Universidade Estadual de Campinas

Faculdade de Odontologia de Piracicaba

UNICAMP

CURSO DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Monografia de Final de Curso

Influência do Protocolo de Irrigação e Ativação Final na Remoção de Smear Layer dos Canais Radiculares

O material contido no presente estudo
foi devidamente corrigido.

03/10/2011

Aluna: Zarina Tátia Barbosa Vieira dos Santos.
zarinatatia@gmail.com

Zarina dos Santos

Orientadora: Profa. Dra. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes.

bpgomes@fop.unicamp.br

Ano de Conclusão do Curso

2011

ZARINA TÁTIA BARBOSA VIEIRA DOS SANTOS

Influência do Protocolo de Irrigação e Ativação Final na Remoção de Smear Layer dos Canais Radiculares

Monografia apresentada ao curso de Odontologia da Faculdade de Odontologia de Piaracicaba-UNICAMP, para obtenção do diploma de Cirurgiã Dentista.

Orientadora: Profa. Dra. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes
Co-orientador: Daniel Rodrigo Herrera Morante

PIRACICABA

2011

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Marilene Girello - CRB 8/6159

Sa59i

Santos, Zarina Tátia Barbosa Vieira dos, 1989-
Influência do protocolo de irrigação e ativação final na remoção de *Smear Layer* dos canais radiculares / Zarina Tátia Barbosa Vieira dos Santos. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2011.

Orientador: Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes.
Coorientador: Daniel Rodrigo Herrera Morante.
Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Endodontia. 2. Ácido cítrico. 3. Ácido edético. I. Gomes, Brenda Paula Figueiredo de Almeida. II. Herrera, Daniel Rodrigo, 1976- III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

Dedicatória

Aos meus pais, Francisca dos Santos e Apolinário dos Santos, pelo amor e valiosas lições de vida.

Aos meus irmãos, Nick e Jandy, pelo incontestavel carinho e apoio.

Ao meu co-orientador, Daniel Herrera, sem ele, este trabalho não seria possível.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Dra. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes, pela colaboração, ensinamento e seu incentivo durante minha formação.

Ao Professor Dr. João Sarmento Pereira Neto, por todo ensinamento e principalmente carinho e afeição durante minha formação.

“Tem mais sabor se é por amor, brilha mais o que é bonito……Kuya bué se for sem pé….. Kuya bué se for na fé. É bom sinal se é natural deixa fluir”

SARA TAVARES

RESUMO

Para atingir-se os objetivos da terapia endodôntica é importante a utilização de substâncias químicas auxiliares (SQA) que permitam a limpeza e desinfecção dos canais radiculares. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a influência da irrigação e do protocolo de ativação final (PAF) das SQA quelantes na remoção da smear layer (SL) de canais radiculares, in vitro. Foram selecionados 45 pré-molares humanos unirradiculares, com canais retos e ápices formados, e estes divididos aleatoriamente em 3 grupos segundo a SQA utilizada na irrigação final: G1: água destilada (AD, controle); G2: ácido etilenodiamino-tetra-acético (EDTA) 17%; G3: ácido cítrico (AC) 10%. Sendo que cada grupo foi dividido em 3 subgrupos segundo o PAF utilizado: sem ativação (SA), com ativação dinâmica-manual (ADM) com cone de guta-percha ou com ativação sônica (AS). Após o PQM os espécimes foram clivados e processados para análise por terços em microscopia eletrônica da varredura (MEV) por dois avaliadores calibrados. Os escores obtidos foram analisados estatisticamente pelos testes Kruskal Wallis e Mann-Whitney. Com exceção do grupo controle, quando as SQA foram ativadas, seja por ADM ou por AS, obteve-se os melhores resultados de limpeza, sem diferença significativa entre elas ($p>0,05$). Na avaliação por terços, a ativação sônica mostrou os melhores resultados comparada à ADM e ao grupo que não recebeu ativação ($p<0,05$). Conclui-se que a ativação das SQA quelantes favorece a remoção da SL formado durante o PQM dos canais radiculares.

Palavras chave: Smear layer, ativação dinâmica-manual, ativação sônica.

ABSTRACT

To achieve the goals of endodontic therapy is mandatory to use auxiliary chemical substances (ACS) to reach cleanliness and disinfection of root canal systems. Thus, the aim of this study was to evaluate the influence of the irrigation and activation protocols of chelator ACS used during chemo-mechanical preparation (CMP) for smear layer (SL) removal. Forty-five single-rooted human premolars with straight canals and apex formed were selected. The specimens were randomly divided into 3 groups following the ACS used during final irrigation: G1: distilled water (DW, control group); G2: 17% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA); G3: 10% citric acid (CA). Each group was divided into three subgroups according to activation protocol used: without activation (WA), with manual-dynamic activation (MDA) with gutta-percha point, or with sonic-activation (SA). After CMP all samples were sectioned and processed for scanning electron microscopic (SEM) observation of apical thirds assigning scores by 2 calibrated evaluators. The differences in SL scores between the experimental groups were analyzed with the Kruskal-Wallis test and the Mann-Whitney *U* test. When ACS were activated, either by MDA or SA, it was obtained the best cleaning results with no significant difference between substances ($p > 0.05$). Sonic activation showed the best results, when thirds were analized, in comparison with MDA and no activation group ($p<0.05$). The activation of chelator ACS benefits SL removal from root canals.

Key Words: Smear layer, manual-dynamic activation, sonic-activation.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC---------- Ácido cítrico;

AD---------- Água destilada;

ADM---------- Ativação dinâmica-manual com cone de guta-percha;

AS---------- Ativação sônica;

CHX---------- Clorexidina gel;

EDTA---------- Ácido etilendiamino-tetra-acético;

MEV---------- Microscopia eletrônica da varredura;

PAF---------- Protocolo de ativação final;

PIF---------- Protocolo de irrigação;

PQM---------- Preparo químico-mecânico;

SA---------- Sem ativação;

SL---------- Smear layer;

SQA---------- Substâncias químicas auxiliares.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO ……..10

2. REVISÃO DA LITERATURA……12

3. PROPOSIÇÃO……28

4. MATERIAL E MÉTODOS……..29

5. RESULTADOS……39

6. DISCUÇÃO ……43

7. CONCLUSÃO……46

REFERÊNCIAS……..47

1. INTRODUÇÃO

A endodontia basea-se na limpeza e modelagem do sitema de canais radiculares (SCR). Sendo a limpeza, a remoção de microorganismos e seus produtos tóxicos, remanescentes pulpares, material obturador anterior e raspas de dentina resultantes do preparo do canal, e a modelagem uma forma específica de cavidade que permita uma obturação tridimensional o mais hermética possível, (Schilder 1974).

Durante o preparo químico-mecânico (PQM) são formadas raspas de dentina pela ação mecânica dos instrumentos (manuais ou rotatórios), que associadas com tecido orgânico, microrganismos e substâncias químicas auxiliares (SQA) constituem a chamada *smear layer* (SL), (Mccomb e Smith, 1975). Mader et al. 1984, demonstraram que a SL é uma estrutura não-homogênea e fracamente aderida às paredes do canal radicular, possuindo uma espessura de aproximadamente 1-2 µm e podendo penetrar no interior dos túbulos dentinários em uma profundidade de até 40 µm (*smear plugs*).

Pelo fato da SL poder alterar a efetividade de medicamentos intra-canal assim como também a penetração dos cimentos endodônticos nos túbulos dentinários, influênciando na adaptação e na capacidade de selamento dos materiais de preenchimento, justifica-se a tentativa de elimina-la do sistema de canais radiculares (SCR) após o PQM (Economides et al. 1999; Lee et al. 2004; Kokkas et al. 2004).

Sendo assim, a seleção da SQA é importante, pois deve apresentar compatibilidade clínica e propriedades físico-químicas capazes de promover ação antibacteriana, permitir dissolução do tecido, possuir efeito de limpeza, ação quelante, e ser biocompativel com tecidos orais (Cruz filho et al. 2001). Dentre essas SQA, o hipoclorito de sódio (NaOCL) tem sido amplamente descrito na literatura como cadjuvante à terapia endodôntica, (Clarkson RM e Moule AJ 1998; Maillard et al 1998; Estrela et al. 2002).

Porém substâncias alternativas como a clorexidina também tem sido descritas na literatura como SQA, mostrando capacidade antimicrobiana, substantividade e menor citotoxicidade quando comparada ao NaOCL (Denaly

et al. 1982; White, Hays e Janer 1997; Tanomaru-Filho et al. 2002; Dametto et al. 2005; Ferraz et al. 2007).

A necessidade de remover a SL formada durante o PQM e a impossibilidade dela ser removida pelas SQA utilizadas na instrumentação (pela incapacidade de dissolução de tecido inorgânico que elas apresentam), obriga ao profissional utilizar alguma SQA com capacidade quelante (Di Lenarda et al. 2000). Assim, muitas substâncias têm sido testadas no intuito de remover a SL, entre elas o ácido etilenodiamino-tetra-acético (EDTA) em concentrações que variam entre 15 e 17%, e o ácido cítrico (AC), de 5 à 50% (Pérez-Heredia et al. 2008; Prado et al. 2011).

No entando, no terço apical, a limpeza e a formatação são críticas, pois consiste em um espaço reduzido, que exibe infinitas configurações anatómicas como ramificações, canais laterais e terminações apicais em múltiplos portais de saída. Estudos como o de Blank-Gonçalves et al. em 2011, comprovam que pela irrigação convencional do SCR através da injeção de um irrigante intracanal não é possível um desbridamento efetivo de todo o SCR, principalmente, do terço apical.

Recentemente foi descrita a ativação dinâmica-manual com cone de guta-percha (AMD, Caron et al. 2010), mostrando que tanto ela quanto a ativação sônica e ultra-sônica melhoram significativamente a capacidade das substâncias quelantes na remoção da SL dentro dos canais radiculares. Porém não existe um protocolo estabelecido quanto ao tempo ideal e a forma de aplicação destas substâncias. Assim, o presente estudo teve por objetivo avaliar, *in vitro*, a influência da irrigação e do protocolo de ativação final (PAF) das SQA quelantes na remoção da SL de canais radiculares.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Smear layer endodôntica.

O termo *smear layer* foi utilizado, primeiramente por Boyde e Stewart em 1963. Mas foram McComb e Smith em 1975, quem a detetaram após o PQM do SCR, com aparência semelhante à SL formada após o preparo de cavidades coronárias. Entretanto, esses autores observaram que diferentemente da SL coronária, composta basicamente por dentina, a SL do SCR possuía uma porção inorgânica de tecido calcificado, proveniente da dentina, e era composta, ainda por remanescentes dos processos odontoblásticos, tecido pulpar e microrganismos.

Cameron em 1983 denominou à SL que recobre as paredes dentinárias como “SL superficial” enquanto aquela que pode observar-se no interior dos túbulos dentinários foi denominada “*smear plug*”. Neste estudo foi analisada a SL em magnitudes que variam de 1.000 a 5.000X, observando que a SL superficial encontra-se ligada frouxamente à dentina adjacente, com cerca de 1 a 2 µm e a *smear plug* pode penetrar nos túbulos dentinários a uma profundidade de até 40 µm.

Quanto a composição, Sabet et al. em 2008 relataram que a composição da SL difere de acordo com a estrutura a partir da qual ela se origina, podendo assim ser composta de dentina orgânica e inorgânica, fragmentos celulares da polpa (como restos de processos odontoblásticos, enzimas citoplasmáticas e organelas), componentes sanguíneos residuais, restos fibrosos de colágeno, proteínas desnaturadas, produtos e resíduos necróticos (quando de necrose pulpar se trata) ou microorganismos (quando presentes).

Segundo Michelich et al. 1980, o principal motivo para a não remoção da SL, após a instrumentação dos canais radiculares, é a hipótese dessa camada servir como uma importante barreira física para bactérias e seus subprodutos, dificultando a sua penetração passiva na dentina. Contudo Williams e Goldman em 1985 demonstraram que a presença de SL retardou a penetração da espécie bacteriana *Proteus vulgaris* na dentina, mas não foi

capaz de impedir essa invasão. Além disso, Baker et al. 1975, Akpata e Blechman 1982, Yamada et al. 1983, demonstraram que mesmo após a etapa de instrumentação dos canais radiculares, auxiliada por agentes antimicrobianos, bactérias podem estar presentes na SL, na dentina e nos túbulos dentinários, podendo estas sobreviver, crescer, multiplicar-se e penetrar nos túbulos dentinários.

Para o selamento apical, Madison e Krell em 1984, Evans e Simon em 1986 e Fróes et al. em 2000, demonstraram que a presença ou remoção da SL não influênciava significativamente no selamento apical dos canais radiculares obturados. Contudo, Mader et al. em 1984 demonstraram que a SL é uma estrutura não-homogênea e fracamente aderida às paredes do canal radicular; assim, na presença de um infiltrado em um canal radicular obturado, essa camada pode dissolver e/ou desintegrar-se a partir da liberação de enzimas proteolíticas pelas bactérias remanescentes levando ao desenvolvimento de um espaço vazio entre a parede do canal radicular e o material de obturação, através do qual pode ocorrer a invasão de outras espécies bacterianas, contaminando toda a superfície dentinária e o tecido periradicular.

No intuito de avaliar se a presença ou ausência de SL serviria para reter bactérias no interior dos canais, Drake et al. em 1994, utilizaram 21 dentes humanos unirradiculares, instrumentados pela técnica *step back*, utilizando como solução irrigadora NaOCl 2,5%. Os espécimes foram divididos em G1: sem remoção de SL (irrigação dos canais com água destilada); G2: com remoção de SL (irrigação final com REDTA 17% e NaOCl 2,5%). Posteriormente as amostras foram incubadas com *Streptoccus anginosus* por duas semanas, quando se fez uma análise microbiológica a qual evidenciou que nos dentes onde era mantida a SL houve menor colonização bacteriana do que nos dentes onde a SL foi removida. Os autores acreditam que a SL seria benéfica por bloquear as entradas das bactérias dentro dos túbulos dentinários.

Em uma extensa revisão de literatura feita por Sen et al. em 1995, foram relatadas as vantagens e desvantagens do fenómeno da SL e a contradição existente sobre a sua remoção dos canais instrumentados. A conclusão dos autores foi de que a remoção de SL é mais vantajosa devido às possíveis desvantagens relacionadas às características e à permanência dessa camada sobre as paredes do canal radicular.

Outra revisão foi feita por Torabinejad et al. em 2002, a respeito das implicações clínicas da SL em endodontia. De acordo com estes autores os métodos de instrumentação dos canais radiculares produzem uma camada de material orgânico e inorgânico (SL) a qual pode conter bactérias e seus subprodutos. Esta camada cobre as paredes instrumentadas podendo impedir a penetração da medicação intracanal nos túbulos dentinários, além de afetar a íntima adaptação entre o material de preenchimento radicular e as paredes da dentina radicular. Considerando as observações acima os autores relataram que seria razoável a remoção da SL, pois resultaria em uma maior desinfecção dos sistemas dos ranais radiculares e dos túbulos dentinários, o qual promoveria uma melhor adaptação entre o material de obturação e as paredes dos canais radiculares. Para uma desinfecção efetiva do SCR, um irrigante ou medicação intracanal com as seguintes características deveriam ser usado: 1) ser capaz de remover completamente a Sl; 2) desinfetar a dentina e seus túbulos; 3) efeito antibacteriano sustentado após uso; 4) permitir a penetração dos agentes antimicrobianos presentes nas soluções nos túbulos dentinários; 5) ser antigénico, não tóxico e não carcinogénico para as células dos tecidos ao redor do dente; 6) não possuir efeito adverso nas propriedades físicas da dentina exposta; 7) nenhum efeito adverso na capacidade de selamento dos materiais de preenchimento; 8) não descolorir o dente; 9) conveniente aplicação e 10) relativamente acessível.

De acordo com Lee et al. 2004, é de grande importância a remoção da maior quantidade dos debris como parte essencial do tratamento endodôntico. A não remoção destes levaria a dois problemas: o primeiro deles seria o fato de que o hidróxido de cálcio e outros medicamentos que atuam apenas quando em contato direto com os patógenos não seriam atuantes no espaço ocupado pelos debris não sendo, portanto, efetivos; segundo, somente as áreas livres de debris poderiam ser preenchidas por gutta-percha e cimento, sendo assim a presença de debris nas extensões dos canais permitiria que houvesse espaços sem selamento.

A SL deve ser considerada como um cocktail patogênico que potencialmente abriga remanescentes dos tecidos pulpares, microrganismos e irritantes a ela relacionados (Ruddle, 2007).

2.2. Clorexidina como substância química auxiliar no preparo químico-mecânico.

A procura de uma substância com propriedades antimicrobianas, capacidade de dissolver tecidos e, concomitante biocompatibilidade com os tecidos periapicais continua sendo o objeto de muitos estudos.

O seguinte comentário foi feito por Dakin em 1915, quanto ao princípio de esterilização de uma superfície infectada: para tornar uma ferida estéril é necessário usar um anti-séptico de modo que ele fique em contato e em concentração adequada com todas as paredes da ferida. Se essas condições são satisfeitas, haverá resposta ao tratamento através da diminuição e desaparecimento dos microrganismos.

O digluconato de clorexidina possui um amplo espectro de ação, agindo sobre bactérias gram-positivas, gram-negativas, fungos e leveduras. Quando utilizado em baixas concentrações, seu efeito é bacteriostático, sua carga positiva se liga à carga negativa da parede da célula bacteriana, alterando o equilíbrio osmótico e fazendo com que haja perda de substâncias intracelulares de baixo peso molecular; já em altas concentrações, ela é batericida e faz com que o citoplasma da célula precipite-se, o que resulta em morte celular. A clorexidina, mesmo em baixas concentrações também age inibindo o sistema fosfo-enol-piruvato-fosfo-transferase, responsável pelo transporte de açúcar pelas bactérias, e ainda se ligando às bactérias, e glicoproteínas salivares para interferir na adesão da bactéria ao dente, (Bonesvoll P et al. 1974; Rolla G e Melsen 1975).

Denaly et al. em 1982, estudaram o efeito da clorexidina como irrigante radicular em dentes recém-extraídos com polpa necrosada. O número de consultas requeridas para reduzir a microbiota do canal radicular variou para a clorexidina 0,2% em 2,1 consultas e para o NaOCl 2,5% em 1,7. Concluindo que a clorexidina 0,2% pode ser um eficaz agente antimicrobiano quando usado como irrigante endodôntico, ou como medicação intracanal entre sessões, pelo fato de reduzir quantitativamente as bactérias no interior do canal radicular.

Ringel et al. em 1982, analisaram *in vivo* o efeito da clorexidina 0,2% e do NaOCl 2,5% como irrigantes endodônticos. A amostra consistiu em 60

dentes assintomáticos com polpa necrosada de 52 indivíduos. O efeito dos dois irrigantes foi monitorado no início e no término de cada sessão, pela análise de amostras microbiológicas e identificação de bactérias aeróbias e anaeróbias. Os autores concluiram que o NaOCl 2,5% como irrigante endodôntico foi mais eficaz que a clorexidina 0,2% como agente antibacteriano.

Ohara et al. 1993, avaliaram o efeito antibacteriano de vários irrigantes endodônticos (NaOCl 5,25%, peróxido de hidrogénio 3,0%, solução salina estéril, EDTA 17%, clorexidina 0,2% e solução saturada de hidróxido de cálcio) sobre seis bactérias (*Peptostreptococcus magnus, Propionibacterium acnes, Veillonella parvula, Lactobacillus fermentum, Porphyromonas gingivalis e Fusubacterium nucleatum*). Como resultado a clorexidina foi a substância que mostrou maior efeito antibacteriano, o peróxido de hidrogênio, NaOCl e EDTA foram menos eficazes, e o hidróxido de cálcio e a solução salina foram ineficazes.

Em um estudo realizado por Jeansonne e White em 1994, foi avaliado o efeito antimicrobiano da clorexidina 2,0% e do NaOCl 5,25%. Durante a instrumentação a diferença entre estes não foi significativa, porém após 24 horas a eficácia da clorexidina como antimicrobiano foi de 83% e do NaOCl 50% na redução da carga microbiana, mostrando maior substantividade da clorexidina.

Esta característica de atividade antimicrobiana residual foi também observada por White, Hays e Janer em 1997, onde foram coletadas amostras de dentes humanos, instrumentados com clorexidina 2,0% e 0,12% e com posterior lavagem com água esterilizada. As amostras foram coletadas com intervalos de tempo de 6, 12, 24, 48 e 72 horas após o PQM. A atividade antimicrobiana esteve presente em todas as amostras tratadas com clorexidina a 2,0% depois de setenta e duas horas, já com a clorexidina 0,12 % houve uma ação relativamente menor em todas as amostras. Os resultados indicaram que a clorexidina 0,12% possui efeito residual na ação antimicrobiana quando usada como irrigante endodôntico. Concordando com o estudo *in vivo* de Leonardo et al. 1999, onde o tratamento com clorexidina a 2,0% mostrou uma redução de 77,78% da carga bacteriana sobre microrganismos anaeróbios depois da segunda sessão. Demonstrando que a clorexidina evitou a atividade

microbiana *in vivo* com efeito residual, no interior dos canais radiculares, após quarenta e oito horas.

Uma comparação da eficácia antimicrobiana do NaOCl 2,5% com a clorexidina 0,2%, separadamente e em combinação, como irrigantes endodônticos foi feita *in vivo* por Kuruvilla e Kanath em 1998. Dez dentes anteriores com polpa necrosada foram irrigados com: NaOCl 2,5%; clorexidina 0,2%; NaOCl 2,5% com clorexidina 0,2%, sendo que as amostras microbiológicas foram coletadas antes e durante a irrigação. O estudo indicou que o uso de NaOCl e clorexidina combinados resultou em grande redução do número de culturas positivas. Provavelmente por formar a “clorexidina clorito” que é uma substância bactericida. Essa redução foi significante comparada ao uso isolado de NaOCl, mas não significativa quando comparada ao uso isolado da clorexidina. Por outro lado a associação destas duas substâncias apresenta interação química formando um precipitado (*smear layer* química) (Bui et al. 2008; Krishnamurthy e Sudhakaran, 2010).

Para analisar o efeito antibacteriano de irrigantes endodônticos em bactérias Gram negativas anaeróbias e bactérias facultativas, Siqueira et al. 1998, utilizaram soluções de NaOCl 0,5%, NaOCl 2,5%, NaOCl 4,0%, clorexidina 0,2%, clorexidina 2,0%, AC 10,0% e EDTA 17,0%. Todas as soluções inibiram as bactérias testadas (*Phorphyromonas endodontalis*, *Phorphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermédia, Prevotella nigrescens, Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mutans*, *Sterptococcus sanguis* e *Sterptococcus sobrinus*) sendo o NaOCl 4,0% o agente antibacteriano mais eficaz. Ambas as soluções de clorexidina (0,2% e 2,0%) inibiram todas as bactérias, porém foram menos eficazes que o NaOCl (2,5% e 4,0%). A clorexidina não é tóxica na concentração utilizada, enquanto que o NaOCl é tóxico e irritante nas concentrações 2,5% e 4,0%. Por outro lado, o NaOCl possui uma propriedade que a clorexidina não tem, a de dissolver tecidos pulpares. Desse modo, todas as substâncias têm vantagens e desvantagens a serem consideradas.

Os efeitos antifúngicos do NaOCl e da clorexidina nos canais radiculares foram estudadas por Sen et al. em 1999, onde 132 secções radiculares foram divididas em 2 grandes grupos (SL removida/SL não removida) e fixadas em um meio com (*Candida albicans).* Na presença de SL,

a atividade antifúngica de todos os irrigantes só se iniciou após uma hora sendo que nos dentes sem SL a atividade antifúngica foi superior. Em trinta minutos o NaOCl 5,0% mostrou atividade antifúngica de 70,0%, e em uma hora foi totalmente eficaz na eliminação da carga fúngica. A clorexidina 0,2% e o NaOCl 1,0% mostraram eficácia total em uma hora.

A clorexidina gel foi avaliada por Ferraz et al. 1999, na tentativa de verificar se este possuía algumas das propriedades necessárias a um irrigante endodôntico considerado ideal. Além dele outras SQA como o NaOCl e a solução de clorexidina, foram submetidas ao teste de difusão em ágar. A clorexidina gel foi a que criou maiores halos de inibição de crescimento contra microorganismos frequentemente encontrados na microbiota endodôntica, além de apresentar maior capacidade de remoção da SL na eliminação de *E. faecalis* dos canais radiculares, durante a instrumentação *in vitro*. A viscosidade do gel compensou a inabilidade da clorexidina de remover tecidos pulpares e ainda removeu restos de dentina e outros tecidos, resultando em limpeza adequada da parede dentinária. Concluindo-se que a clorexidina gel tem potencial para ser utilizado como SQA.

No quesito tensão superficial um estudo de Tasman et al. 2000, onde foram utilizadas água destilada, NaOCl 2,5%, NaOCl 5,0%, EDTA 17%, peróxido de hidrogênio 3,0%, citanest-octapressin 3,0% e clorexidina 0,2%, observaram-se os seguintes resultados em dyne/cm: clorexidina 0,2% - 32; NaOCl 2,5 % - 41, NaOCl 5% - 43; EDTA 17% - 46; citanest - octapressin - 68; peróxido de hidrogênio - 63; solução salina – 66, e água destilada - 70. Essa menor tensão superficial permite que a clorexidina penetre melhor nos túbulos dentinários.

Gomes et al. em 2009 avaliou a ação antimicrobiana de medicamentos intracanais na superfície externa da raiz com ou sem cemento. Em ordem crescente o efeito antimicrobiano sobre *E. faecalis, Candida albicans, Actinomyces viscosus e Porphyromonas gingivalis* foi: clorexidina gel 2%, hidróxido de cálcio com clorexidina gel 2%, hidróxido de cálcio com clorexidina gel 2% + óxido de zinco, hidróxido de cálcio + solução salina. Concluindo então os autores, que a clorexidina gel 2% difunde-se pela dentina e atinge a superfície externa do dente, exercendo sua ação antimicrobiana.

Tanomaru-Filho et al. em 2002, avaliaram a biocompatibilidade do NaOCl 0.5%, clorexidina a 2% e solução salina de fosfato tamponado (solução controle) na resposta inflamatória desencadeada por estas substâncias na cavidade peritonial de 60 ratos. Cinco animais de cada grupo foram sacrificados após 4, 24 e 48 horas, e 7 dias, e o líquido da cavidade peritonial de cada animal foi coletado para contagem de células inflamatórias. Os resultados mostraram que o NaOCl 0,5% causou irritação tecidual e intensa resposta inflamatória, enquanto que, a clorexidina a 2% mostrou ser biocompatível, podendo representar alternativa ou complemento para o NaOCl durante a irrigação.

Para Akisue et al. em 2010, o uso combinado de NaOCl e clorexidina com AC resulta na formação de um precipitado floculado que age como uma camada de SL química reduzindo a permeabilidade dentinária no terço apical.

2.3. Substâncias quelantes.

O termo quelar originou-se da palavra grega “chele”, que significa garra. Os quelantes são basicamente complexos estáveis de íons metálicos com substâncias orgânicas. Essa estabilidade é resultado da ligação entre o quelante, que apresenta mais de um par de elétrons livres, e o íon metálico central. Sua eficiência depende de fatores como: comprimento do canal radicular, dureza da dentina e profundidade de penetração, tempo de aplicação, pH e concentração da substância (Serper e Çalt, 2002).

Os quelantes foram introduzidos na Endodontia com o objetivo de ajudar a preparação de canais radiculares estreitos e calcificados, assim como para promover a remoção da SL, (McComb e Smith 1975; Di Lenarda et al. 2000; Scelza et al. 2000).

2.3.1 Ácido etileno-diamino-tetracético-dissódico (EDTA).

De acordo com a literatura, o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) é o agente de ação quelante mais utilizado para remover o conteúdo inorgânico do SCR (Mc Comb e Smith, 1975; Goldman et al. 1981).

Nygaard-Østby em 1957 foi quem introduziu o EDTA na Endodontia, com a finalidade de auxiliar na instrumentação de canais atresicos, sob a forma de uma solução aquosa (Hulsmann, Heckendorff e Lennon, 2003).

Sendo a dentina um complexo molecular composto, basicamente, por hidroxiapatita, o mecanismo de ação do EDTA se basea em sequestrar os íons cálcio bivalentes presentes nos cristais de hidroxiapatita, formando associações estáveis até a completa saturação da ação quelante, o que confere à solução sua característica auto-limitante (Leonardo, 1998).

Quanto a toxicidade, Segura et al. 1996, observaram que baixas concentrações de EDTA dissódico interferem nas funções dos receptores peptídeos intestinais vasoativos (VIP) das membranas dos macrófagos. Baseando-se em estudos anteriores, em que os autores constataram que os receptores VIP estimulavam a produção de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) e inibiam a capacidade de adesão a agentes estranhos, foi concluído que a extrusão do EDTA nos tecidos periapicais, ao modificar essa interação VIP–macrófago, poderia alterar a regulação neuroimunológica e inibir a ação fagocitária dos macrófagos. Assim, eles levantaram a hipótese de que o EDTA, ao atingir os tecidos periapicais de humanos durante o tratamento endodôntico, mesmo que em baixas concentrações, poderia comprometer os mecanismos inflamatórios das lesões periapicais. E um ano depois os mesmo autores confirmaram que o EDTA causou a diminuição da capacidade de adesão dos macrófagos inflamatórios em camundongos.

Yamashita et al. em 2003, utilizando o sistema de avaliação por escores de imagens de MEV, observaram que a melhor limpeza das paredes do canal radicular foi atingida com a combinação de NaOCl e EDTA, em relação à clorexidina 2% e NaOCl aplicados isoladamente, sendo que a limpeza dos terços cervical e médio do canal radicular foi melhor que a do terço apical.

Em relação ao tempo de aplicação do EDTA, Çalt e Serper em 2002, mostraram que os espécimes tratados com EDTA a 17% por 1 minuto, seguido por irrigação com NaOCl a 5%, apresentam a completa remoção desta camada nas superfícies radiculares instrumentadas, sendo que os túbulos dentinários parecem estar abertos. Todavia nos espécimes tratados com EDTA a 17%, durante 10 minutos, seguindo-se da aplicação do NaOCl a 5%, embora resulte

na remoção integral da camada residual promove excessiva erosão da dentina peritubular e intertubular. De acordo com estes achados, para inibir a erosão dentinária, a solução de EDTA deve ser aplicada, no máximo, por 1 minuto, principalmente em dentes jovens nos quais a dentina encontra-se com túbulos dentinários mais abertos.

No entanto um estudo realizado por Malvar et al. em 2009, revelou que a atividade quelante do EDTA (3%, 5%, 10% e 17%), nos tempos de 1 e 3 min não tiveram diferenças estatisticas. Sugerindo que a aplicação clínica do EDTA durante 1 minuto leva em consideração não só a eficácia do produto, como também a redução do tempo de contato entre esta solução, a superfície dentinária e as áreas adjacentes, minimizando o indesejável efeito citotóxico.

2.3.2 Ácido Cítrico.

Diversos tipos de ácidos têm sido investigados para avaliar a desmineralização dentinária e remoção da SL. O ácido cítrico (AC) em diferentes concentrações tem sido sugerido como substância quelante para a irrigação final do canal radicular.

O uso do AC 50% alternado com NaOCl, durante a instrumentação do SCR foi proposto por Loel em 1975. Pois segundo o autor o AC 50 % é um agente eficaz na remoção de tecido vital e que seu uso ainda condiciona a dentina para receber o material obturador.

Para Wayman et al. 1979, o uso de uma solução de AC 10%, seguido de NaOCl a 2,5% como irrigante, e depois novo uso de solução de AC, produzem paredes radiculares limpas com túbulos dentinários patentes.

Num esdudo comparando a eficácia antimicrobiana do AC 25%, AC 50%, NaOCl e solução salina estéril, em intervalos de 5 e 15 minutos de Smith e Wayman em 1986, os resultados revelaram que apesar do AC possuir ação antimicrobiana, ele não foi tão eficaz como o NaOCl a 5,25%. Assim, os autores sugeriram que a irrigação ideal dos canais radiculares deve-se envolver o uso de NaOCl e AC, sendo este último como irrigante final.

A concentração de AC mais indicada para remover SL é 10%, pois além de eficaz tem baixa citotóxidade para os tecidos humanos. Indo de encontro com os resultados obtidos por Scelza et al. em 2001, que ao avaliar a

biocompatibilidade dos tecidos periapicais com o AC e EDTA-T, utilizando cultura de fibroblastos os autores concluíram que o AC é mais biocompatível que o EDTA-T.

Pesquisando a capacidade de limpeza dos canais radiculares promovida pelo líquido de Dakin e pelo AC em diferentes concentrações (3, 6 e 10%) como soluções irrigantes, Savioli et al. em 1993, utilizaram 20 dentes extraídos que após instrumentação e irrigação foram submetidos a processamento histológico e análise em fotomicroscópio. Os autores concluíram que nenhum dos irrigantes removeu totalmente os detritos do canal, sobretudo no terço apical. Não houve diferença estatística quanto à capacidade de limpeza entre Dakin e o AC, sendo viável a utilização segura desse último a 10%.

Estudando *in vitro* a capacidade de limpeza e remoção da SL, Di Lenarda et al. em 2000, utilizaram 81 dentes os quais foram divididos em grupos de acordo com a instrumentação recebida (manual ou rotatória), associadas à irrigação final com AC e EDTA e posterior avaliação em microscópio eletrônico de varredura. Diante dos resultados obtidos concluíram que a solução de AC foi tão efetiva na remoção do magma dentinário quanto o EDTA.

Outro estudo *in vitro* realizado por Scelza et al. em 2000, utilizou 30 dentes humanos recém extraídos, os quais foram submetidos ao PQM e divididos em três grupos de acordo com a irrigação final (AC, EDTA-T e água oxigenada), os autores por meio de MEV analisaram o grau de remoção de remanescente pulpar e magma dentinário dos canais radiculares. Concluíram que não houve diferenças estatísticas significantes entre AC e EDTA-T, porém o uso de AC e do EDTA-T mostraram túbulos dentinários mais visíveis quando comparadas com o grupo de uso da água oxigenada.

Machado-Silveiro et al. em 2004, compararam o AC a 1% e 10%, EDTA a 17% e citrato de sódio a 10%, avaliando a capacidade desmineralizante dessas soluções. Amostras de dentina foram submersas por 5, 10 e 15 minutos nas soluções testadas. Os resultados indicaram que o AC, tanto a 1% como a 10%, foi mais eficiente que o EDTA a 17%. Ainda, de acordo com este mesmo estudo, o uso de AC 10% além de 30 segundos

provoca um efeito indesejado destruindo excessivamente o espaço intertubular promovendo formação de crateras na dentina.

2.4 Sistema de irrigação.

É oportuno considerar que a efetividade de uma solução depende de vários fatores, entre eles, a anatomia do canal radicular, volume utilizado, técnica de preparo do canal radicular, diâmetro do preparo apical, calibre das agulhas irrigadoras assim como a profundidade de penetração das mesmas (Lopes et al. 2004).

O completo desbridamento do SCR constitui um componente crítico da terapia endodôntica, principalmente no terço apical, pois além do seu menor diâmetro, nessa região pode haver também um acúmulo de ar formando uma espécie de vácuo o qual impede o contato da solução irrigadora. Este fenómeno é conhecido durante procedimentos endodônticos, nos quais a agulha irrigadora atinge apenas terços médio e coronário, sendo que este ar enclausurado na porção apical pode impedir a desinfecção total do SCR (Gu et al. 2009).

2.4.1 Sistema convencional de irrigação.

Este sistema é constituído por diferentes agulhas e cânulas flexíveis, pelo qual é feita a injeção vigorosa das SQA, sendo que pelo motivo de permanecer frouxa no canal, a cânula permite o refluxo de irrigante e o movimento de debris coronalmente. A limitação desta técnica consiste no fato do irrigante permanecer estático, restringindo o potencial de penetração e circulação do reagente e limpeza de todas as áreas (Ruddle, 2007; Hockett et al. 2008).

Pelo fato do movimento do fluido criado nesse sistema de irrigação ser bastante fraco e a SQA ser dispensada a apenas 1 mm de profundidade além da ponta da agulha, tendo em conta que a ponta da agulha normalmente localiza-se no terço coronário de canais atrésicos, ou, no máximo, em terço médio de canais mais amplos, há permanência de irregularidades e áreas inacessíveis do SCR abrigando debris e bactérias. Fatores como tipo de

agulha, seu posicionamento no interior dos canais devem ser observados a fim de maximizar os efeitos da irrigação e evitar extrusão de SQA, pois o posicionamento mais profundo da agulha no interior do canal radicular é mais efetivo na remoção de detritos, entretanto aumenta as chances de extrusão periapical, (Broewn et al. 1995).

A influência da profundidade da agulha em relação à otimização da limpeza do sistema de canais radiculares também foi demonstrada por Abou-Rass e Piccinino 1982 e por Sedgley et al. em 2005. Neste último estudo os autores compararam a eficácia da irrigação mecânica de 6 ml de irrigante inerte colocado a 5 mm do comprimento de trabalho e a 1 mm deste. Os autores afirmaram que a profundidade da agulha de irrigação foi um fator significante na redução da população bacteriana de canais radiculares.

Quanto ao calibre da agulha de irrigação, Chow em 1983 propôs o uso de agulhas bem finas, posicionadas o mais profundo possível e limitadas ao interior do canal para obter uma irrigação efetiva nos 5 mm apicais. Sendo que Abou-Rass e Piccinino em 1982, ressaltam que para maior remoção de debris, agulhas de menor diâmetro, com calibre de 27 ou 30, devem ser posicionadas no terço apical.

No entanto o menor diâmetro da agulha implica na necessidade de aplicar mais força para empurrar o êmbolo (Moser e Heurer 1982) e o aumento da pressão aplicada durante a irrigação tem sido associado com a extrusão do irrigante pelo ápice (Druttman e Stock 1989; Ahmet et al., 2004; Gernhardt et al. 2004). Da mesma forma, o travamento da agulha na parede do canal durante a irrigação, aumenta o risco de extrusão de irrigante para os tecidos perirradiculares (Boutsioukis, Lambrianidis e Kastrinakis 2009).

Durante a irrigação a agulha deve ser introduzida frouxamente no canal e o líquido injetado com uma pressão mínima. Desta forma, evita-se uma extrusão acidental da SQA para os tecidos periapicais permitindo um espaço para a solução circular no interior do canal removendo partículas em suspensão, (Brown et al. 1995; Beeson et al. 1998; Gu et al. 2009).

2.4.2 Sistemas de irrigação ativa.

Para Jadaa et al. 2009, quando um instrumento é ativado no interior do canal, ocorre a produção de um fenômeno denominado corrente hidrodinâmica. Esta corrente é um dos mecanismos que fornecem um desbridamento superior produzindo forças de cisalhamento capazes de romper biofilmes e remover debris.

Instrumentos endodônticos de ativação ultra-sônica e sônica têm sido indicados para promoverem uma melhora do desbridamento do SCR. Dispositivos ultra-sônicos foram introduzidos na endodontia por Richman em 1957. Um equipamento ultra-sônico comercial projetado por Cunningham e Martin foi designado para uso endodôntico em 1982. Assim, dispositivos ultra-sônicos têm sido desenvolvidos para a irrigação do SCR (Jensen et al. 1999; Fukumoto et al. 2006).

Em um estudo realizado por Burleson et al. em 2007, foi verificada a eficiência do desbridamento de canais radiculares comparando dois grupos: um grupo com instrumentação manual e rotatória e outro grupo com as mesmas instrumentações seguido de 1 minuto de irrigação ultra-sônica. Os autores concluíram que a completa remoção de debris, tecidos e biofilmes bacterianos apenas pela técnica de instrumentação manual ou manual associada à rotatória foi impossível. Afirmaram ainda que, 1 minuto de irrigação ativada pelo ultra-sôm após instrumentação manual conjugada com a instrumentação rotatória aumentou os valores de limpeza do SCR de 83% para 91% em todos os terços avaliados.

A técnica mais efetiva no desbridamento do SCR pode ser a ativação da lima sônica ou ultra-sonicamente dentro de um canal como um passo final de sua preparação. Essa ativação implica em criar o movimento do fluido sem que o instrumento entre em contato com as paredes do canal. Os instrumentos sônicos operam em frequências menores (1-10 kHz) e produzem menores forças de cisalhamento do que os ultra-sônicos os quais operam em frequências que variam de 25-40 kHz (Jensen 1999; Gu et al. 2009).

Para Ruddle 2007, a irrigação de forma ativa é desejável para iniciar a hidrodinâmica fluida e detém a promessa de melhorar a limpeza do SCR em todos os aspectos. Existe um aumento das evidências endodônticas que

suportam que a ativação do fluido em canais bem formatados possui papel estratégico no desbridamento e anti-sepsia do sistema, incluindo os túbulos dentinários, canais laterais, ramificações e anastomoses. O maior foco hoje em dia está em como ativar uma determinada solução para maximizar o fenômeno hidrodinâmico. Os métodos tradicionais têm incluído o aquecimento de reagentes utilizando dispositivos de transferência de calor, vibração ativa e instrumentos metálicos não ativos (superfície lisa) com energia ultra-sônica, utilização de soluções eletroquimicamente ativadas ou o suave bombeamento com cones de gutta-percha, de calibres apropriados, para levar e trocar um determinado reagente (Caron et al. 2010).

Um estudo feito por Jiang et al. em 2010, avaliou a remoção de detritos de dentina do canal radicular por ativação sonora ou ultra-som do irrigante e os mecanismos físicos de ativação sonora, visualizando as oscilações da ponta sônica, tanto dentro como fora do confinamento da raiz canal. Os autores concluíram que a ativação do irrigante resultou na remoção de detritos mais significativa sendo a ativação ultra-sônica mais eficiente do que a sonora. E a amplitude de oscilação das pontas sonoras é de 1,2 $\pm$ 0,1 mm, resultando em contato com a parede sem cavitação.

Diferentes protocolos de ativação foram avaliados por Caron et al. em 2010, na eficácia para remoção de SL em canais curvos. Canais mesiais de 50 molares inferiores foram preparados utilizando limas rotatorias ProTaper e divididos em grupos dependendo do protocolo de irrigação final: não-ativação (irrigação final com EDTA 17% e finalmente NaOCl 3%); ativação dinâmica-manual (EDTA 17% + agitação com cone guta-percha e finalmente NaOCl 3%); ativação automatizada (EDTA 17% + ativação sonica com RinsEndo e finalmente NaOCl 3%); Endoactivator (EDTA 17% com Endoactivator e finalmente NaOCl 3%). Após analise das amostras no MEV, os autores concluem que existe um beneficio na limpeza dos canais quando realiza-se ativação, especialmente a sônica e dinâmica-manual.

Em um estudo *in vitro*, Abarajithan et al. 2011, compararam o sistema de irrigação Endovac com o de irrigação convencional na remoção de SL intraradicular. Os autores conluiram quem houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos de teste na remoção de SL do terço apical,

embora nenhuma diferença significativa foi observada nos terços coronal e médio. Sendo o grupo do Endovac foi mais eficiente no terço apical.

Uma análise do efeito do ultra-sôm com EDTA ou MTAD na camada de SL, detritos e pontos de erosão foi feita por Dadresanfar et al. em 2011. Após a amostra ter passado pelo MEV, os autores concluíram que não houve diferenças significativas na camada de SL ou remoção de detritos entre os grupos experimentais. Sendo que o EDTA causou erosão significativamente mais alta no terço médio que o MTAD. Além disso a ativação ultra-sônica de EDTA aumentou significativamente os seus efeitos erosivos nos terços médio e cervical. Com base nos resultados presentes, MTAD parece causar menos erosão, permitindo a remoção adequada de SL.

3. PROPOSIÇÃO

As soluções irrigadoras intracanais e sua seqüência de uso são fatores significativos que influenciam a limpeza. Sendo assim torna-se imprescindivel o estabelecimento de protocolos de irrigação que reduzam as possibilidades de formação de *smear layer* química e promovam uma efetiva remoção da *smear layer* formada durante o preparo químico-mecánico.

A formulação desta pesquisa *in vitro* envolveu procedimentos de PQM com limas rotatorias associadas à CHX gel 2%, com diferentes protocolos de irrigação (PIF) e ativação final (PAF) no intuito de remover a SL formada.

Objetivo geral

Avaliar a influência do protocolo de irrigação (PIF) e ativação final (PAF) utilizados durante o PQM na remoção da SL do SCR.

Objetivos específicos

1. Comparar a capacidade do EDTA 17% e do AC 10%, associado ou não à ativação dinâmica-manual ou sônica na remoção de SL.
2. Avaliar os diferentes PIF e PAF na remoção da SL em cada um dos terços apicais.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Local da Pesquisa.

Laboratório de Endodontia e Laboratório de Microscopía Electrónica de Varredura da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.

4.2. Fontes de Obtenção do Material de Pesquisa.

Todo o material permanente para o preparo das amostras encontrava-se no Laboratório de Endodontia da FOP-UNICAMP, e as amostras foram analizadas por MEV no Laboratorio de Microscopía Electrónica de Varredura desta faculdade, sendo o material de consumo obtido com verbas do pesquisador responsável.

Os dentes humanos utilizados nesta pesquisa, foram doados doados por cirurgões dentistas como registrado no termo de doação.

4.3. Seleção e padronização dos dentes.

Após a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (CEP/FOP-UNICAMP/Protocolo 149/2009/Anexo 1), foram utilizados 45 pré-molares humanos permanentes, uniradiculares, com canal reto e ápice formado, conferido radiográficamente (Fig. 1).

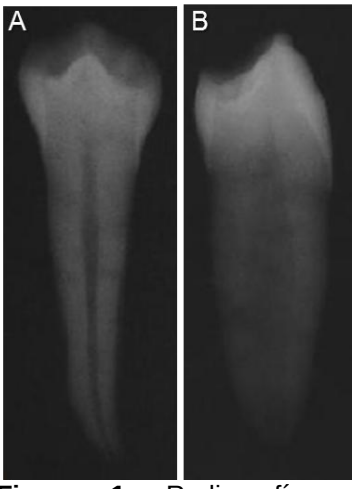

Figura 1. Radiografía em sentido vestíbulo-lingual (A) e mesio-distal (B) de pré-molar inferior, confirmando a presença de canal radicular único.

Os elementos dentários selecionados foram esterilizados seguindo o protocolo descrito por Gomes et al. 2009, e armazenados sob refrigeração em solução timol 0,2%, até a realização dos procedimentos laboratoriais.

Utilizando uma máquina de corte (Isomet 1000, Buehler, IL, EUA) e um disco de diamante (Diamond Wafering Blade, Series 15LC, Buehler, EUA) a 350 rpm sob irrigação aquosa constante, as coroas foram removidas e o comprimento das raízes padronizado em 15 mm (Fig. 2). Os canais radiculares e o forame apical foram alargados com a utilização de limas tipo K (Maillefer Instruments, Ballaigues, Suiça) até o n° 25 sob irrigação com água destilada. A fim de se evitar a desidratação, os dentes foram mantidos em gazes estéreis umedecidas durante toda a instrumentação (Fig. 3).

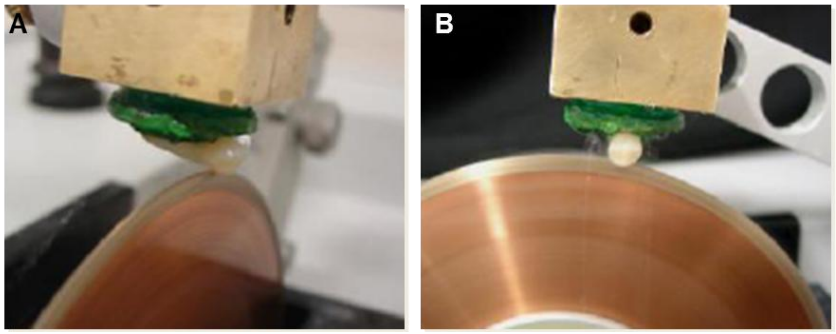

Figura 2. Máquina de corte calibrada a 350 rpm para o corte dos dentes padronizando o comprimento em 15 mm. Vista frontal (A) e lateral (B).

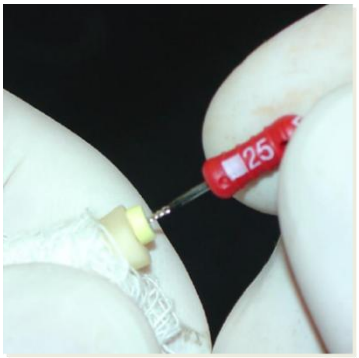

Figura 3. Padronização foraminal. Os canais radiculares e o forame apical foram alargados até a lima K n° 25. Os dentes foram mantidos em gazes umedecidas com água destilada a fim de se evitar a desidratação.

Para a remoção de SL formada pela instrumentação nas paredes do canal durante a padronização dos espécimes as raízes foram imersas em cuba ultra-sônica contendo EDTA a 17% por 10 min, seguido de NaOCl a 5,25% por 10 min e então receberam banho por mais 10 min com tiossulfato de sódio a 5%, e finalmente água destilada por 1 h, segundo descrito por Perez et al. 1993 e Ferraz et al. 2001.

4.4. Grupos experimentais.

Após padronização, os 45 espécimes foram divididos aleatoriamente em 3 grupos segundo a SQA utilizada na irrigação final: G1: água destilada (AD, contole); G2: ácido etilenodiamino-tetra-acético (EDTA) 17%; G3: ácido cítrico (AC) 10%. Sendo que cada grupo foi dividido em 3 subgrupos segundo o PAF utilizado: sem ativação (SA), com ativação dinâmica-manual (ADM) com cone de guta-percha ou com ativação sônica (AS), Tabela 1.

Tabela 1. Distribuição dos espécimes segundo o PIF e PAF utilizados.

	SA	ADM	AS
AD	5	5	5
EDTA	5	5	5
AC	5	5	5

PIF- Protocolo de irrigação final: AD- água destilada; EDTA- ácido etilendiamino-tetra-acético a 17%; AC- ácido cítrico a 10%. PAF- Protocolo de ativação final: SA- sem ativação; ADM- ativação dinâmica-manual; AS- ativação sônica.

4.5. Preparo Químico-Mecânico.

Os espécimes foram dispostos em uma plataforma de aço inoxidável (Procind mecânica e Instalações Industriais Ltda., Piracicaba, SP-Brasil) para a realização dos procedimentos do PQM seguindo a técnica da FOP-UNICAMP com utilização de limas rotatórias. Inicialmente foi feito um pré-alargamento dos terços cervicais e medio utilizando brocas Gates-Glidden na sequência 5, 4, 3 e 2 e em seguida os espécimes foram instrumentados até o comprimento de trabalho (15 mm) utilizando o sistema de limas rotatórias Mtwo (VDW, Munich, Alemanha) na sequência 10.04/15.05/20.06/25.06 (Fig. 4).

Figura 4. De esquerda à direita a sequência 10.04/15.05/20.06/25.06 das limas rotatórias do sistema Mtwo utilizadas durante o PQM.

4.6. Protocolos de Irrigação.

A cada troca de brocas ou limas os canais foram irrigados com 1,0ml de AD seguido de 0,5 ml de clorexidina gel 2% (CHX, Endogel, Essencial Pharma, Itapetininga, SP-Brasil). Após a última lima (25.06) todos os espécimes receberam irrigação com 5 mL de AD antes dos diferentes protocolos de irrigação e ativação final.

4.7. Protocolos de Irrigação e Ativação Final.

O PIF seguio de acordo com cada grupo experimental (Tabela 2). Após o PQM todos os espécimes receberam irrigação com 5 mL de AD. Após o PIF todos os espécimes receberam novamente irrigação com 5 mL de AD. Assim o volumen total de irrigação foi padronizado para todos os grupos em 13 mL. (5 mL AD + 3 mL da SQA quelante + 5 mL AD).

Tabela 2. Protocolo de irrigação final.

SQA	Irrigação	SQA Quelante	Irrigação final
CHX	AD	AD	AD
CHX	AD	EDTA 17%	AD
CHX	AD	AC 10%	AD

CHX- clorexidina gel 2%; AD- água destilada; EDTA- ácido etilendiamino-tetra-acético; AC- ácido cítrico.

4.7.1 PAF-Sem Ativação.

Após ser sugado o canal (agulha 27-gauge), o canal foi prenchido com 1 mL da SQA quelante (EDTA, AC ou AD), que permaneceu por 1 min, depois do qual foi sugada e renovada mais duas veces, totalizando 3 mL por 3 min, por fim todos os espécimes receberam irrigação com 5 mL de AD (Fig. 5).

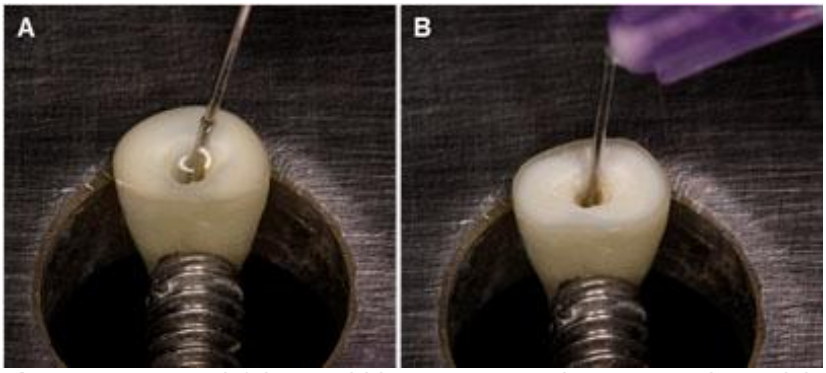

Figura 5. O canal foi prenchido com 1 mL da SQA quelante (A) permanecendo por 1 min, depois do qual foi sugada (B) e renovada mais duas veces, totalizando 3 mL por 3 min.

4.7.2 PAF-Ativação Manual-Dinâmica.

Após a irrigação com a SQA quelante específica de cada grupo, a mesma foi ativada dentro do canal radicular utilizando um cone de gutta-percha M calibrado no comprimento de trabalho. A ativação da SQA quelante foi realizada com movimentos repetidos de entrada e saída por 1 min, renovando-a a cada minuto, totalizando 3 min, como descrito anteriormente. Finalmente os espécimes receberam irrigação final com 5 mL de AD (Fig. 6).

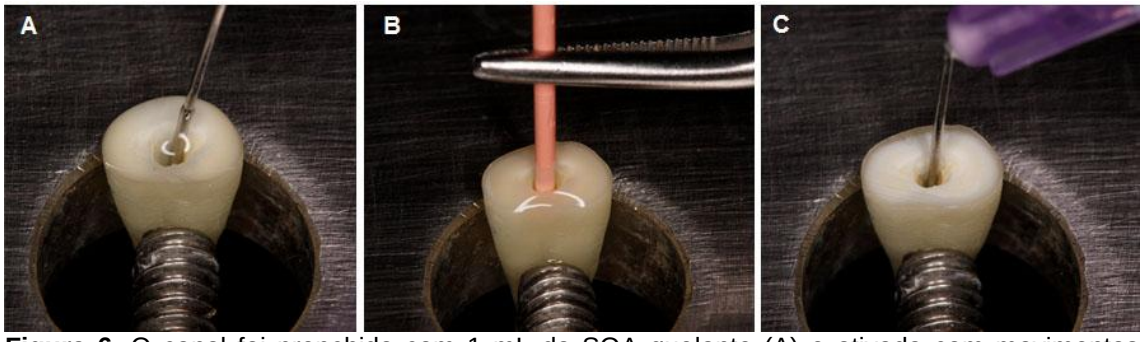

Figura 6. O canal foi prenchido com 1 mL da SQA quelante (A) e ativada com movimentos repetidos de entrada e saída por 1 min utilizando um cone de guta-percha calibrado no comprimento de trabalho (B). A cada minuto a SQA foi sugada (C) e renovada mais duas veces, totalizando 3 mL por 3 min.

4.7.3 PAF-Ativação Sônica.

Após a irrigação com a SQA quelante específica de cada grupo, a mesma foi ativada utilizando um condensador digital n° 20 acoplado em um aparelho sônico a 10 kHz de potência (Fig. 7). A ativação da SQA quelante foi realizada por 30 s, renovando-a a cada minuto, totalizando 3 min. Finalmente os espécimes receberam irrigação final com 5 mL de AD.

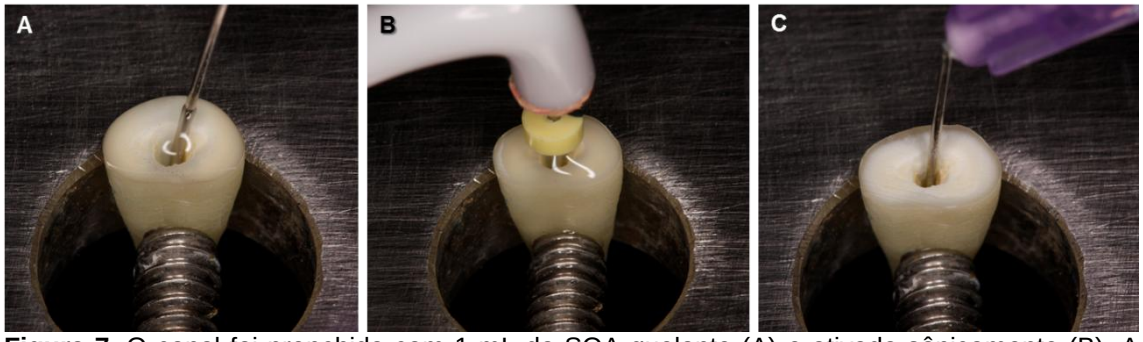

Figura 7. O canal foi prenchido com 1 mL da SQA quelante (A) e ativada sônicamente (B). A ativação por 30 s. Ao minuto a SQA foi sugada (C) e renovada mais duas veces, totalizando 3 mL por 3 min.

Após todos os procedimentos do PQM os espécimes foram reservados sob refrigeração em água destilada até serem preparados para análise por MEV.

4.8 Preparo dos Espécimes para Análise por MEV.

Para análises no MEV os dentes foram desidratados seguindo uma bateria de alcoól: 10 min imersos em alcoól 50, 10 min em alcoól 70, 10 min em alcoól 90 e finalmente 1 h em alcoól absoluto. Seguidamente os mesmos foram

clivados em sentido longitudinal e reservados em estufa a 37°C por 24 h, após o qual foram colados sobre *stubs* para serem metalizados (Fig. 8) para análise por MEV (Jeol, JSM 5600 LV, Noran Instruments, EUA) a 15 kV. Durante a análise por MEV foram realizadas 4 imagens (1000x) de cada terço/metade/espécimen, como se ilustra na Fig. 9.

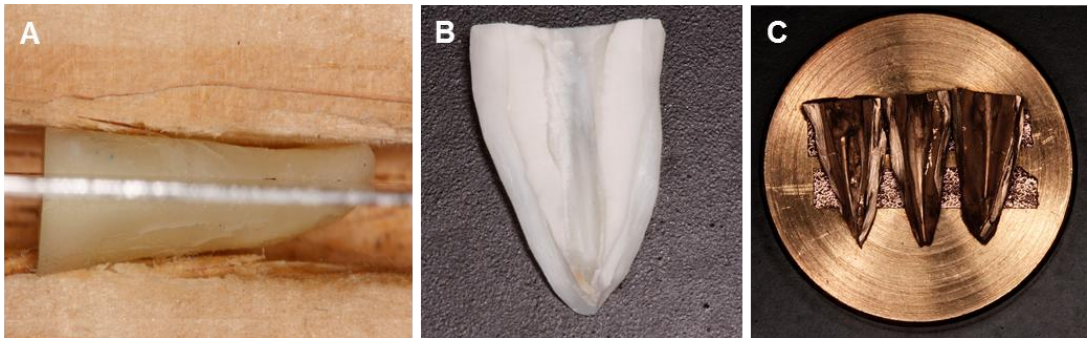

Figura 8. Os espécimes foram clivados em sentido longitudinal (A, B) e reservados em estufa a 37°C/ 24 h, após o qual foram colados sobre stubs e metalizados (C) para análise por MEV.

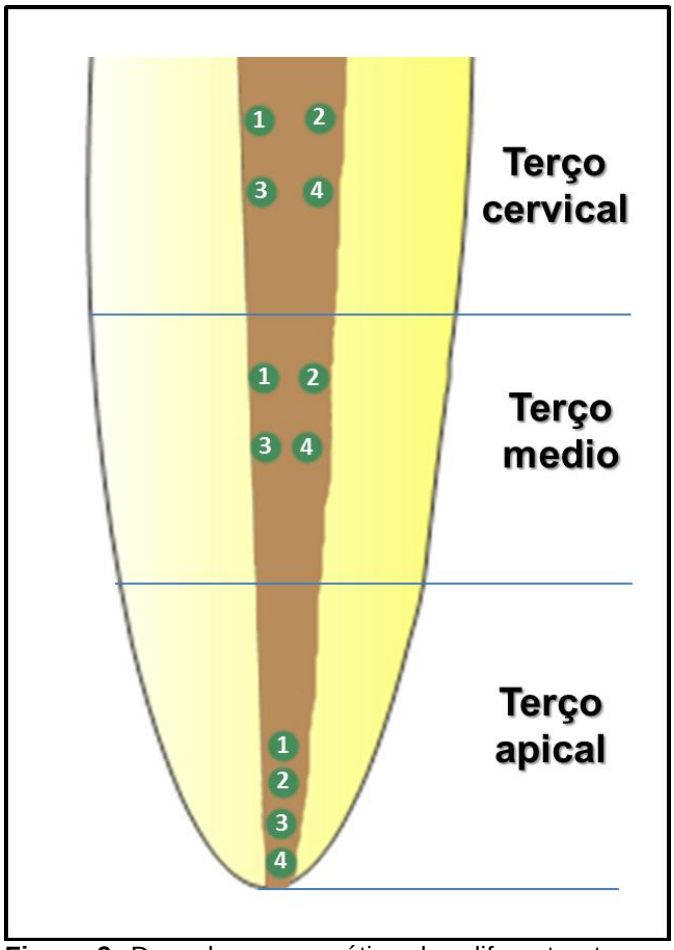

Figura 9. Desenho esquemático dos diferentes terços apicais e as 4 áreas analizadas por MEV em cada um deles.

4.9 Análise estatística.

Dois examinadores foram calibrados utilizando o coeficiente de ponderação Kappa (K_w), e sem conhecerem o protocolo utilizado em cada uma das imagens analisaram as mesmas atribuindo escores. Estes baseados na escala descrita por Hulsmann et al. 1997, adaptada por Caron et al. em 2010 (Quadro 1).

Quadro 1. Escores a serem utilizados na avaliação qualitativa das fotomicrografías nos diferentes terços apicais*.

Escore	Descrição
1	Ausência de SL e túbulos dentinários abertos.
2	Pequena quantidade de SL e túbulos dentinários abertos.
3	Fina camada de SL e túbulos parcialmente abertos.
4	Espessa camada de SL cobrindo parcialmente a superfície.
5	Espessa camada de SL cobrindo toda a superfície.

*****Hulsmann et al. 1997; adaptado por Caron et al. 2010.

As Fig. 10A-10E representam as fotomicrografias dos escores utilizados para avaliar as imagens obtidas neste estudo.

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente pelos testes Kruskal Wallis e Mann-Whitney (α=0.05). Toda analise estatística foi realizada no SPSS 12.0 para Windows (SPSS Inc, Chicago, IL).

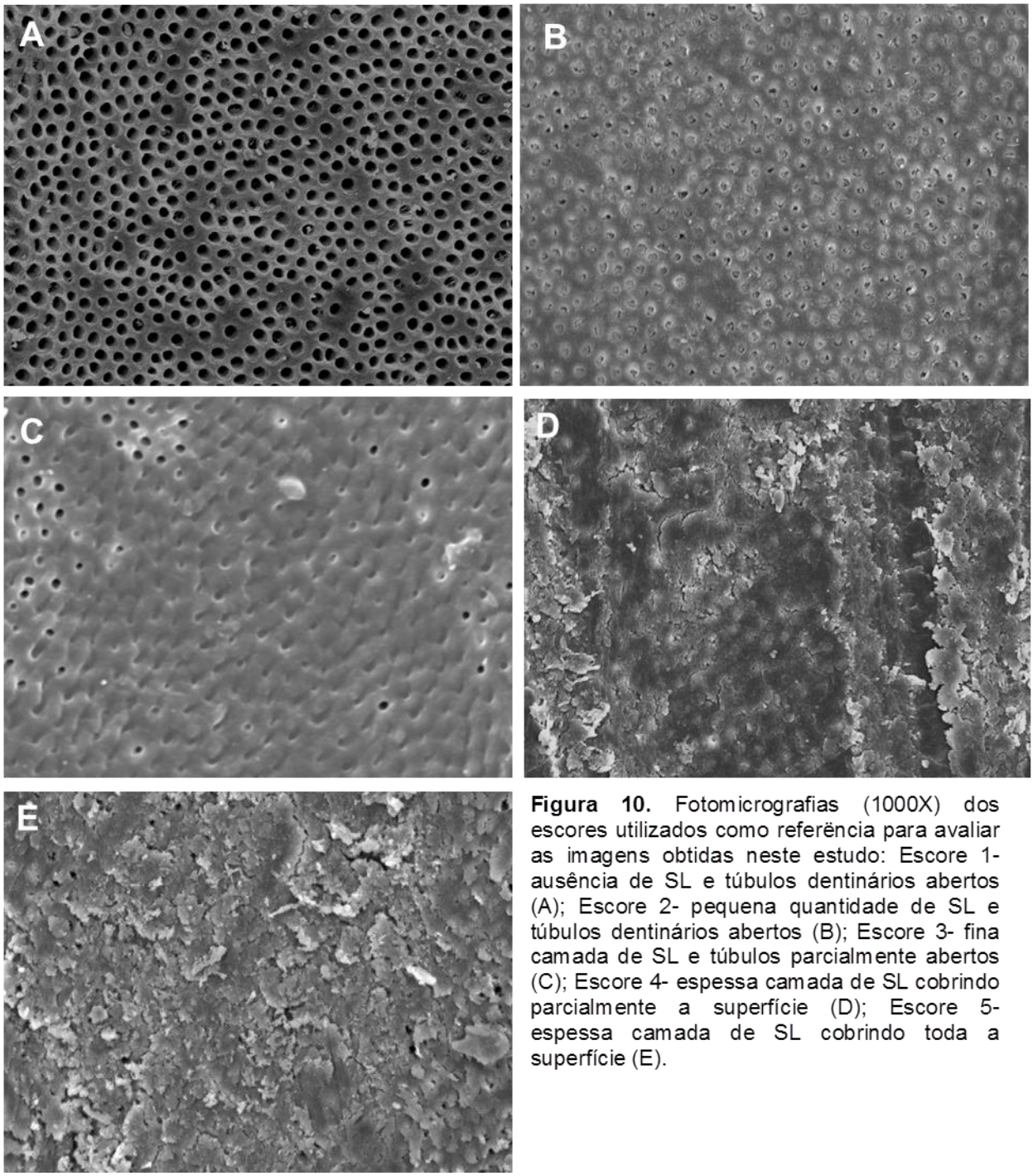

Figura 10. Fotomicrografias (1000X) dos escores utilizados como referëncia para avaliar as imagens obtidas neste estudo: Escore 1- ausência de SL e túbulos dentinários abertos (A); Escore 2- pequena quantidade de SL e túbulos dentinários abertos (B); Escore 3- fina camada de SL e túbulos parcialmente abertos (C); Escore 4- espessa camada de SL cobrindo parcialmente a superfície (D); Escore 5- espessa camada de SL cobrindo toda a superfície (E).

5. RESULTADOS

O coeficiente de ponderação K_w para os avaliadores foi de 0,86, sendo considerado como um valor muito bom para concordância interavaliadores (Altman, 1999).

Com exceção dos subgrupos sem ativação, quando o EDTA e o AC foram ativados, seja por ADM ou por AS, obteve-se os melhores resultados de limpeza, sem diferença significativa entre as SQA quelantes ($p>0,05$).

Na avaliação por terços, todos os grupos mostraram os melhores valores de limpeza para o terço cervical, seguido do terço medio e por ultimo o terço apical ($p<0,05$). A remoção de SL do terço apical foi estatísticamente inferior para todos os grupos, porém quando utilizada a AS foram obtidos os melhores resultados. A ativação sônica mostrou os melhores resultados em todos os terços, comparado à ADM e ao grupo que não recebeu ativação ($p<0,05$). O grupo que recebeu ADM mostrou melhores resultados comparado ao grupo SA ($p<0,05$).

As médias e desvio padrão obtidos em cada grupo e subgrupo são apresentados na Tabela 3. Nas Fig. 11-19 são apresentadas fotomicrografías representativas de cada grupo e subgrupo avalido.

Tabela 3. Média ± desvio padrão comparando a smear layer nos diferentes PIF e PAF

		Terço Apical	
Grupo + Subgrupo	cervical	medio	apical
AD + S	2,95 ± 0,36	3,45 ± 0,43	4,28 ± 0,57
EDTA + S	1,28 ± 0,41	2,35 ± 0,52	3,00 ± 0,73
AC + S	1,65 ± 0,40	2,60 ± 0,70	3,43 ± 0,57
AD + ADM	2,50 ± 0,49	3,40 ± 0,68	4,10 ± 0,68
EDTA + ADM	1,23 ± 0,38	1,75 ± 0,41	2,70 ± 0,52
AC + ADM	1,20 ± 0,38	1,95 ± 0,60	2,98 ± 0,44
AD + AS	2,38 ± 0,46	2,68 ± 0,44	3,18 ± 0,29
EDTA + AS	1,13 ± 0,28	1,35 ± 0,46	2,33 ± 0,54
AC + AS	1,08 ± 0,18	1,38 ± 0,51	2,78 ± 0,57

PIF- Protocolo de irrigação final: AD- água destilada; EDTA- ácido etilendiamino-tetra-acético a 17%; AC- ácido cítrico a 10%.
PAF- Protocolo de ativação final: SA- sem ativação; ADM- ativação dinâmica-manual e AS- ativação sônica.

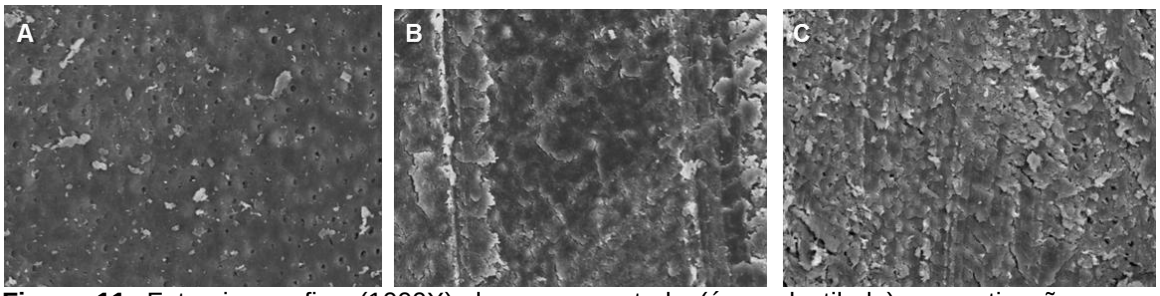

Figura 11. Fotomicrografias (1000X) do grupo controle (água destilada) sem ativação, nos diferentes terços: cervical (A), medio (B) e apical (C).

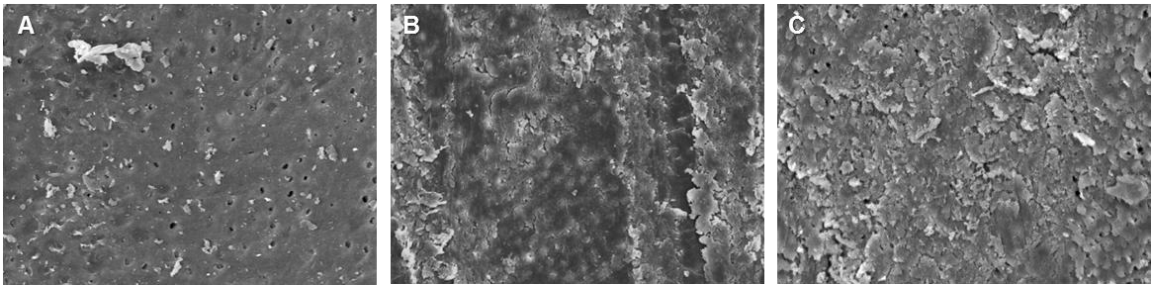

Figura 12. Fotomicrografias (1000X) do grupo controle (água destilada) com ativação manual-dinâmica, nos diferentes terços: cervical (A), medio (B) e apical (C).

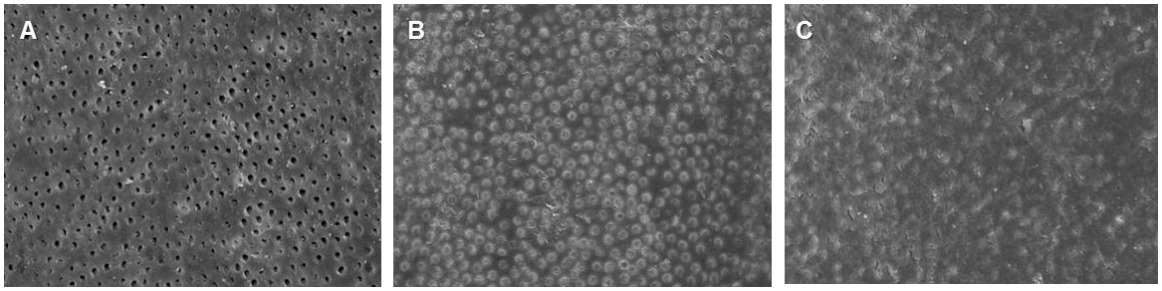

Figura 13. Fotomicrografias (1000X) do grupo controle (água destilada) com ativação sônica, nos diferentes terços: cervical (A), medio (B) e apical (C).

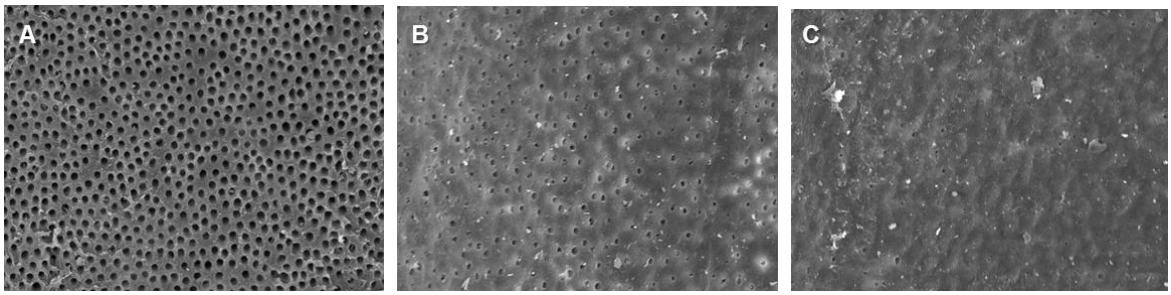

Figura 14. Fotomicrografias (1000X) do grupo EDTA, sem ativação, nos diferentes terços: cervical (A), medio (B) e apical (C).

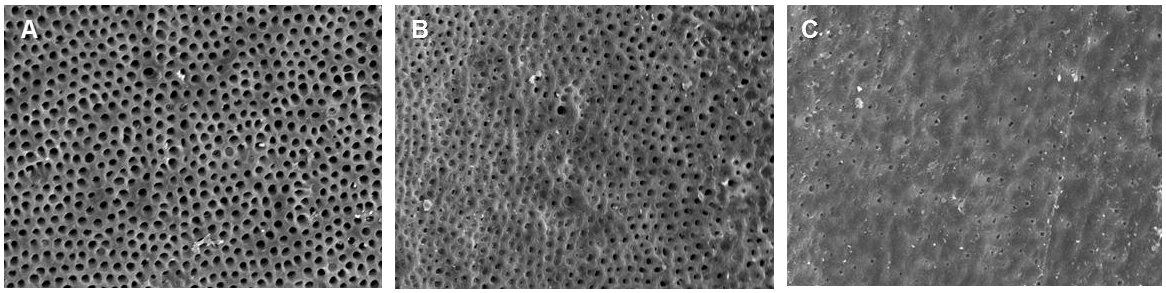

Figura 15. Fotomicrografias (1000X) do grupo EDTA com ativação manual-dinâmica, nos diferentes terços: cervical (A), medio (B) e apical (C).

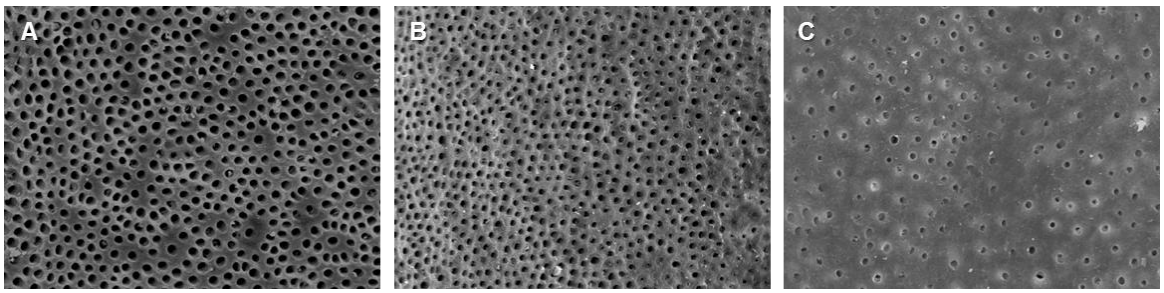

Figura 16. Fotomicrografias (1000X) do grupo EDTA com ativação sônica, nos diferentes terços: cervical (A), medio (B) e apical (C).

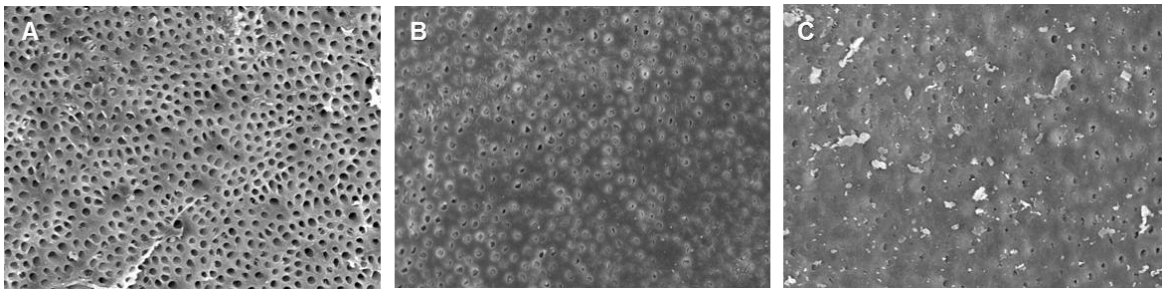

Figura 17. Fotomicrografias (1000X) do grupo AC, sem ativação, nos diferentes terços: cervical (A), medio (B) e apical (C).

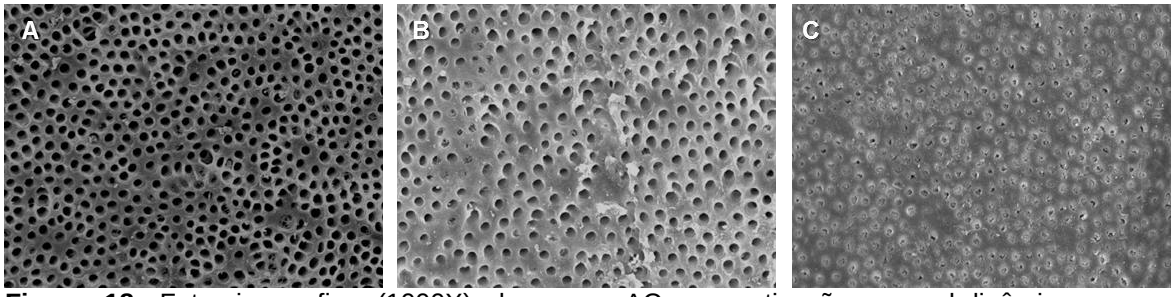

Figura 18. Fotomicrografias (1000X) do grupo AC com ativação manual-dinâmica, nos diferentes terços: cervical (A), medio (B) e apical (C).

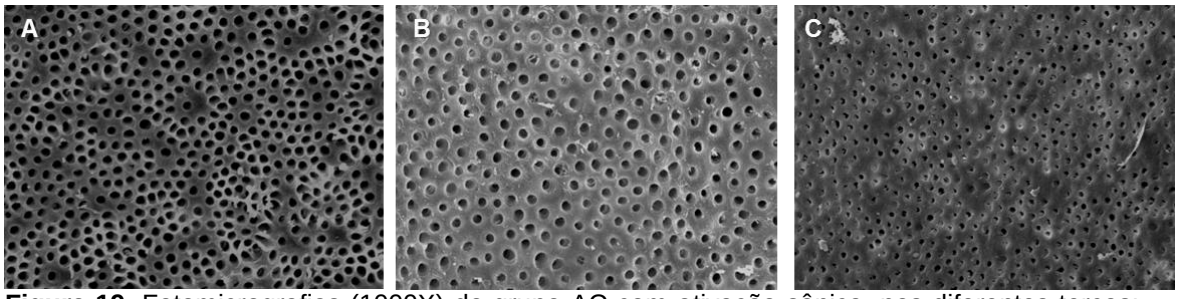

Figura 19. Fotomicrografias (1000X) do grupo AC com ativação sônica, nos diferentes terços: cervical (A), medio (B) e apical (C).

6. DISCUSSÃO

Embora tenha sido controversa a literatura quanto à remoção de SL, atualmente o consenso é unanime quanto a importância da sua remoção. A literatura tem caracterizado a SL como um cocktail patogénico que além de abrigar remanescentes dos tecidos pulpares, microrganismos e irritantes que comprometem o sucesso da terapia endodôntica, altera também a efetividade de medicamentos intracanal, a penetração dos cimentos endodônticos nos túbulos dentinários e a adaptação e capacidade de selamento dos materiais de preenchimento (Economides, 1999; Ruddle, 2007; Lee et al. 2004; Kokkas et al. 2004).

Muitas são as SQA testadas para tal fim, mas produtos a base de EDTA e AC vêm demostrando melhor aplicação para o aumento da permeabilidade dentinária atravez da remoção de SL e biocompatibilidade frente aos tecidos periapicais (Torneck, 1961; Scelza et al. 2001). Neste estudo foi comparada a efetividade destas duas SQA quelantes para remover SL formada durante o PQM.

O EDTA é um agente quelante, e sendo a dentina um complexo molecular composto, basicamente, por hidroxiapatita, o mecanismo de ação do EDTA basea-se em sequestrar os íons cálcio bivalentes presentes nos cristais de hidroxiapatita, formando associações estáveis até a completa saturação da ação quelante, o que confere à solução sua característica auto-limitante (Leonardo, 1998). E o ácido cítrico é um ácido orgânico fraco, de ação desmineralizante sobre a SL e que também possui atividade bacteriostática frente aos anaeróbios, bem como a capacidade de remover toxinas bacterianas das paredes do canal (Georgopolou et al. 1994; Yamaguchi et al. 1996).

Quanto ao tempo de utilização destas substâncias no interior do canal, até hoje não existe um consenso do que seria o ideal. McComb e Smith em 1975, afirmaram que o EDTA deveria ser deixado no canal por 14 horas. Por outro lado, um estudo realizado por Machado et. al. em 2004, mostrou que o AC começa seu efeito aos 5 segundos e alcança total desobstrução do túbulo dentinário aos 30 segundos, enquanto que para López et al. 2006, só com 3 min o AC alcança a desmineralização ideal. Zehnder (2006), em uma extensa revisão de literatura sobre as substâncias irrigantes do canal radicular, sugere

um protocolo de irrigação, porém não indica o tempo que as substâncias quelantes devem permanecer no canal. Assim, atualmente, não existe um consenso sobre os efeitos de cada substância, seus respectivos tempos de aplicação e a forma de interrupção do ataque ácido da dentina com o objetivo de remover a SL.

Neste estudo ambas as substâncias foram colocadas por 3min no SCR, com troca de 1 em 1 min, considerando a característica auto-limitante do EDTA.

Os resultados apresentados mostraram que ambas as susbtâncias, EDTA 17% e AC 10%, demonstraram capacidade de remover SL e consequentemente aumentar a permeabilidade dos tubulos dentinários, sem diferença estatística entre elas. A esse respeito, e com achados concordantes com nossa pesquisa, auferiram outros autores (Yamaguchi et al. 1996; Di Lenarda et al. 2000; Scelza et al. 2000; Scelza et al. 2003).

Porém ao serem analisadas as imagens obtidas pelo MEV constatou-se que varias das amostras do terço cervical onde o AC 10% foi utilizado com ativação, apresentaram zonas com erosão dentinária (Fig. 20). Este fenómeno pode ser justificado, pelo facto de alguns estudos apontarem que o AC 10% tem maior capacidade para diminuir a microdureza da dentina em relação ao EDTA 17% (Pashley et al. 1981; Eldeniz et al. 2005). Além do estudo de Machado-Silveiro et. al. 2004, onde demostraram que o AC além de 30 segundos provoca um efeito indesejado, destruindo excessivamente o espaço intertubular e promovendo formação de crateras na dentina, vistas pelo MEV.

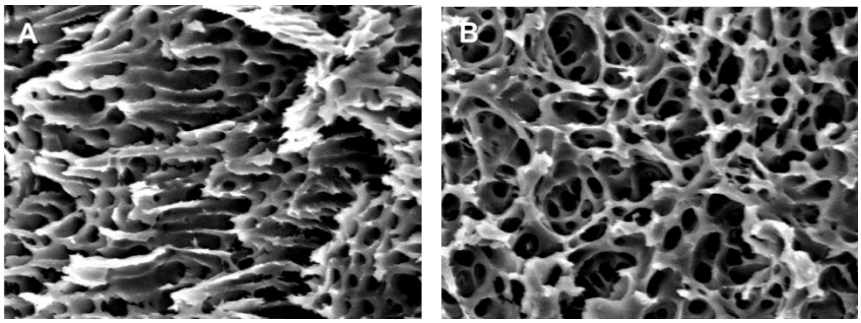

Figura 19. Fotomicrografias (1000X) do grupo AC com ADM (A) e AS (B) no terço cervical.

Para Wu et al. 1995, os tradicionais meios de irrigação promovem uma boa limpeza dos terços cervical e médio, porém não são tão efetivos no

terço apical. Pois para serem efetivas as SQA devem chegar o máximo possível do comprimento de trabalho. Segundo Jadaa et al. 2009, quando um instrumento é ativado no interior do canal, ocorre a produção de um fenômeno denominado corrente hidrodinâmica. Esta corrente é um dos mecanismos que fornecem um desbridamento superior produzindo forças de cisalhamento capazes de romper biofilmes e remover debris.

Hoje em dia a preocupação é de como como ativar uma determinada solução para maximizar este fenômeno hidrodinâmico, seja pelo aquecimento de reagentes utilizando dispositivos de transferência de calor, vibração ativa e instrumentos metálicos não ativos com energia ultra-sônica, utilização de soluções eletroquimicamente ativadas ou o suave bombeamento com cones de gutta-percha (Ruddle, 2007; Caron et al. 2010).

Neste estudo os resultados mostraram que com exceção dos subgrupos sem ativação, quando o EDTA e o AC foram ativados, seja por ADM ou por AS, obteve-se os melhores resultados de limpeza, sem diferença entre as SQA quelantes, indo de encontro com os estudos existentes na literatura (Kuah et al. 2009; Caron et al. 2010; Jiang LM et al. 2010; Paragliola et al. 2010). Embora entre à ADM e AS, durante a avaliação por terços, a AS mostrou os melhores resultados, tornando-a num coadjuvante ao PQM.

7. CONCLUSÃO

Dentro das limitações da metodologia empregada e a partir dos resultados obtidos podemos concluir que:

- A ativação das SQA quelantes dentro do canal radicular favorece a remoção de SL formado durante o PQM.
- A AS promove uma melhor limpeza do SCR quando comparada à ADM.
- O terço apical apresenta-se como a área mais complexa para atingir a remoção de SL.

REFERÊNCIAS

1. Abarajithan M, Dham S, Velmurugan N, Valerian-Albuquerque D, Ballal S, Senthilkumar H. Comparison of Endovac irrigation system with conventional irrigation for removal of intracanal smear layer: an in vitro study. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2011; 112: 407-11.
2. Abou-Rass M, Piccinino MV. The effectiveness of four clinical irrigation methods on the removal of root canal debris. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1982; 54: 323-8.
3. Ahmet S, Özbek M, Çalt S. Accidental sodium hypochlorite-induced skin injury during endodontic treatment. J Endod 2004; 30: 180-1.
4. Akisue E, Tomita VS, Gavini G, Poli de Figueiredo JA. Effect of the combination of sodium hypochlorite and chlorhexidine on dentinal permeability and scanning electron microscopy precipitate observation. J Endod 2010; 36: 847-50.
5. Akpata ES, Blechman H. Bacterial invasion of pulpal dentin wall in vitro. J Dent Res 1982; 61: 435-8.
6. Altman DG. Practical statistics for medical research. Londres, Chapman and Hall, 1991.
7. Baker NA, Eleazer PD, Averbach, Re, Seltzer S. Scanning electron microscopic study of the efficacy of various irrigating solutions. J Endod 1975; 1: 127-35.
8. Beeson TJ, Hartwell GR, Thornton JD, Gunsolley JC. Comparison of debris extruded apically in straight canals: conventional filling versus Profile .04 taper series 29. J. Endod 1998; 24: 18-22.
9. Blank-Gonçalves LM, Nabeshima CK, Martins GH, Machado ME. Qualitative Analysis of the Removal of the Smear Layer in the Apical Third of Curved Roots: Conventional Irrigation versus Activation Systems. J Endod 2011; 37: 1268-71.
10. Bonesvoll P, Lökken P, Rölla G. Influence of concentration, time, temperature and pH on the retention of chlorhexidine in the human oral cavity after mouth rinses. Arch Oral Biol 1974; 19: 1025-9

11. Boutsioukis C, Lambrianidis T, Kastrinakis E. Irrigant flow within a prepared root canal using various flow rates: a Computational Fluid Dynamics study. Int Endod J 2009; 42: 144-55.
12. Boyde A, Stewart AD. Scanning electron microscopy of the surface of developing mammalian dental enamel. Nature 1963; 198: 1102-3.
13. Brown DC, Keith Morre B, Brown JR CE, Newton CW. An in vitro study of apical extrusion of sodium hypochlorite during endodontic canal preparation. J. Endod 1995; 21: 587-91.
14. Bui TB, Baumgartner JC, Mitchell JC. Evaluation of the interaction between sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate and its effect on root dentin. J Endod 2008; 34: 181-5.
15. Burleson A, Nusstein J, Al Reader, Beck M. The in vivo evaluation of hand/rotary/ultrasound instrumentation in necrotic, human mandibular molars. J. Endod 2007; 33: 782-7.
16. Çalt S, Serper A. Time-dependent eff ects of EDTA on dentin structures. J Endod 2002; 28: 17-9.
17. Cameron JA. The use of ultrasonics in the removal of smear layer: a scanning electron microscope study. J. Endod 1983; 9: 289-92.
18. Caron G, Nham K, Bronnec F, Machtou P. Effectiveness of different final irrigant activation protocols on smear layer removal in curved canals. J Endod 2010; 36: 1361-6.
19. Chow TW. Mechanical effectiveness of root canal irrigation. J Endod 1983; 9: 475-9.
20. Clarkson RM, Moule AJ. Sodium hypochlorite and its use as an endodontic irrigant. Aust Dent J 1998; 43: 250-6.
21. Cruz-Filho AM, Sousa-Neto MD, Saquy PC, Pécora JD. Evaluation of the effect of EDTAC, CDTA, and EGTA on radicular dentin microhardness. J Endod 2001; 27: 183-4.
22. Dadresanfar B, Khalilak Z, Delvarani A, Mehrvarzfar P, Vatanpour M, Pourassadollah M. Effect of ultrasonication with EDTA or MTAD on smear layer, debris and erosion scores. J Oral Sci 2011; 53: 31-6.
23. Dakin HD. On the use of certain antiseptic substances in the treatment of infected wounds. Br Med J 1915; 2: 318-20.

24. Dametto FR, Ferraz CC, de Almeida Gomes BP, Zaia AA, Teixeira FB, de Souza-Filho FJ. In vitro assessment of the immediate and prolonged antimicrobial action of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant against Enterococcus faecalis. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2005; 99: 768-72.

25. Denaly GM, Patterson SS, Miller CH, Newton CW. The effect of chlorexidine gluconate irrigation on the root canal flora of freshly extracted necrotic teeth. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1982; 53: 518-522.

26. Di Lenarda R, Cadenaro M, Sbaizero O. Effectiveness of 1 mol L-1 citric acid and 15% EDTA irrigation on smear layer removal. Int Endod J 2000; 33: 46-52.

27. Drake DR, Wiemann AH, Rivera EM, Walton RE. Bacterial retention in canal walls in vitro: effect of smear layer. J Endod 1994; 20: 78-82.

28. Druttman ACS, Stock CRJ. An in vitro comparison of ultrasonic and convencional methods of irrigant replacement. Int Endod J 1989; 22: 174-8.

29. Economides N, Liolios E, Kolokuris I, Beltes P. Long-term evaluation of the influence of smear layer removal on the sealing ability of different sealers. J Endod 1999; 25: 123-5.

30. Eldeniz AU, Erdemir A, Bellis S. Effect of EDTA and citric acid solutions on the microhardeness and the roughness of human Root Canal dentin. J Endod 2005; 31:107-10.

31. Estrela C, Estrela CR, Barbin EL, Spanó JC, Marchesan MA, Pécora JD. Mechanism of action of sodium hypochlorite. Braz Dent J 2002; 13: 113-7.

32. Evans JT, Simon JH. Evaluation of the apical seal produced by injected thermoplasticized Gutta-percha in the absence of smear layer and root canal sealer. J Endod 1986; 12:100-7.

33. Ferraz CCR. et al. In vitro assesment of the antimicrobial action and the mechanical ability of chlorexidine gel as an endodontic irrigant. J Endod 2001; 27:452-5.

34. Ferraz CC, Gomes BP, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Comparative study of the antimicrobial efficacy of chlorhexidine gel, chlorhexidine solution and sodium hypochlorite as endodontic irrigants. Braz Dent J 2007; 18: 294-8.

35. Fróes JA, Horta HG, da Silveira AB. Smear layer influence on the apical seal of four different obturation techniques. J Endod 2000; 26: 351-4.

36. Fukumoto Y, Kikuchi I., Yoshioka C., Kobayashi C, Suda H. An ex vivo evaluation of a new root canal irrigation technique with intracanal aspiration. Inte Endodo J 2006; 39: 93-99.

37. Georgopolou M, Kontakiotis E, Nakou M. Evaluation of the antimicrobial effetiveness ofcitric acid and sodium hypoclorite on the anaerobic flora of the infected root canal. Int Endod J. 1994; 27:139-43.

38. Gernhardt CR, Eppendorf K, Kozlowski A, Brandt M. Toxicity concentrated sodium hypochlorite used as endodontic irrigant. Int Endod J 2004; 37:272-80.

39. Goldman LB, Goldman M, Kronman JH, Lin PS. The efficacy of several irrigating solutions for endodontics: a scanning electron microscopic study. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1981; 52: 197-204.

40. Gomes BP, Montagner F, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, de Almeida JF, Souza-Filho FJ. Antimicrobial action of intracanal medicaments on the external root surface. J Dent. 2009; 37:76-81.

41. Gu LS, Kim JR, Ling J, Choi KK, Pashley DH, Tay FR. Review of contemporary irrigant agitation techniques and devices. J Endod 2009; 35: 791-804.

42. Hockett JL, Dommisch JK, Johnson JD, Cohenca N. Antimicrobial efficacy of two irrigation techniques in tapered and nontapered canal preparations: an in vitro study. J Endod 2008; 34: 1374-7.

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

44. Hulsmann M, Rummelin C, Schafers F. Root canal cleanliness after preparation with different endodontic handpieces and hand instruments: a comparative SEM. J Endod 1997; 23: 301–6.

45. Jadaa AA, Paqué F, Attin T, Zehnder M. Necrotic pulp tissue dissolution by passive ultrasonic irrigation in simulated accessory canals: impact of canal location and angulation. Int Endod J 2009; 42:59-65.

46. Jeansonne MJ, White RR. A comparison of 2.0% chlorexidine gluconate and 5.25% sodium hypoclorite as antimicrobial endodontics irrigants. J Endod 1994; 20: 276-8.

47. Jensen SA, Walker TL, Hutter JW, Nicoll BK. Comparison of the cleaning efficacy of passive sonic activation and passive ultrasonic activation after hand instrumentation in molar root canals. J Endod 1999; 25: 735-8.

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

49. Kokkas AB, Boutsioukis ACh, Vassiliadis LP, Stavrianos CK. The influence of the smear layer on dentinal tubule penetration depth by three different root canal sealers: an in vitro study. J Endod 2004; 30:100-2.

50. Krishnamurthy S, Sudhakaran S. Evaluation and prevention of the precipitate formed on interaction between sodium hypochlorite and chlorhexidine. J Endod 2010; 36: 1154-7.

51. Kuah HG, Lui JN, Tseng PS, Chen NN. The effect of EDTA with and without ultrasonics on removal of the smear layer. J Endod 2009; 35: 393-6.

52. Kuruvilla JR, Kamath MP. Antimicrobial activity of 2.5% sodium hypoclorite and 0.2% chlorexidine gluconate separately and combined, as endodontic irrigant. J Endod 1998; 24: 472-5.

53. Lee SJ, Wu MK, Wesselink PR. The effectiveness of syringe irrigation and ultrasonics to remove debris from simulated irregularities within prepared root canal walls. J Endod 2004; 37:672-8.

54. Leonardo MR, Tanomaru Filho M, Silva LA, Nelson Filho P, Bonifácio KC, Ito IY. In vivo antimicrobial activity of 2.0% chlorexidine used as a root canal irriganting solution. J. Endod 1999; 25: 167-71.

55. Leonardo MR. Preparo biomecânico dos canais radiculares. In: Leonardo MR, Leal JM. Endodontia – Tratamento de canais radiculares. 3.ed. São Paulo: Panamericana, 1998;15: 333-358.

56. Loel DA. Use of acid cleanser in endodontic therapy. J Am Dent Assoc 1975; 90: 148-51.

57. Lopes HP, Siqueira JF Jr, Elias CN. Substâncias químicas empregadas no preparo dos canais radiculares. In: Lopes HP, Siqueira JF Jr Endodontia:

biologia e técnica. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan/Medsi; 2004: 535-579.

58. McComb D, Smith DC. A preliminary scanning electron microscopic study of root canals after endodontic procedures. J endod 1975; 1: 238-42.

59. Machado-Silveiro LF, Gonzalez-Lopez S, Gonzalez-Rodrigues MP. Descalcification of root canal dentine by citric acid, EDTA and sodium citrate. Inter Endod J 2004; 37: 365-9.

60. Mader CL, Baumgartner JC, Peters DD. Scanning electron microscopic investigation of the smeared layer on root canal walls. J Endod 1984; 10: 477-83.

61. Madison S, Krell KV. Comparison of ethylenediamine tetraacetic acid and sodium hypochlorite on the apical seal of endodontically treated teeth. J Endod 1984; 10: 499-503.

62. Maillard JY, Hann AC, Baubet V, Perrin R. Efficacy and mechanisms of action of sodium hypochlorite on pseudomonas aeruginosa. J Appl Microbiol 1998; 85: 319-22.

63. Malvar G, Albergaria SJ; Lenzi HP; Pires SO; Correia A. Estudo da Ação do Edta Sobre a Camada Residual no Tempo de 1 e 3 Minutos. Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada 2009; 9: 367-372.

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

65. Michelich VJ, Schuster GS, Pashley DH. Bacterial penetration of human dentin in vitro. J Dent Res 1980; 59: 1398-403.

66. Moser JB, Heuer MA. Forces and efficacy in endodontic irrigation systems. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1982; 53: 425-8.

67. Ohara PK, Torabinejad M, Kettering J. D. Antibacterial effects of various endodontic irrigants on selected anaerobic bacteria. Endod Dent Traumatol 1993; 9: 95-100.

68. Paragliola R, Franco V, Fabiani C, Mazzoni A, Nato F, Tay FR, Breschi L, Grandini S. Final rinse optimization: influence of different agitation protocols. J Endod 2010; 36: 282-5.

69. Pashley DH, Kehl T, Pashley E, Palmer, P. Comparation of in vitro and in vivo dog dentin permeability. J Dent Res 1981; 60: 763-8.

70.

71. Perez F, Rochd T, Lodter JP, Calas P, Michel G. In vitro study of the penetration of three bacterial strains into root dentine. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1993; 76: 97-103.

72. Pérez-Heredia M, Ferrer-Luque CM, González-Rodríguez MP, Martín-Peinado FJ, González-Lopez S. Decalcifying effect of 15% EDTA, 15% citric acid, 5% phosphoric acid and 2.5% sodium hypochlorite on root canal dentine. Int Endod J 2008; 41: 418-23.

73. Prado M, Gusman H, Gomes BP, Simão RA. Scanning electron microscopic investigation of the effectiveness of phosphoric acid in smear layer removal when compared with EDTA and citric acid. J Endod 2011; 37: 255-8.

74. Ringel AM et al. In vivo evalution of chlorexidine gluconate solution and sodium hypoclorite solution as root canal irrigants. J. Endod 1982; 8: 200-4.

75. Rölla G, Melsen B. On the mechanism of the plaque inhibition by chlorhexidine. J Dent Res 1975; 54: 57-62.

76. Ruddle CJ. Access preparation endodontic: an opening for success. Dent Today 2007; 26:114-9.

77. Ruddle CJ. Hydrodynamic disinfection: tsunami endodontics. Dent Today 2007; 26:110-7.

78. Sabet NE, Lutfy RA. Ultrastructural morphologic evaluation of root canal walls prepared by two rotary nickel-titanium systems: a comparative study. Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology & Endodontics 2008; 106: 59-66.

79. Savioli RN, Costa WF, Saquy PC, Antoniazzi JH, Pecora JD. Estudo comparativo entre o hipoclorito de sódio e o ácido cítrico na capacidade de limpeza do canal radicular. Rev Odontol Univ São Paulo. 1993; 7: 273-7.

80. Scelza MFZ, Antoniazzi JH, Scelza P. Efficacy of final irrigation-a scanning electron microscopic evaluation. J Endod 2000; 26: 355-8.

81. Scelza MF, Daniel RL, Santos EM, Jaeger MM. Cytotoxic effects of 10% citric acid and EDTA-T used as root canal irrigants: an in vitro analysis. J Endod 2001; 27: 741-3.

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

83. Sedgley CM, Nagel AC, Hall D, Applegate B. Influence of irrigant needle depth in removing bioluminescent bacteria inoculated into instrumented root canals using real time imaging in vitro. Int Endod J 2005; 38: 97-104.

84. Segura JJ, Calvo JR, Guerrero JM, Sampedro C, Jimenez Planas A, Llmas R. The disodium salt of EDTA inhibits of the binding of vasoactive intestinal peptide of macrophage membranes: endodontic implications. J Endod 1996; 22: 337-40.

85. Sen BH, Safavi KE, Spangberg LSW. Antifungal effects of sodium hypoclorite and chlorexidine in root canals. J Endod 1999; 25: 235-8.

86. Sen BH, Wesselink PR, Türkün M. The smear layer: a phenomenon in root canal therapy. J Endod 1995; 28:141-8.

87. Serper A, Calt S. The demineralizing effects of EDTA at different concentrations and pH. J Endod 2002; 28: 501-2.

88. Schilder H. Cleaning and shaping the root canal. Dent Clin North Am 1974; 18: 269-296.

89. Siqueira Junior JF et al. Antibacterial effects of endodontic irrigants on black-pigmented gram-negative anaerobes and facultative bacteria. J Endod 1998; 24:414-6.

90. Smith JJ, Wayman BE. An evaluation of the antimicrobial effectiveness of citric acid as a root canal irrigant. J Endod 1986; 12: 54-8.

91. Tanomaru Filho M, Leonardo MR, Silva LA, Aníbal FF, Faccioli LH. Inflammatory response to different endodontic irrigating solutions. Int Endod J 2002; 35: 735-9.

92. Taşman F, Cehreli ZC, Oğan C, Etikan I. Surface tension of root canal irrigants. J Endod 2000; 26: 586-7.

93. Torabinejad M, Handysides R, Khademi AA, Bakland LK. Clinical implications of the smear layer in endodontics: a review. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2002; 94: 658-66.

94. Torneck CD. Reaction of hamster tissue to drugs used in sterilization of the root canal. Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology 1961; 14: 730-737.

95. Williams S, Goldman M. Penetrability of the smeared layer by a strain of Proteus vulgaris. J Endod 1985; 11: 385-8.

96. White RR, Hays GL, Janer LR. Residual antimicrobial acitivity after canal irrigantion with chlorexidine. J. Endod 1997; 23: 229-31.

97. Wu MK, Wesselink PR. Efficacy of three techniques in cleaning the apical portion of curved root canals.Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1995; 79:492-6.

98. Yamada RS, Armas A, Goldman M, Lin PS. A scanning electron microscopic comparison of a high volume final flush with several irrigating solutions: Part 3. J Endod 1983; 9: 137-42.

99. Yamaguchi M; Yoshida K; Suzuki R; Nakamura H. Root canal irrigation with citric acid solution. J Endod 1996; 22:27-9.

100. Yamashita JC, Tanomaru Filho M, Leonardo MR, Rossi MA, Silva LAB. Scanning electron microscopic study of the deaning ability of chlorexidine as root-canal irrigant. J Endod 2003; 36: 391-4.

101. Zehnder M, Schmidlin P, Sener B, Waltimo T. Chelation in root canal therapy reconsidered. J Endod 2005; 31: 817-20.