grupo 6	EDTA 17%	3 min
Grupo 7	Ácido ascórbico 10%	10 min
Grupo 8	Ascorbato de sódio 10%	10 min

1.2.3 Ensaio mecânico da resistência flexural

O ensaio mecânico para registro da resistência flexural foi realizado em uma Máquina de Ensaio Universal³⁴ por meio de um teste de carga de três pontos (*Three bending test*). Para a realização do ensaio, foi utilizado um dispositivo metálico específico para este teste, contendo duas barras fixas dispostas paralelamente entre si e distantes 8mm, onde as amostras foram apoiadas (Figura 5).

O teste foi executado com o auxílio de uma célula de carga de 500 N com velocidade constante em 0,5 mm/min. Os espécimes foram submetidos à carga compressiva até a fratura. A orientação dos túbulos dentinários foi estabelecida de forma perpendicular à carga e os resultados analisados no software Bluehill 2³⁵ que informava os valores de resistência flexural em MPa. Os valores obtidos serão submetidos à análise estatística.

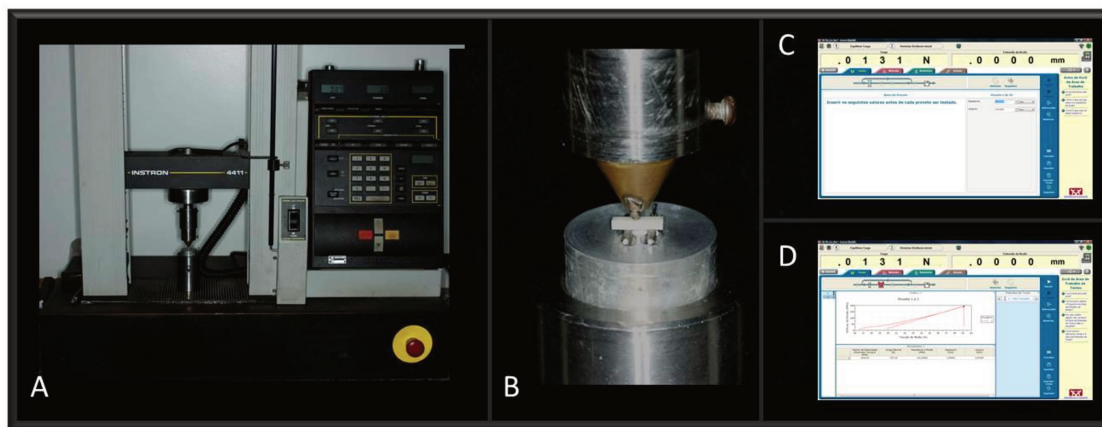


Figura 5 – (A) Máquina de Ensaio Universal Instron 4411; (B) Espécime posicionado no dispositivo de mini-flexão; (C) Tela do software Bluehill 2 em que as dimensões da amostra são informadas; (D) Tela final do software Bluehill 2 em que os resultados de resistência flexural são apresentados juntamente com o gráfico de Tensão x Deformação da amostra.

³⁴ Instron 4411, Norwood, MA, EUA

³⁵ Instron Corporation, Norwood, MA, EUA

2. DETALHAMENTO DOS RESULTADOS

CAPÍTULO 1

1 - ESTRATÉGIA DE ANÁLISE ESTATÍSTICA

1.1 – Variáveis Analisadas

1.1.1 Análise da birrefringência por meio de microscopia de polarização.

1.2.2 Análise da absorvância

1.2 – Grupos de Tratamentos

Foram analisados oito grupos de tratamentos, conforme descrito na Tabela 1.

TABELA 1 – Grupos de tratamentos analisados em cada variável.

Grupo	Protocolo de Irrigação
G1	Cloreto de Sódio
G2	Hipoclorito de Sódio + EDTA
G3	Hipoclorito de Sódio + EDTA + Acido Ascórbico
G4	Hipoclorito de Sódio + EDTA + Ascorbato de Sódio
G5	Hipoclorito de Sódio
G6	EDTA
G7	Acido Ascórbico
G8	Ascorbato de Sódio

1.3 – Análise Exploratória de Dados

Adotou-se neste estudo o nível de significância $\alpha = 0,05$. Assim, foram considerados significativos os parâmetros ou funções lineares de seus níveis, para os quais resultaram valores-p tais que $p \leq 0,05$.

Preferencialmente foi adotada a estatística paramétrica para análise da birrefringência. Assim, todos os procedimentos inferenciais, isto é, os testes de hipóteses e as estimativas por intervalo (intervalos de confiança), foram precedidos por testes de dados discrepantes (Dixon-Grubbs-Neumann para *outliers*), de normalidade (Kolmogorov-Smirnov para amostras com mais de 30 elementos e de Shapiro-Wilk para amostras menores) e de homogeneidade de variâncias (Cochran).

Um fato que merece destaque é que a variável *Análise da birrefringência*, cujos valores iniciais foram medidos em graus, recebeu a transformação para nanômetros. Com tais providências, a variável analisada pode ser submetida à testes estatísticos paramétricos (Inferência sobre médias), conforme pode ser constatado na Tabela 2.

TABELA 2 – Valores dos testes das pressuposições do modelo paramétrico para a variável envolvida

Pressuposições do Modelo	Variáveis / Valores P
	Birrefringência
Outliers Excluídos	0
Homogeneidade de Variâncias (*)	0.0615
Normalidade	0.3442

(*) Entre grupos.

Para a análise da absorbância foi adotada a estatística não-paramétrica. Assim, todos os procedimentos inferenciais, foram precedidos por teste de normalidade (Shapiro-Wilk).

1.4 Modelo Linear para Análises Estatísticas

Satisfeitas as pressuposições do modelo realizaram-se, para a variável, análise de variância de Fisher através do modelo linear de Gauss-Markov e comparações múltiplas através do critério de Tukey HSD: *Honestly Significant Difference*.

Adotou-se o modelo linear de Gauss-Markov $y = X\theta + \varepsilon$, para $\varepsilon \cap N(\phi; I\sigma^2)$. O modelo foi caracterizado por:

$$y_{ij} = \mu + \alpha_i + e_{ij} \quad (1)$$

que define o modelo com um fator ou *one way model*, onde para $i = 1, 2, \dots, 8$ grupos e $j = 1, 2, \dots, n_j$ dentes: y_{ij} é a resposta observada, no j -ésimo dente do grupo i na posição j ; μ é a média das respostas; α_i é o efeito do i -ésimo grupo; e_{ij} é o erro aleatório inerente a todas à resposta y_{ij} , tal que $e_{ij} \cap N(0; \sigma^2)$.

2 - ANÁLISE DA VARIÁVEL BIRREFRINGÊNCIA

Satisfeitas as pressuposições, adotou-se o modelo linear de Gauss-Markov, caracterizado por $y_{ij} = \mu + \alpha_i + e_{ij}$ (1), conforme descrito anteriormente, onde y_{ij} é a birrefringência, em nanômetros, observada no j -ésimo dente do i -ésimo grupo. Os resultados da análise de variância realizada estão descritos na tabela 3

Observa-se que os efeitos de Grupos foram altamente significativos ($p < 0.0001$). Para discernir entre os fatores de efeitos significativos e não significativos utilizou-se o teste de Tukey HSD para comparações múltiplas de médias.

TABELA 3 – Análise de variância da variável Birrefringência.

Variações Consideradas	GL	Somas de Quadrados	Quadrados Médios	F Calculado	Valor P
Grupos	7	4851.4874	693.0696	54.56	<0.0001
Resíduo	71	903.6152	12.7270	-	-
Total	78	5755.1025	-	-	-

Os resultados do teste de Tukey HSD, listados na tabela 4 e visualizados na figura 1 evidenciam, em termos das médias dos grupos, a formação de quatro classes: Uma classe de maior valor de birrefringência, constituída pelo Cloreto de Sódio (G1; 39.63); uma segunda classe representada pelo Ácido Ascórbico aplicado após irrigação com Hipoclorito de Sódio 5.25% e EDTA 17% (G3; 33.70). Numa posição intermediária, sem diferença significativa com as duas citadas, há uma classe formada pelos protocolos de irrigação: Ácido Ascórbico (G7; 37.92), Ascorbato de Sódio (G8; 36.81), Ascorbato de Sódio aplicado após irrigação com Hipoclorito de Sódio 5.25% e EDTA 17% (G4; 35.95) e EDTA 17% (G6; 34.98). O quadro é concluído com a classe dos menores valores de birrefringência formada pelo Hipoclorito de Sódio 5.25% (G5; 20.93) e Hipoclorito de Sódio 5.25% e EDTA 17% (G2; 17.01).

TABELA 4 – Análise da birrefringência – Estimativas por ponto para o desvio padrão e por ponto e por intervalo (95%) para as médias dos grupos em estudo.

	Grupos	Respostas	Desvio Padrão	Estimativa da Birrefringência (nm)			
				Por Ponto ^(*)	Por Intervalo (95%)		
					Limite Inferior	Limite Superior	
	Geral	79	8.59	32.02	30.10	33.94	
Protocolos de irrigação/Grupo	Cloreto de Sódio	G1	9	5.45	39.63 ^a	35.43	43.82
	Hipoclorito de Sódio + EDTA	G2	10	2.35	17.01 ^c	15.33	18.69
	Hipoclorito de Sódio + EDTA + Ácido Ascórbico	G3	10	4.33	33.70 ^b	30.60	36.80
	Hipoclorito de Sódio + EDTA + Ascorbato de Sódio	G4	10	2.23	35.95 ^{ab}	34.36	37.55
	Hipoclorito de Sódio	G5	10	1.42	20.93 ^c	19.91	21.94
	EDTA	G6	10	2.95	34.98 ^{ab}	32.87	37.09
	Ácido Ascórbico	G7	10	4.89	37.92 ^{ab}	34.42	41.41
	Ascorbato de Sódio	G8	10	3.18	36.81 ^{ab}	34.54	39.08

(*) Letras diferentes indicam diferença significativa entre as médias envolvidas, ao nível de significância de 5%, pelo Teste de Tukey HSD.

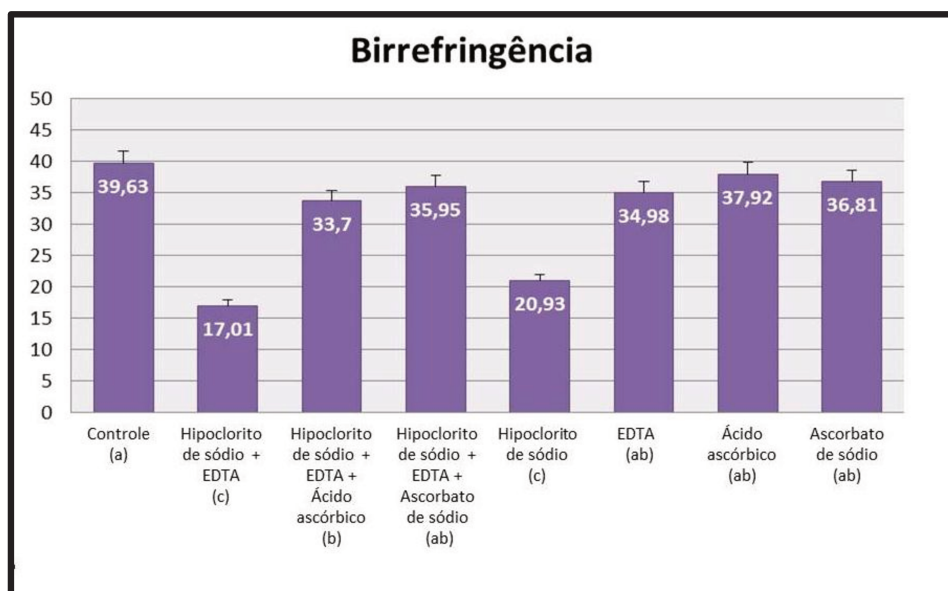


Figura 1 – Distribuição das médias dos valores de birrefringência em nm segundo o grupo. Resultados referentes ao teste de Tukey HSD e erro padrão por grupo.

3 - ANÁLISE DA VARIÁVEL ABSORBÂNCIA

Satisfeitas as pressuposições do modelo realizaram-se, para a variável, análise de variância de Kruskal-Wallis e comparações múltiplas de Dunn. Os resultados da análise de Dunn encontram-se relatados na tabela 4.1.

TABELA 4.1 – Análise quantitativa da matriz orgânica (Análise da Absorbância). Medianas, valores máximos e mínimos e postos médio.

Grupos	Medianas	Valor mínimo (%)	Valor máximo (%)	Postos médio
1	36.92	26.08	48.75	27.70 ^a
2	49.99	42.39	59.45	10.80 ^b
3	30.40	23.98	38.69	32.40 ^a
5	49.61	39.55	59.82	11.10 ^b

Different letters in superscript mean statistically significant difference - Kruskal Wallis and Dunn tests ($p < 0.05$).

CAPÍTULO 2

1. ESTRATÉGIA DE ANÁLISE ESTATÍSTICA

1.1 Variáveis Analisadas

1.1.1. Resistência flexural

1.1.2. Microdureza Knoop

1.2 Grupos de Tratamentos

Foram analisados oito grupos de tratamentos, conforme descrito na tabela 1.

TABELA 1 – Grupos de tratamentos analisados em cada variável.

Grupo	Protocolo de Irrigação
G1	Cloreto de Sódio
G2	Hipoclorito de Sódio + EDTA
G3	Hipoclorito de Sódio + EDTA + Acido Ascórbico
G4	Hipoclorito de Sódio + EDTA + Ascorbato de Sódio
G5	Hipoclorito de Sódio
G6	EDTA
G7	Acido Ascórbico
G8	Ascorbato de Sódio

1.3 Análise Exploratória de Dados

Adotou-se neste estudo o nível de significância $\alpha = 0,05$. Assim, foram considerados significativos os parâmetros ou funções lineares de seus níveis, para os quais resultaram valores-p tais que $p \leq 0,05$.

Preferencialmente foi adotada a estatística paramétrica. Assim, todos os procedimentos inferenciais, isto é, os testes de hipóteses e as estimativas por intervalo (intervalos de confiança), foram precedidos por testes de dados discrepantes (Dixon-Grubbs-Neumann para outliers), de normalidade (Kolmogorov-Smirnov para amostras com mais de 30 elementos e de Shapiro-Wilk para amostras menores) e de homogeneidade de variâncias (Cochran).

Um fato que merece destaque é que o teste de Dixon-Grubbs-Neumann detectou a presença de três *outliers* nas respostas da variável Resistência Flexural: No grupo 7 os espécimes de números 5 e 14, respectivamente com os valores 348.66 e 348.24 MPa e, no grupo 6 o espécime de número 7, com o valor 299.54 MPa. Os três valores foram excluídos da análise estatística.

Com tais providências as três variáveis analisadas possibilitaram a utilização da estatística paramétrica (Inferência sobre médias), conforme pode ser constatado na Tabela 2.

TABELA 2 – Valores dos testes das pressuposições do modelo paramétrico para as variáveis envolvidas

Pressuposições do Modelo	Variáveis / Valores P	
	Resistência flexural	Microdureza
Outliers Excluídos	3	0
Homogeneidade de Variâncias ^(*)	0,0614	0.1023
Normalidade	0,5905	0.3232

1.4 Modelo Linear para Análises Estatísticas

Satisfeitas as pressuposições do modelo realizaram-se, para as quatro variáveis, análises de variâncias de Fisher através do modelo linear de Gauss-Markov. comparações múltiplas através do critério de Tukey HSD: *Honestly Significant Difference*.

Adotou-se o modelo linear de Gauss-Markov $y = X\theta + \varepsilon$, para $\varepsilon \cap N(\phi; I\sigma^2)$. Para a variável resistência flexural, o modelo foi caracterizado por:

$$y_{ij} = \mu + \alpha_i + e_{ij} \quad (1)$$

que define o modelo com um fator ou *one way model*, onde para $i = 1, 2, \dots, 8$ grupos e $j = 1, 2, \dots, n_j$ dentes: y_{ij} é a resposta observada, no j -ésimo dente do grupo i na posição j ; μ é a média das respostas; α_i é o efeito do i

- ésimo grupo; e_{ij} é o erro aleatório inerente a todas à resposta y_{ij} , tal que $e_{ij} \cap N(0; \sigma^2)$.

Para a variável microdureza, o modelo linear de Gauss-Markov foi caracterizado por:

$$y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha\beta_{ij} + e_{ijk} \quad (2) \quad (\text{Two way model})$$

Onde $i = 1, 2, \dots, 8$ é o índice de grupos; $j = 1, 2, \dots, 6$ é o índice de distância (1 → Zero, 2 → 100, ... 6 → 1500); $\alpha\beta_{ij}$ é o efeito da interação entre o i -ésimo grupo e a j -ésima distância; y_{ijk} é a micro dureza (KNH) observada no k -ésimo dente que recebeu o tratamento dentinário do grupo i , na distância j . Os demais parâmetros são definidos como no modelo anterior.

Ademais, foram realizadas comparações múltiplas através do critério de Tukey HSD (*Honestly Significant Difference*) e obtidas estimativas por ponto para o desvio padrão e por ponto e por intervalo, ao nível de confiança de 95%, para as médias dos níveis dos grupos e das interações.

RESISTÊNCIA FLEXURAL

Satisfeitas as pressuposições, adotou-se o modelo linear de Gauss-Markov, caracterizado por $y_{ij} = \mu + \alpha_i + e_{ij}$ (1), conforme descrito em 1.4, onde y_{ij} é a Resistência Flexural em MPa observada no j -ésimo dente do i -ésimo grupo.

Os resultados da análise de variância realizada estão descritos na tabela 3. Observa-se que os efeitos de Grupos foram altamente significativos ($p < 0.0001$). Para discernir entre os fatores de efeitos significativos e não significativos utilizou-se o teste de Tukey HSD para comparações múltiplas de médias.

Tabela 3 – Análise de variância da variável Resistência Flexural.

Variações Consideradas	GL	Somas de Quadrados	Quadrados Médios	F Calculado	Valor P
Grupos	7	139024.9707	19860.7101	12.25	<0.0001
Resíduo	106	171868.0007	1621.3982	-	-
Total	113	310892.9715	-	-	-

Os resultados do teste de Tukey HSD, listados na tabela 4 e visualizados na figura 1 evidenciam, em termos das médias dos grupos, a formação de três classes: Uma classe dos maiores valores de resistência flexural, constituída pelos protocolos de irrigação EDTA (G6; 232.57 MPa), Ascorbato de Sódio (G8; 222.99 MPa) e Ácido Ascórbico (G7; 212.80 MPa); uma classe dos menores valores de resistência flexural, formada pelos protocolos de irrigação Hipoclorito de Sódio 5.25% com EDTA 17% (G2; 138.12 MPa) e Hipoclorito de Sódio 5.25% (G5; 155.74 MPa). Uma classe de valores intermediários de resistência flexural ficou constituída dos protocolos de irrigação Cloreto de Sódio (G1; 191.57), Ácido Ascórbico aplicado após irrigação com Hipoclorito de Sódio 5.25% e EDTA 17% (G3; 176.24 MPa) e Ascorbato de Sódio aplicado após irrigação com Hipoclorito de Sódio 5.25% e EDTA 17% (G4 ; 140.00 MPa).

TABELA 4 – Resistência Flexural - Estimativas por ponto para o desvio padrão e, por ponto e por intervalo (95%) para as médias dos grupos em estudo.

	Grupos	Respostas	Desvio Padrão	Estimativa da Resistência Flexural Média (MPa)			
				Por Ponto ^(*)	Por Intervalo (95%)		
					Limite Inferior	Limite Superior	
	Geral	117	52.45	182.33	172.60	192.06	
Protocolo de irrigação/Grupo	Cloreto de Sódio	G1	15	23.40	191.57 ^b	177.43	205.71
	Hipoclorito de Sódio + EDTA	G2	15	40.30	138.12 ^d	115.79	160.44
	Hipoclorito de Sódio + EDTA + Ácido Ascórbico	G3	15	30.37	176.24 ^{bc}	159.42	190.05
	Hipoclorito de Sódio + EDTA + Ascorbato de Sódio	G4	15	34.49	155.74 ^c	136.64	174.83
	Hipoclorito de Sódio	G5	15	41.27	140.00 ^d	117.13	162.86
	EDTA	G6	14	43.40	232.57 ^a	207.51	257.62
	Ácido Ascórbico	G7	13	52.65	212.80 ^{ab}	180.98	244.62
	Ascorbato de Sódio	G8	15	49.13	222.99 ^a	194.62	251.35

(*) Letras diferentes indicam diferença significativa entre as médias envolvidas, ao nível de significância de 5%, pelo Teste de Tukey HSD.

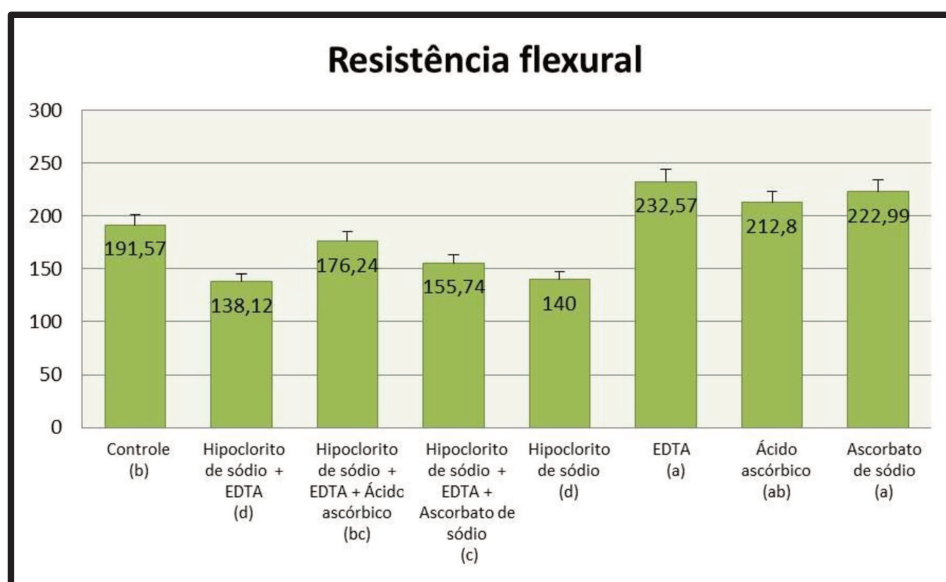


Figura 1 – Distribuição dos valores médios de resistência flexural (MPa) segundo o grupo, resultados do teste de Tukey HSD e erro padrão por grupo.

MICRODUREZA KNOOP

Satisfeitas as pressuposições, adotou-se o modelo linear de Gauss-Markov, caracterizado por $y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha\beta_{ij} + e_{ijk}$ (2), conforme descrito em 1.4. Os resultados da análise de variância realizada estão descritos na tabela 7.

TABELA 7 – Análise de variância da variável Microdureza.

Variações Consideradas	GL	Somas de Quadrados	Quadrados Médios	F Calculado	Valor P
Grupos (G)	7	88726.2613	12675.1802	238.79	< 0.0001
Distâncias (D)	5	87347.0479	17469.4096	329.11	< 0.0001
G x D	35	5614.7425	160.4212	3.02	< 0.0001
Resíduo	1798	95440.1945	53.0813	-	-
Total	1845	278898.8704	-	-	-

Dado que a interação dupla Grupos versus Distâncias ($p < 0.0001$) foi significativa, nada se pode afirmar sobre os efeitos principais dos fatores envolvidos: Grupos e Distâncias. Nesse contexto, foram realizadas reparametrizações no modelo (2) de modo a viabilizar comparações “entre” grupos “dentro” de cada distância e “entre” Distâncias e “dentro” de cada grupo. Os resultados podem ser observados na tabela 8 (1) e (2).

TABELA 8 – Resumo das Análises de variâncias para a variável microdureza.

1 - Análises de Variâncias entre Grupos em cada Distância								
Distância	50	100	200	500	1000	1500		
Valor P	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001		
2 - Análises de Variâncias entre Distâncias em cada Grupo								
Grupo	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8
Valor P	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001

Verifica-se na tabela 8 (1) que houve diferença altamente significativa ($p < 0.0001$) entre grupos em cada uma das seis distâncias consideradas neste estudo. De modo análogo, na tabela 8 (2) constatou-se haver ocorrido diferença altamente significativa ($p < 0.0001$) entre distâncias em cada um dos oito grupos considerados.

Caminhando pelas linhas das tabelas 9 e 10 e observando-se as figuras 3 e 4, verifica-se que houve um comportamento semelhante dos grupos em função da distancia: De modo geral, as microdurezas foram crescentes, em todos os grupos, com o acréscimo da distância, até 1000 μm . Merece destaque as posições ocupadas pelos grupos 4 e 8.

TABELA 9 – Valores em KNH para a Micro Dureza em cada Distância, segundo o Grupo : (1) Valor médio, (2) desvio padrão, (3) limites da estimativa por intervalo, ao nível de confiança de 95%.

Grupos	Distâncias (μm)						
	50	100	200	500	1000	1500	
G1	1	17.85 ^{bc,D}	20.05 ^{b,C}	21.79 ^{b,C}	28.31 ^{c,B}	34.41 ^{b,A}	36.24 ^{b,A}
	2	6.64	6.26	6.14	5.73	10.47	12.12
	3	15.73<>19.98	18.05<>22.05	19.82<>23.75	26.48<>30.15	31.06<>37.76	32.41<>40.07
G2	1	12.76 ^{e,D}	14.23 ^{d,D}	20.69 ^{bc,C}	25.43 ^{d,B}	32.52 ^{c,A}	31.88 ^{c,A}
	2	3.57	2.99	7.01	7.01	7.57	8.57
	3	11.62<>13.90	13.27<>15.19	18.45<>22.93	23.19<>27.87	30.10<>34.94	29.17<>34.59
G3	1	14.54 ^{d,D}	17.84 ^{c,CD}	19.02 ^{c,C}	23.85 ^{de,B}	30.30 ^{cd,A}	31.50 ^{c,A}
	2	5.53	4.96	5.07	5.70	5.65	8.64
	3	12.77<>16.31	16.25<>19.42	17.40<>20.64	22.03<>25.68	28.49<>32.11	27.78<>34.22
G4	1	31.04 ^{a,C}	36.71 ^{a,B}	41.24 ^{a,B}	48.90 ^{a,A}	53.20 ^{a,A}	48.28 ^{a,A}
	2	10.04	8.47	7.75	8.18	6.50	12.43
	3	27.83<>34.25	33.99<>39.42	38.76<>43.71	46.28<>51.52	51.12<>55.28	44.35<>52.21
G5	1	16.17 ^{c,C}	17.17 ^{c,C}	18.65 ^{c,C}	23.71 ^{e,B}	28.06 ^{d,AB}	29.33 ^{cd,A}
	2	5.34	5.76	5.81	7.57	7.56	10.39
	3	14.53<>17.94	15.33<>19.02	16.79<>20.51	21.29<>26.13	25.64<>30.48	26.04<>32.62
G6	1	13.43 ^{de,D}	17.90 ^{c,C}	20.70 ^{bc,C}	29.43 ^{bc,B}	37.26 ^{b,A}	36.89 ^{b,A}
	2	7.51	7.76	8.02	7.59	6.12	9.00
	3	11.03<>15.84	15.42<>20.38	18.13<>23.26	27.00<>31.85	35.30<>39.22	33.80<>39.98
G7	1	13.60 ^{d,D}	14.51 ^{d,CD}	15.44 ^{d,CD}	19.78 ^{f,BC}	24.16 ^{e,AB}	27.03 ^{d,A}
	2	6.47	6.69	6.66	9.42	12.29	13.33
	3	11.53<>15.67	12.37<>16.65	13.31<>17.57	16.77<>22.79	20.23<>28.09	22.81<>31.25
G8	1	19.33 ^{b,D}	20.73 ^{b,D}	24.78 ^{b,C}	31.60 ^{b,B}	37.74 ^{b,A}	38.21 ^{b,A}
	2	7.86	6.87	6.95	6.95	7.60	7.56
	3	16.82<>21.84	18.53<>22.92	22.56<>27.00	29.37<>33.82	35.31<>40.17	35.33<>41.08

(*) Letras minúsculas diferentes em cada coluna indicam diferença significativa ($p < 0.05$) entre médias de grupos na distância especificada pela coluna.

(**) Letras maiúsculas diferentes em cada linha indicam diferença significativa ($p < 0.05$) entre médias de distâncias no grupo especificado pela linha.

TABELA 10 - Comparações Múltiplas entre Médias de Grupos em cada Distância (*) e entre distâncias em cada Grupo(**) – Resultados do teste de Tukey HSD

	50	100	200	500	1000	1500
G1	17.85 ^{bc,D}	20.05 ^{b,C}	21.79 ^{b,C}	28.31 ^{c,B}	36.41 ^{b,A}	36.24 ^{b,A}
G2	12.76 ^{e,D}	14.23 ^{d,D}	20.69 ^{bc,C}	25.43 ^{d,B}	32.52 ^{c,A}	31.88 ^{c,A}
G3	14.54 ^{d,D}	17.84 ^{c,CD}	19.02 ^{c,C}	23.85 ^{de,B}	30.30 ^{cd,A}	31.50 ^{c,A}
G4	31.04 ^{a,C}	36.71 ^{a,B}	41.24 ^{a,B}	48.90 ^{a,A}	53.20 ^{a,A}	48.28 ^{a,A}
G5	16.17 ^{c,C}	17.17 ^{c,C}	18.65 ^{c,C}	23.71 ^{e,B}	28.06 ^{d,AB}	29.33 ^{cd,A}
G6	13.43 ^{de,D}	17.90 ^{c,C}	20.70 ^{bc,C}	29.43 ^{bc,B}	37.26 ^{b,A}	36.89 ^{b,A}
G7	13.60 ^{d,D}	14.51 ^{d,CD}	15.44 ^{d,CD}	19.78 ^{f,BC}	24.16 ^{e,AB}	27.03 ^{d,A}
G8	19.33 ^{b,D}	20.73 ^{b,D}	24.78 ^{b,C}	31.60 ^{b,B}	37.74 ^{b,A}	38.21 ^{b,A}

(*) Letras minúsculas diferentes em cada coluna indicam diferença significativa ($p < 0.05$) entre médias de grupos na distância especificada pela coluna.

(**) Letras maiúsculas diferentes em cada linha indicam diferença significativa ($p < 0.05$) entre médias de distâncias no grupo especificado pela linha.

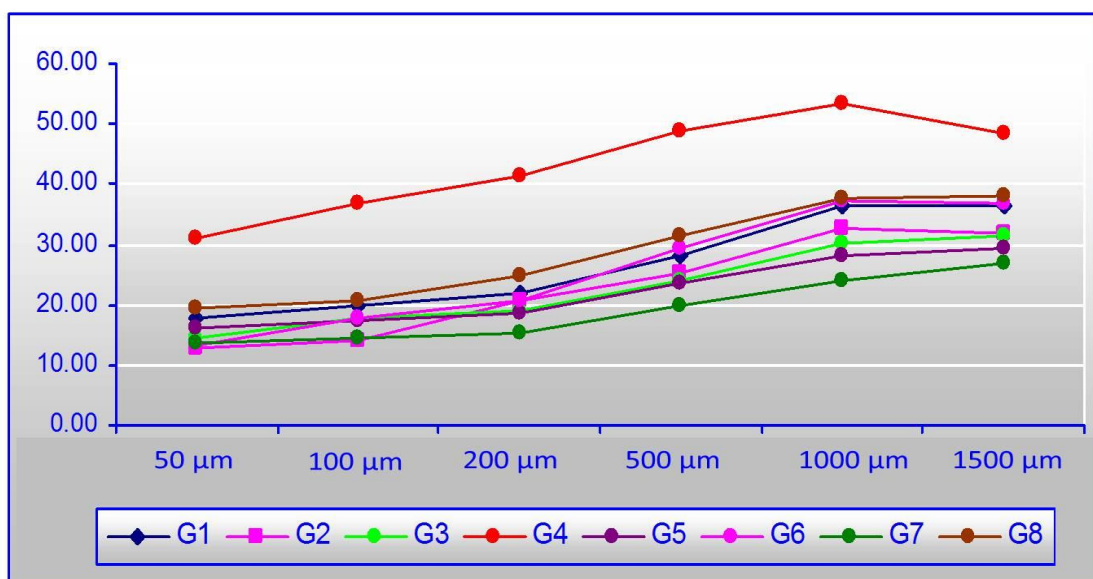


Figura 3 – Distribuição das médias de grupos, em cada distância. Valores de Microdureza em KNH.

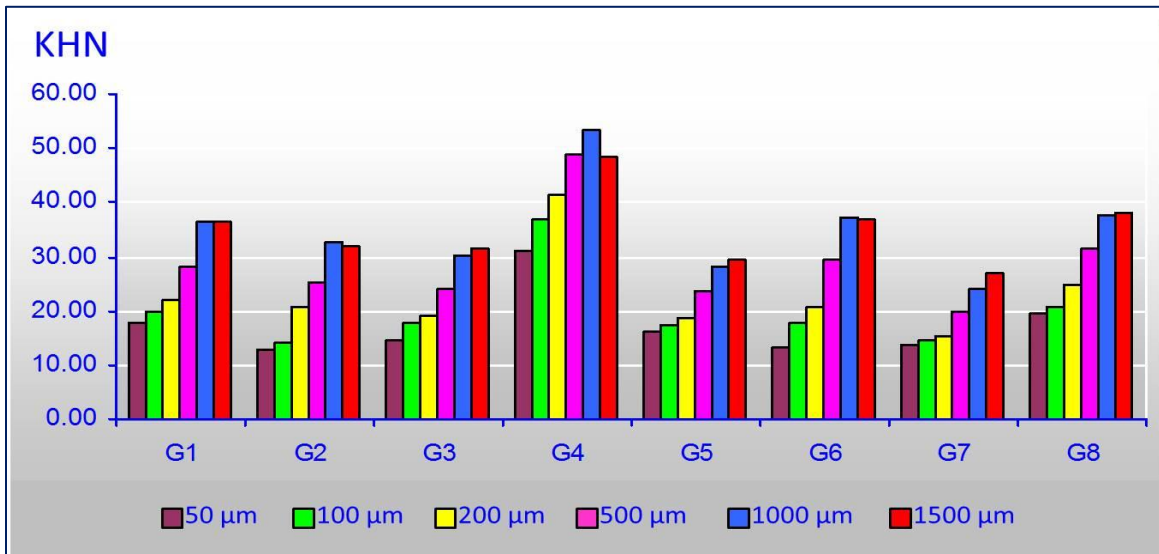


Figura 4 – Distribuição das médias de distâncias, em cada grupo. Valores de microdureza em KHN.

SISTEMAS ESTATÍSTICOS UTILIZADOS

Para a análise estatística dos dados coletados foram utilizados os sistemas estatísticos SAS: *Statistical Analysis System*, versão 8.2; UNISTAT: *Statistical Package for Windows*, versão 5.0 e SPSS: *Statistical Package for Social Sciences*, versão 13.0 for Windows.

REFERÊNCIAS

- CONOVER, W. J. 1980. *Practical Nonparametric Statistics*. 2ª Ed. Jonh Wiley.
- COX, D. R. & SNELL, E. J. 1981. *Applied Statistics – Principles and Examples*. Chapman & Hall.
- NETER, J. & WASSERMAN, W. 1977. *Applied Linear Statistical Models*. Irwin.
- RODRIGUES, M. I. & IEMMA, A. F. 2005. *Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos*. 2ª Ed. Cáritas.
- TUKEY, J. W. 1977. *Exploratory Data Analysis*. Addison-Wesley.
- ZAR, J. H. 1996. *Biostatistical Analysis*. 3ª Ed. Prentice Hall.

Anexo 1

Comprovação da submissão do artigo referente ao Capítulo 1.

Elsevier Editorial SystemTM - Windows Internet Explorer

http://ees.elsevier.com/joe/default.asp

Journal of Endodontics

Submissions Being Processed for Author Alexandre Augusto Zaia, Ph.D

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Current Status
Action Links		Effects of reducing agents on birefringence dentin collagen after use of different endodontics auxiliary chemical substances	Jan 25, 2011	Submitted to Journal

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

<< Author Main Menu

© 2006 - 2011 Elsevier BV.



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



DECLARAÇÃO

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Doutorado, intitulada "INFLUÊNCIA DE SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS AUXILIARES DE USO ENDODÔNTICO E AGENTES REDUTORES NAS PROPRIEDADES BIOMECÂNICAS DA DENTINA RADICULAR", não infringem os dispositivos da Lei nº 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Piracicaba, 18 de Fevereiro de 2011.

Handwritten signature of Danna Mota Moreira.

DANNA MOTA MOREIRA

RG Nº 96002420460

AUTOR

Handwritten signature of Alexandre Augusto Zaia.

ALEXANDRE AUGUSTO ZAIA

RG Nº 17191549

ORIENTADOR