

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO**

**Daniel Vicente Tognon**

**Avaliação da citotoxicidade de um novo irrigante  
final e sua influência na estrutura da dentina  
radicular – estudo *in vitro***

Passo Fundo

2021

**Daniel Vicente Tognon**

**Avaliação da citotoxicidade de um novo irrigante  
final e sua influência na estrutura da dentina  
radicular – estudo *in vitro***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da UPF, para obtenção do título de Mestre em Odontologia – Área de Concentração em Clínica Odontológica, sob orientação do prof. Dr. Matheus Albino Souza.

Passo Fundo

2021

Folha reservada para  
Ata de aprovação da Banca Examinadora

Observação:

Mantenha esta página no seu arquivo, imprimindo-a.  
Após, faça a substituição pela Ata de aprovação fornecida pela  
Secretaria para manter a correta numeração do seu trabalho.

Folha reservada para  
Ficha catalográfica

Observação:

Mantenha esta página no seu arquivo, imprimindo-a.  
Após, faça a substituição pela Ficha Catalográfica fornecida pela  
Secretaria para manter a correta numeração do seu trabalho.

## DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, **Ivanir e Lurdes**, por sempre acreditarem em mim e por terem abdicado de muitas coisas nas suas vidas em prol das realizações e da felicidade de seus filhos.*

*À minha irmã **Taíse**, por sua preocupação, carinho e incentivo.*

*À minha amada esposa **Fernanda** e nossa filha **Antonella**, por todo amor, incentivo, apoio e compreensão. Nada disso teria sentido se vocês não existissem na minha vida.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, que iluminou o meu caminho durante esta caminhada.

Aos meus pais, *Ivanir e Lurdes* pelo apoio incondicional, amor e carinho doados a cada dia. É uma honra e um privilégio poder conviver com vocês.

À minha irmã, *Táise* pelo carinho, amor e cumplicidade. Obrigado pela ajuda na importação dos matérias que precisei para realizar essa pesquisa.

Ao meu professor e orientador, *Prof. Dr. Matheus Albino Souza*, agradeço o profissionalismo, sabedoria, organização e todo o conhecimento transmitido. Obrigado pela disponibilidade e paciência. Foi um privilégio ter sido seu orientado.

Ao professor *Dr. João Vicente Baroni Barbizam* que, dos Estados Unidos, não mediu esforços no envio do material necessário para a pesquisa. Sou muito grato por toda ajuda que me deste.

À equipe responsável pelo laboratório de metalografia do Instituto de Engenharia Mecânica da Universidade de Passo Fundo, pelo amparo em todos os momentos da pesquisa e *Cassiane Nunes*, pelo tempo cedido nas leituras das amostras.

À *secretaria do Mestrado*, pelo carinho, competência e por toda ajuda e auxílio desde o início.

À todos os *professores* da Faculdade de Odontologia da UPF, em especial, ao coordenador do mestrado professor *Dr. Pedro Henrique Corazza* pelo apoio incondicional.

À professora *Dra. Vanessa Valgas dos Santos* do Programa de Pós-Graduação em Ambiente e Saúde da Universidade do Planalto Catarinense (UNIPLAC), por toda acolhida, ajuda e excelência na realização de parte dos nossos experimentos.

À técnica *Moema Queiroz Vieira* do Laboratório Central de Microscopia e Microanálise (LabCEMM) da PUCRS, pela maneira como me recebeu, pela atenção e profissionalismo.

Ao professor *Dr. Maximiliano Schünke Gomes* pela acolhida e acompanhamento durante as atividades realizadas na Faculdade Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS).

A *todos* que contribuíram para que a realização deste trabalho fosse possível, tornando este meu sonho realidade. Que Deus dê em dobro a todos vocês tudo o que fizeram por mim.

## SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	5
AGRADECIMENTOS.....	6
SUMÁRIO .....	8
LISTA DE TABELAS .....	9
LISTA DE FIGURAS .....	10
LISTA DE ABREVIATURAS .....	12
RESUMO.....	14
ABSTRACT.....	16
1. INTRODUÇÃO .....	18
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	22
2.1. Citotoxicidade.....	22
2.2. Microdureza.....	29
2.3. Ultraestrutura.....	37
3. PROPOSIÇÃO.....	41
3.1. Este Estudo teve como Objetivo Geral.....	41
3.2. Este Estudo teve como Objetivo Específico.....	41
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	42
4.1. Avaliação da Citotoxicidade.....	42
4.2. Avaliação da Microdureza da Dentina Radicular.....	46
4.3. Avaliação da Ultraestrutura da Dentina Radicular.....	51
4.4. Análise Estatística.....	63
5. RESULTADOS .....	63
6. DISCUSSÃO .....	65
7. CONCLUSÕES .....	78
8. REFERÊNCIAS.....	79

## LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1</i> - Média $\pm$ desvio padrão da taxa de viabilidade celular (%) e da microdureza dentinária após tratamento com os protocolos de irrigação final testados.....	64
---	----

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Metodologia aplicada para a Avaliação da Citotoxicidade .....	44 e 45
<b>Figura 2</b> – Raízes com 15 mm de comprimento.....	47
<b>Figura 3</b> - Preparação das raízes para remoção do tecido pulpar e padronização do diâmetro do canal.....	47
<b>Figura 4</b> - Confecção de 2 sulcos longitudinais na superfície radicular externa.....	47
<b>Figura 5</b> - Divisão das raízes em duas metades com lâmina de micrótomo.....	48
<b>Figura 6</b> - Planificação para obtenção de espessura mínima de 2 mm e desgaste com angulação de aproximadamente 45° entre lúmen do canal e cimento.....	48
<b>Figura 7</b> - Fixação e polimento das amostras em blocos de resina acrílica.....	49
<b>Figura 8</b> - Divisão das amostras em 5 grupos.....	50
<b>Figura 9</b> - Avaliação da microdureza pelo microdurometro Vickers (HMV-2000, Shimadzu, Kyoto, Japão.....	50
<b>Figura 10</b> - Imagem das identações nas amostras.....	51
<b>Figura 11</b> - Limpeza dos dentes.....	52
<b>Figura 12</b> - Seccionamento da coroa e remanescentes radiculares.....	52
<b>Figura 13</b> - Confecção dos sulcos longitudinais e circundantes.....	53

<b>Figura 14</b> - Raízes padronizadas.....	55
<b>Figura 15</b> - Limagem e alargamento.....	55
<b>Figura 16</b> - Inserção dos irrigantes nos canais radiculares.....	55
<b>Figura 17</b> - Secagem final dos canais.....	56
<b>Figura 18</b> - Figura (18) Clivagem do Sulco V ao L.....	57
<b>Figura 19</b> - Amostra do Terço Médio.....	57
<b>Figura 20</b> - Descalcificação das amostras.....	58
<b>Figura 21</b> - Amostras em molde com resina.....	59
<b>Figura 22</b> - Cortes com Ultramicrótomo.....	60
<b>Figura 23</b> - Amostras dispostas em grids.....	60
<b>Figura 24</b> - Imersão em contraste.....	61
<b>Figura 25</b> - Análise das amostras no MET.....	62

## LISTA DE ABREVIATURAS

# - Diâmetro  
% - Percentagem  
+ - Soma  
< - Menor que  
≠ - Diferente  
> - Maior que  
μL – Microlitros  
μm – Micrometro  
ALT - Alterado  
ATCC – American Type Culture Collection  
AG – Ácido Glicólico  
CA – Acido cítrico 50% + tetraciclina 10%  
Ca(OCl)<sub>2</sub> - Hipoclorito de cálcio  
CFU – Unidades formadoras de colônias  
CHX - Digluconato de clorexidina  
CLSM - Microscópio de escaneamento de laser confocal  
CT – Comprimento de trabalho  
DIS - Disperso  
DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium, Sigma-Aldrich  
DW – Água destilada  
EDTA- Ácido etileno diamino tetracético  
g - Gramas  
h – Horas  
INT - Intácto  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Peróxido de hidrogênio  
J - Joules  
Log- Logarítmo  
MEM – minimum Essential Media  
MET – Microscópio Eletrônico de Transmissão  
MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura  
mg – Miligramas  
min- Minutos

mL – Mililitro  
mm – Milímetros  
MTT - Sigma-Aldrich  
n – Número de categorias  
NaCl – Cloreto de sódio  
NaOCl – Hipoclorito de sódio  
nm - Nanometros  
O<sub>2</sub> - Oxigênio  
°C – Graus Celsius  
p – Probalidade de significância  
PBS - Solução salina tamponada com fosfato  
PCA - Plate Count Agar  
pH – Potencial de hidrogênio, representação da escala uma  
solução neutra é igual a 7  
PI – Corante (propidium iodine)  
Qmix – Bisbiguanida, ácido poliaminocarboxílico, soro  
fisiológico e agente surfactante  
s- Segundos.  
Sa – Rugosidade superficial  
SEM - Scanning Electron Microscope  
SQA – Substância química auxiliar  
TEM - Transmission Electron Microscope  
UFC – Unidades formadoras de colônias  
x – magnificação do microscópio  
α – Alfa  
μCT - Microtomografia

## RESUMO

**Introdução:** Este estudo teve como objetivo avaliar, *in vitro*, a citotoxicidade de um novo irrigante final e sua influência na estrutura da dentina radicular. **Métodos:** A citotoxicidade foi avaliada por meio do ensaio MTT, a microdureza da dentina radicular por meio de microdurômetro Vickers e ultraestrutura da dentina radicular por meio de microscopia eletrônica de transmissão, havendo exposição das amostras por 1 minuto aos seguintes protocolos de irrigação final: (1) – água destilada estéril (controle), (2) - EDTA 17%, (3) - QMix, (4) - Ácido Glicólico 17% (AG) e (5) Novo Irrigante Final (composto por AG, clorexidina e agente surfactante). Análise estatística específica foi realizada para cada avaliação, com nível de significância igual a 5%. **Resultados:** A maior taxa de viabilidade celular foi observada no grupo controle, sendo estatisticamente diferente aos demais grupos testados ( $p < 0,05$ ). O grupo EDTA 17% apresentou um maior percentual de viabilidade celular, sendo estatisticamente superior aos grupos QMix e Novo irrigante final ( $p < 0,05$ ), sem diferença estatisticamente significativa em relação ao AG 17% ( $p > 0,05$ ). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos AG 17%, QMix

e Novo irrigante final ( $p>0,05$ ). Por sua vez, os resultados de microdureza demonstraram que todos os irrigantes finais testados promoveram modificações da microdureza na dentina radicular, quando comparados ao grupo controle, sem diferença estatística entre eles ( $p>0,05$ ). Por fim, as imagens de microscopia eletrônica de transmissão revelaram que a estrutura das amostras do grupo controle encontrava-se intacta, ao mesmo tempo em que a estrutura das amostras de todos os grupos experimentais encontrava-se dispersa, em ambas as magnificações. **Conclusões:** Diante das limitações do presente estudo, pode-se concluir que o Novo Irrigante Final apresenta citotoxicidade similar aos irrigantes finais convencionalmente utilizados e induz modificações superficiais na microdureza e ultraestrutura da dentina radicular, podendo ser obtido a um custo significativamente mais baixo.

**Palavras-chave:** ácido glicólico, citotoxicidade, irrigante final, microdureza, ultraestrutura dentinária.

## ABSTRACT

**Introduction:** This study aimed to evaluate, *in vitro*, the cytotoxicity of a new final irrigant and its influence on the structure of root dentin. **Methods:** Cytotoxicity was evaluated using the MTT assay, root dentin microhardness using a Vickers microhardness device and root dentin ultrastructure using transmission electron microscopy, with samples being exposed for 1 minute to the following final irrigation protocols: (1) - sterile distilled water (control), (2) - 17% EDTA, (3) - QMix, (4) - 17% Glycolic Acid (GA) and (5) New Final Irrigant (composed of GA, chlorhexidine and surfactant agent). Specific statistical analysis was performed for each assessment, with a significance level set to 5%.

**Results:** The highest rate of cell viability was observed in the control group, being statistically different from the other groups tested ( $p < 0.05$ ). The 17% EDTA group had a higher percentage of cell viability, being statistically higher to the QMix and New Final Irrigant groups ( $p < 0.05$ ), with no statistically significant difference compared to 17% GA ( $p > 0.05$ ). There was no statistically significant difference between the 17% GA, QMix and New Final Irrigant groups

( $p>0.05$ ). In your turn, the microhardness results showed that all final irrigants tested promoted microhardness modifications in the root dentin, when compared to the control group, with no statistical difference between them ( $p>0.05$ ). Finally, transmission electron microscopy images revealed that the structure of samples from the control group was intact, while the structure of samples from all experimental groups was dispersed, in both magnifications.

**Conclusions:** Given the limitations of the present study, it can be concluded that the New Final Irrigant presents cytotoxicity similar to the final irrigants conventionally used and induces superficial modifications in the microhardness and ultrastructure of the root dentin, which can be obtained at a significantly lower cost.

**Keywords:** cytotoxicity, dentin ultrastructure, final irrigant, glycolic acid, microhardness.

## 1. INTRODUÇÃO

O preparo químico-mecânico é de fundamental importância para a redução de microorganismos do sistema de canais radiculares, havendo a ação das substâncias químicas auxiliares em associação com a ação mecânica dos instrumentos endodônticos (HAAPASALO *et al.*, 2010). No entanto, durante esta etapa do tratamento endodôntico, existe a formação de uma camada denominada de *smear layer*, composta por raspas de dentina, microorganismos, remanescentes orgânicos e substâncias químicas auxiliares. (TORABINEJAD *et al.*, 2002). Esta camada apresenta adesão significativa às paredes dentinárias e promove a obliteração dos túbulos dentinários, trazendo, como consequência, uma inadequada penetração de agentes antimicrobianos e uma redução da resistência de união de materiais obturadores à dentina radicular (SHAHRAVAN *et al.*, 2007). Neste cenário, o uso de irrigantes finais com reconhecida habilidade para promover a remoção da *smear layer* se torna imprescindível no tratamento endodôntico.

O ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) é o irrigante final mais empregado no tratamento endodôntico para a remoção de *smear layer* (AHIR *et al.*, 2014). No entanto,

promove reduzida ação de limpeza no terço apical de canais radiculares (KURUVILLA *et al.*, 2015), limitada ação antimicrobiana (DE ALMEIDA *et al.*, 2016), redução da microdureza dentinária (ASLANTAS *et al.*, 2014), alteração do colágeno dentinário (WAGNER *et al.*, 2016) e potencial citotóxico (AMARAL *et al.*, 2007). Além disso, uma série de componentes tóxicos são liberados na sua produção, o que pode trazer um impacto ambiental significativo (SILLANPÄÄ, 1997).

O QMix, por sua vez, é um irrigante final utilizado no tratamento endodôntico, que apresenta na sua composição clorexidina, EDTA e um agente surfactante. Devido a esta composição, o QMix apresenta uma efetiva capacidade de remoção de *smear layer*, ao mesmo tempo em que pode contribuir para a redução de microorganismos do sistema de canais radiculares (STOJICIC *et al.*, 2012). No entanto, a presença do EDTA em sua composição pode levar aos efeitos prejudiciais descritos anteriormente. E, ainda, por se tratar de um produto importado e não disponibilizado comercialmente em território nacional, o custo para sua aquisição é significativamente superior quando comparado aos custos dos irrigantes finais convencionalmente utilizados.

Diante dos problemas expostos, torna-se necessária a busca por irrigantes finais alternativos, que possam promover uma efetiva capacidade de remoção de *smear layer*, sem induzir efeitos adversos quando utilizado no tratamento endodôntico.

O ácido glicólico (AG) pertence ao grupo de ácidos alfa-hidroxi, onde está inserido o ácido cítrico, um irrigante final comumente utilizado no tratamento endodôntico, no intuito de promover a remoção da *smear layer* (MANCINI *et al.*, 2009). O AG é biodegradável, apresenta baixo pKa, baixo peso molecular e natureza orgânica, sendo uma alternativa para ser utilizado em superfícies minerais como as estruturas dentárias (CECCHIN *et al.*, 2018). Recentemente, o AG apresentou efetiva remoção de *smear layer* e menor citotoxicidade quando comparado ao EDTA (BELLO *et al.*, 2019), além de apresentar estabilidade de pH e preservar as propriedades mecânicas da dentina radicular (BELLO *et al.*, 2020).

Diante das características e resultados apresentados previamente, o AG poderia ser um substituto ao EDTA na composição de um novo irrigante final similar ao QMix desenvolvido em território nacional, com menor custo e maior

acessibilidade para ser utilizado no tratamento endodôntico. Para tal, a formulação e uma série de propriedades deveriam ser testadas. Em relação à formulação deste novo irrigante final, bem como à avaliação da capacidade de remoção de *smear layer*, ação antimicrobiana e influência na resistência de união de materiais obturadores e restauradores, estudo prévio foi realizado com resultados satisfatórios nestas quatro avaliações (DIAS, 2020). A partir destes resultados, novas propriedades relacionadas ao uso deste novo irrigante final precisam ser avaliadas, tais como citotoxicidade, bem como sua influência na microdureza e ultraestrutura da dentina radicular, tornando justificável a realização do presente estudo.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Citotoxicidade

A área da saúde é um campo em constante mudança. Na odontologia, diversas são as propriedades dos materiais que podem ser analisadas para qualificação acerca da confiabilidade para o uso clínico (WAGNER *et al.*, 2016).

O EDTA é o irrigante final mais empregado no tratamento endodôntico para a remoção de *smear layer* (AHIR *et al.*, 2014). No entanto, promove reduzida ação de limpeza no terço apical de canais radiculares (KURUVILLA *et al.*, 2015), limitada ação antimicrobiana (DE ALMEIDA *et al.*, 2016), redução da microdureza dentinária (ASLANTAS *et al.*, 2014), alteração do colágeno dentinário (WAGNER *et al.*, 2016) e potencial citotóxico (AMARAL *et al.*, 2007). Frente a isso, KOLAOUZIDOU *et al.* (1999) avaliaram e compararam os efeitos citotóxicos de soluções de EDTA neutro (15%, 1% e 0,1%) e alcalino (17%, 1%, 0,1%) com os da solução de hipoclorito de sódio (2,25%, 1%, 0,1%) usando uma linhagem celular estabelecida: L929, com células de fibroblastos. A citotoxicidade foi avaliada por técnica quantitativa em cinco períodos de observação (1, 3, 6, 12 e 24 horas) e os efeitos não citotóxicos foram observados nos

grupos controle. Nos testes utilizando EDTA e NaOCI, houve uma diminuição na densidade celular confirmando o efeito citotóxico dos materiais testados. As concentrações de 17% e 15% de EDTA e 2,25% de NaOCI foram citotóxicos enquanto que em concentrações de 0,1%, os agentes eram moderadamente citotóxicos. Como resultado, concluiu-se que todos os agentes testados apresentaram citotoxicidade moderada a grave no presente modelo experimental de maneira dependente da concentração.

Em estudo realizado no ano de 2007 por AMARAL *et al.*, foi avaliado a citotoxicidade, *in vivo*, do EDTA 17% e solução de ácido cítrico 15% em macrófagos usando o método MTT. Nesse estudo, um total de  $5 \times 10^5$  células foram plaqueadas em cultura média com EDTA 17% ou ácido cítrico 15%, onde foi utilizado o meio de cultura puro e fresco como controle. Os valores de toxicidade foram analisados estatisticamente pelo teste de ANOVA e Tukey ( $P < 0,05$ ) em períodos curtos de observação (0, 6, 12, 24 horas) e períodos médios de observação (1, 3, 5, 7 dias), utilizando a absorvência ELISA como método de avaliação para a citotoxicidade. Concluiu-se que tanto o EDTA 17% como o ácido cítrico 15% apresentaram efeitos citotóxicos nas culturas de macrófagos

*in vivo*. No entanto, o ácido cítrico foi menos tóxico nos períodos de avaliação de 1 a 7 dias de uso.

ASHOFTEH *et al.*(2012) compararam as respostas do tecido subcutâneo ao MTAD, EDTA 17% e NaOCl 2,6%. Foram utilizados para o estudo, trinta e seis ratos Wistar e as soluções testadas foram injetadas subcutaneamente em áreas predeterminadas no dorso do animal. Os ratos foram então divididos aleatoriamente em três grupos (n=12) e sacrificados a cada 2 horas, 2 dias e 2 semanas, sendo avaliada histologicamente a gravidade da inflamação induzida por cada irrigante em diferentes intervalos de tempo. Os resultados mostraram que não houve diferença significativa entre a gravidade da inflamação induzida por MTAD e 2,6% de NaOCl nos diferentes intervalos de tempo. As respostas de tecido subcutâneo ao MTAD não foram diferentes das observadas em espécimes de EDTA 17% em intervalos de 2 horas e 2 dias. Sob as condições deste estudo, o MTAD apresentou a mesma toxicidade que 2,2% de NaOCl.

Uma pesquisa conduzida por MARINS *et al.*(2012) avaliou a capacidade, *in vitro*, de irrigantes endodônticos em induzir dano genético ou morte celular. Nesse estudo, células de fibroblastos foram expostas ao EDTA, NaOCl, MTAD e

ácido cítrico em concentrações crescentes por 3 horas a 37°C. O grupo controle negativo foi tratado com controle veicular (solução tampão fosfato – PBS) por 3 horas a 37°C, e o controle positivo foi tratado com metilmetanosulfonato, 1µM, durante 3 horas a 37°C. A citotoxicidade foi avaliada pelo teste do azul de tripano e a genotoxicidade foi avaliada pelo ensaio de célula única (cometa). Os resultados mostraram que, a exposição a 2,5% e 5% de NaOCl e 8,5% de ácido cítrico resultou em um efeito citotóxico significativo. O NaOCl, EDTA e ácido cítrico não produziram efeitos genotóxicos em relação aos danos do ensaio cometa para todas as concentrações avaliadas. Embora o MTAD não tenha sido um agente citotóxico, mostrou efeitos genotóxicos significativos em todas as concentrações testadas. Verificou-se também, que o NaOCl, o EDTA e o ácido cítrico são citotóxicos dependendo da dose, mas não se mostraram genotóxicos. O MTAD não causou morte celular, mas apresentou efeitos genotóxicos.

O QMix é um irrigante final utilizado no tratamento endodôntico, que apresenta na sua composição clorexidina, EDTA e um agente surfactante. Devido a esta composição, o QMix apresenta uma efetiva capacidade de remoção de *smear*

*layer*, ao mesmo tempo em que pode contribuir para a redução de microorganismos do sistema de canais radiculares (STOJICIC *et al.*, 2012). Frente a isso, ALKAHTANI *et al.*(2014) avaliaram e compararam a citotoxicidade do QMix na irrigação do canal em células-tronco mesenquimatosas da medula óssea humana (hTERT-MSC-C1) e compararam com o hipoclorito de sódio (NaOCl). As células foram expostas ao QMix e NaOCl. A viabilidade celular foi avaliada por ensaios de MTT e alamarBlue. A morfologia celular foi estudada após duas horas de exposição ao QMix e NaOCl e, após períodos de incubação de 2 e 4 horas, as análises foram realizadas. Finalmente, a mancha fluorescente de brometo de etídio / alga de acridina (EB / AO) foi aplicada às células nas lâminas de depois de serem incubadas com os agentes testados durante 2 horas para detectar células vivas e mortas. Concluiu-se que as soluções QMix e NaOCl foram tóxicas para as células-tronco mesenquimatosas onde cada uma induziu a morte celular de maneira diferente.

Em 2015, VOUZARA *et al.*, avaliaram a capacidade de irrigantes do canal radicular de induzir efeitos citotóxicos, quando aplicados isoladamente ou em combinação. As células MRC<sub>5</sub> foram cultivadas como culturas de

monocamada a 37°C, numa atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub> em ar e 100% de humidade relativa. As células foram expostas a hipoclorito de sódio (NaOCl), ácido etilendiaminotetracético (EDTA), clorexidina (CHX) e suas combinações (NaOCl/EDTA, NaOCl/CHX e EDTA/CHX) em diluições seriadas. O meio de crescimento utilizado foi o meio de Eagle modificado por Dulbecco suplementado com 10% de soro bovino fetal e antibióticos e foi usado como controle. O efeito na sobrevivência celular foi estimado após 6 e 24 h de exposição por meio do ensaio da sulforrodamina B, em referência aos controles. Os irrigantes testados foram citotóxicos de maneira dependente da dose e do tempo. A CHX foi o irrigante mais citotóxico testado, seguido pelo NaOCl, enquanto o EDTA foi o irrigante testado menos citotóxico. A CHX foi significativamente mais citotóxica que o NaOCl e o EDTA. O NaOCl foi significativamente mais citotóxico do que o EDTA. A ação combinada de irrigantes não produziu um aumento significativo em sua citotoxicidade.

FHARHAD *et al.*(2016) realizaram um estudo sobre o efeito de algumas soluções irrigadoras em células tronco de papila apical humana (SCAPs) após diferentes períodos de

exposição. Para o estudo, células tronco de terceiros molares inferiores impactados e imaturos foram isolados e transferidos para 24 placas de wells, divididas aleatoriamente em 6 grupos experimentais, sendo expostas a BioPure MTAD Cleanser, QMix, EDTA 17%, Clorexidina 2%, NaOCl a 5,25%, solução salina estéril e grupo controle não tratado. A citotoxicidade foi avaliada após 1,5 e 15 minutos de exposição utilizando o ensaio de tiazol tetrazólio (MTT). A porcentagem média de células viáveis em todos os grupos experimentais foi significativamente diferente dos grupos de solução salina estéril em todos os momentos e, a porcentagem média de células viáveis diminuiu significativamente ao longo do tempo nos grupos NaOCl, QMix, EDTA e MTAD, mas nenhuma redução significativa foi observada no grupo CHX. Em todos os momentos, a maior e a menor citotoxicidade foram observadas nos grupos MTAD e solução salina normal, respectivamente. A citotoxicidade dos materiais de estudo do mais alto a mais baixo foi o seguinte: MTAD > EDTA > QMix = NaOCl > CHX > solução salina estéril. De acordo com estudo, concluiu-se que clorexidina teve a menor citotoxicidade e essa não mudou ao longo do tempo em comparação com outras soluções.

## **2.2. Microdureza**

Um estudo preconizado por ELDENIZ, *et al.*(2005) avaliou o efeito das soluções de ácido cítrico e EDTA sobre a microdureza e a rugosidade da dentina do canal radicular humano. Para o experimento, foram utilizados quarenta e cinco dentes humanos seccionados longitudinalmente, sendo os espécimes divididos aleatoriamente em três grupos de 30 dentes cada um e tratados da seguinte forma: (a) um ácido cítrico de um molar (19%) durante 150 segundos, seguido de NaOCl a 5,25%; (b) EDTA a 17% por 150 s e enxaguada com 5,25% de NaOCl; (c) lavou-se com água destilada e serviu como grupo controle. Três grupos foram então divididos em dois subgrupos de 15 espécimes cada. Os espécimes, no primeiro subgrupo, foram submetidos ao teste de Vickers, enquanto o segundo subgrupo foi submetido a testes de rugosidade superficial. Concluiu-se que, houve diferenças significativas na microdureza entre os grupos de teste, sendo o grupo do ácido cítrico o menos duro ( $p < 0,05$ ). Ademais, o ácido cítrico aumentou significativamente a rugosidade da superfície.

O efeito das soluções de ácido cítrico, EDTA e ácido etilenodiaminotetraacético mais Cetavlon (EDTAC) sobre a

microdureza da dentina do canal radicular humano foi avaliado por DE-DEUS, *et al.*, em 2006. Foram utilizados dezesseis caninos humanos maxilares que foram seccionados transversalmente na junção cimento-esmalte, sendo descartadas as coroas. Posteriormente, cada raiz foi incorporada em um cilindro de resina epóxi e seu terço médio seccionado horizontalmente em fatias de 4 mm de espessura. As amostras foram divididas aleatoriamente em três grupos de acordo com o agente quelante empregado, da seguinte forma (n = 6): grupo 1: EDTA 17%, grupo 2: EDTAC 17% e grupo 3: ácido cítrico 10%. A microdureza de dentina foi medida com uma carga de 50 g por 15 segundos. No início do experimento, foram obtidos valores de microdureza de referência para amostras sem gravidade (t = 0 min). As mesmas amostras foram então expostas a 50 microL da solução de quelante durante 1,3 e 5 min. O teste T de Student (P <0,05) foi usado para comparar resultados para diferentes tempos para cada quelador e diferentes quelantes para cada tempo. Concluiu-se que a microdureza diminuiu com o aumento do tempo de aplicação de soluções de quelação, não havendo diferenças significativas entre microdureza inicial para os três grupos, bem como após 1 min de aplicação das

substâncias. Após 3 min, o EDTA produziu uma redução significativamente maior na microdureza. Entretanto, não houve diferença significativa entre EDTA e EDTAC após 5 min. O ácido cítrico causou redução significativa na microdureza.

O efeito de 7% de ácido maleico e 17% de EDTA sobre a microdureza e a rugosidade superficial da dentina do canal radicular humano, foi alaviado por BALLAL, *et al.*, em 2010. Foram seccionados longitudinalmente quarenta e cinco incisivos centrais superiores humanos, descartando as coroas, em um total de 90 segmentos, sendo incorporados em resina acrílica de polimerização automática e foram aterrados de forma plana com papéis abrasivos de carboneto de silício. Com base nas soluções de teste utilizadas, as amostras foram divididas aleatoriamente em três grupos: (1) o grupo EDTA, 1 mL de EDTA a 17% durante 1 minuto ( $n = 30$ ), (2) o grupo ácido maleico, 1 mL de 7% ácido maleico durante 1 minuto ( $n = 30$ ), e (3) o grupo controle, 1 mL de solução salina a 0,9% durante 1 minuto ( $n = 30$ ). Todo grupo foi então dividido em dois subgrupos de 15 espécimes cada. No grupo 1a, 2a e 3a, foram utilizados espécimes para determinar a microdureza da dentina do canal radicular no terço coronal, médio e apical

usando o testador de dureza de Vicker. Nos grupos 1b, 2b e 3b, foram utilizados espécimes para a determinação da rugosidade superficial da dentina do canal radicular utilizando um testador de rugosidade (Surtronic, Leicester, Inglaterra). De acordo com o estudo, concluiu-se que o ácido maleico reduziu a microdureza da dentina radicular semelhante ao EDTA, mas aumentou a rugosidade da superfície significativamente mais do que o EDTA.

Em 2011, CRUZ-FILHO, *et al.*, investigaram o efeito de diferentes soluções de quelação sobre a microdureza da camada de dentina mais superficial do lúmen do canal radicular. Foram utilizados trinta e cinco incisivos centrais maxilares extraídos onde as raízes foram seccionadas longitudinalmente em uma direção mesiodistal para expor a extensão do canal inteiro. Os espécimes foram distribuídos em sete grupos de acordo com a irrigação final: 15% de EDTA, 10% de ácido cítrico, 5% de ácido málico, 5% de ácido acético, vinagre de maçã, 10% de citrato de sódio e controle (sem irrigação). Foi utilizado um volume padronizado de 50  $\mu$ L de cada solução quelante durante 5 minutos. A microdureza dentinária foi medida com um indentador de Knoop sob uma carga de 10 g e um tempo de

permanência de 15 segundos e os dados foram analisados estatisticamente por análise de variância unidirecional e teste de comparação múltipla de Tukey-Kramer com nível de significância de 5%. Como resultados desse estudo, o EDTA e o ácido cítrico tiveram o maior efeito geral, causando uma diminuição acentuada da microdureza da dentina sem diferença significativa ( $p > 0,05$ ) umas das outras. No entanto, ambos os quelantes diferiram significativamente das outras soluções ( $p < 0,001$ ), o citrato de sódio e água desionizada foram semelhantes entre si ( $p > 0,05$ ) e não afetaram a microdureza da dentina. O vinagre de maçã, ácido acético e ácido málico foram semelhantes entre si ( $p > 0,05$ ) e apresentaram resultados intermediários.

A microdureza da dentina radicular foi avaliada usando EDTA 17%, MTAD e 18% HEBP em um estudo conduzido por DINESHKUMAR, *et al.*(2012). Para o estudo, quarenta dentes humanos de canal único foram seccionados longitudinalmente, gerando oitenta espécimes que foram divididos em quatro grupos ( $n = 20$ ). O grupo I foi tratado com água destilada (controle), os grupos II, III e IV foram tratados com 1,3% de NaOCl como solução de trabalho durante 20 minutos, seguido de 17% de EDTA, MTAD e 18%

de HEBP, respectivamente. A dureza superficial da dentina radicular foi determinada em cada espécime com indentador de Vickers e os valores obtidos foram analisados estatisticamente utilizando ANOVA unidirecional e testes de comparação múltipla Tukey pós-hoc. Como resultados, constatou-se diferenças estatisticamente significativas entre todos os grupos (ANOVA unidirecional,  $P < 0,001$ ). Entre os grupos experimentais, a HEBP mostrou a maior microdureza dentinária (53,74 MPa,  $P < 0,001$ ). A microdureza mínima foi encontrada com MTAD (42,85 MPa,  $P < 0,001$ ).

O estudo conduzido por TUNCER *et al.* (2015) avaliou os efeitos do QMIX, EDTA + Clorexidina, EDTA + ácido clorídrico e ácido maleico sobre a microdureza da dentina do canal radicular. Nesse estudo, utilizou-se quarenta caninos superiores, recém extraídos, que foram seccionados longitudinalmente em 80 segmentos e depois incorporados em uma resina acrílica ultra- polimerizável. A microdureza da dentina na amostra foi medida com um indentador de diamante Vickers nos terços coronais, médios e apicais das raízes. Por fim, os espécimes foram divididos aleatoriamente em quatro grupos: 17% de EDTA + 2,5% de NaOCl; 17% de EDTA + 2% de CHX; QMix; e 7% de ácido maleico. Os

valores de microdureza pós-tratamento foram obtidos e a diminuição da microdureza foi calculada como uma porcentagem. Os valores de microdureza foram analisados estatisticamente usando os testes U de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. Chegou-se a conclusão que, o ácido maleico diminui a microdureza em todas as regiões, em comparação aos demais. Enquanto o QMix, EDTA 17% + CHX 2% e EDTA 17% + NaOCl 2,5% causaram a mesma redução na microdureza da dentina do canal radicular nas regiões coronais e médias.

Em 2017a, BALDASSO *et al.*, avaliaram o efeito dos protocolos de irrigação final sobre a redução da microdureza e erosão da dentina do canal radicular. No estudo, foram utilizados 60 canais radiculares de incisivos mandibulares, instrumentados e divididos em 6 grupos aleatoriamente de acordo com o irrigante utilizado: QMiX, 17% de EDTA, 10% de ácido cítrico (CA), 1% de ácido peracético (PA), 2,5% de NaOCl (controle da solução) e água destilada (controle negativo). As soluções de quelação foram utilizadas para irrigar o canal seguido de 2,5% de NaOCl. Concluiu-se que o QMIX e o EDTA 17% reduziram a microdureza dentinária

em maior profundidade. Ademais, o QMIX não causou erosão dentinária.

DAL BELLO *et al.*(2019) pesquisaram os efeitos do ácido glicólico na microdureza, rugosidade e distribuição do conteúdo mineral da dentina; remoção da *smear layer* e citotoxicidade. Para o estudo, cem dentes humanos foram divididos aleatoriamente em seis grupos: água destilada (grupo controle), 17% de EDTA, 10% de ácido cítrico (CA), 5% de AG, 10% de AG e 17% de AG. A microdureza e rugosidade foram medidos no lúmen do canal. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (SEM) (2000X) para análise da remoção da *smear layer*; espectroscopia de raios x dispersiva em energia (EDS) para análises químicas. O ensaio de viabilidade celular foi efetuado em células de fibroblastos. Mediante o estudo, observou-se que a menor microdureza e maior rugosidade foram observados para 17% de AG. O ácido glicólico e o ácido cítrico foram citotóxicos de maneira dependente da dose. O AG apresentou a capacidade de remover a *smear layer* para um nível semelhante ao EDTA e CA, sem diferença estatística entre as concentrações utilizadas. Sendo assim, o AG mostrou potencial como agente endodôntico para irrigação final em endodontia.

### 2.3. Ultraestrutura

O efeito de diferentes protocolos de irrigação no preparo químico mecânico sobre componentes orgânicos e inorgânicos da dentina radicular de dentes bovinos foi avaliado por GHISI *et al.*, em 2015. Para a realização do estudo, foram utilizados oitenta incisivos bovinos divididos aleatoriamente em 8 grupos (n=10): 5NaOCl, 5NaOCl + EDTA, 2NaOCl, 2NaOCl + EDTA, Sterilox, Sterilox + EDTA, EDTA e água destilada. A instrumentação do canal radicular foi realizada usando o irrigante correspondente. Os 15mm apicais foram seccionados longitudinalmente em 2 fragmentos: um para análise de microscopia de luz em lâminas coradas com picrosírius vermelho (componente orgânico) e o outro para análise por microscopia eletrônica de varredura (componente inorgânico). Os escores obtidos em ambas avaliações foram submetidos à análise estatística específica. De acordo com os resultados do presente estudo, pôde-se concluir que o uso de NaOCl 5% promoveu o dano mais extenso ao componente orgânico da dentina e, quando associado ao EDTA, a erosão dentinária pôde ser observada.

Um estudo conduzido por BALDASSO *et al.*(2017b) avaliou os efeitos de quatro agentes quelantes endodônticos,

seguidos de hipoclorito de sódio a 2,5% (NaOCl), como agentes finais de irrigação nos componentes orgânicos e inorgânicos da dentina radicular humana. Para o estudo, foram preparados sessenta incisivos inferiores e divididos aleatoriamente em seis grupos (n=10): QMiX, 1% de ácido peracético (PA), 17% de EDTA, 10% de ácido cítrico (CA), 2,5% de NaOCl (solução de controle) e água destilada (DW) (controle negativo). Os espécimes foram divididos longitudinalmente em duas metades; um foi designado para análise de componentes orgânicos por microscopia de luz polarizada (PLM) e o outro para análise de estrutura inorgânica por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Mediante ao estudo, concluiu-se que os grupos NaOCl e DW apresentaram uniformidade na rede fibrilar e *smear layer* obliterando os túbulos dentinários, enquanto o grupo CA apresentou alteração nos componentes orgânicos e inorgânicos da dentina. O grupo EDTA não diferiu dos demais no componente orgânico, mas causou alteração na estrutura inorgânica. Em contra-partida, os grupos QMiX e PA não causaram alteração morfológica significativa no colágeno e removeram a *smear layer* sem modificação da estrutura inorgânica. Como irrigação final, as soluções de

QMIX e PA, seguidas de NaOCl a 2,5%, apresentaram melhor comportamento do que os demais agentes quelantes testados, preservando os componentes orgânicos e inorgânicos da dentina radicular humana.

WAGNER *et al.*(2017) avaliaram o efeito de diferentes protocolos de irrigação na estrutura da dentina radicular utilizando a microscopia eletrônica de varredura (SEM) e na ultraestrutura da dentina radicular utilizando a microscopia eletrônica de transmissão (TEM). Nesse estudo, foi utilizado trinta e nove incisivos bovinos inferiores, sendo seccionados longitudinalmente e divididos aleatoriamente em 13 grupos (n = 3). Após remontar as metades das raízes, aplicou-se um protocolo de irrigação diferente para cada grupo: G1, água destilada (grupo controle); G2, solução salina a 0,9%; G3, solução salina + EDTA 17%; G4, solução salina + PUI; G5, solução salina + PUI + EDTA; G6 a G9 receberam o mesmo protocolo acima mencionado, porém, substituiu-se a solução salina a 0,9% por NaOCl 2,5%; E G10 a G13, substituiu-se por CHX 2%. A metade das amostras foram preparadas e avaliadas com o uso de SEM e a outra metade com o uso de TEM. Este estudo resultou na análise descritiva de TEM mostrando modificações na ultraestrutura orgânica da

dentina, caracterizada pelo desbaste das fibrilas de colágeno da dentina, causadas por NaOCl, reforçada por EDTA e/ou PUI. A análise de SEM mostrou que o NaOCl com PUI causou erosão significativamente maior na dentina peritubular do que em todos os outros grupos ( $p < 0,05$ ), seguido de NaOCl + EDTA e NaOCl + EDTA + PUI. Concluiu-se que o NaOCl causou alterações ultraestruturais no colágeno dentinário e reforçado pelo EDTA e/ou PUI, promoveu erosão peritubular e intertubular.

DAL BELLO *et al.* (2020) avaliaram os efeitos do ácido glicólico (AG) na resistência a flexão da dentina. No estudo, a tensão superficial e os níveis de pH das soluções de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), ácido cítrico (CA) e AG foram avaliados em diferentes épocas e temperaturas, os feixes de dentina em pó e dentina mineralizada foram imersos por 1min em soluções de EDTA, CA ou AG e submetidos a espectroscopia para análise da razão apatita/colágeno e teste de flexão de 3 pontos, respectivamente. Observou-se que, o AG apresentou o maior tamanho de partícula ( $\mu\text{m}$ ) e sua tensão superficial foi semelhante à do EDTA e CA. Não obstante, a tensão superficial diminuiu em soluções de maiores concentrações e, o AG mostrou estabilidade de pH

em todos os momentos e temperaturas analisadas. A relação apatita/colágeno diminuiu com o aumento das concentrações de AG, enquanto a força de flexão não foi consideravelmente afetada pela concentração AG. Desse modo, o AG apresentou ser uma escolha significativa como solução final de irrigação após a preparação do canal radicular.

### **3. PROPOSIÇÃO**

#### **3.1. Este estudo teve como objetivo geral:**

Avaliar, *in vitro*, a citotoxicidade de um novo irrigante final e sua influência na estrutura da dentina radicular

#### **3.2. Este estudo teve como objetivos específicos:**

3.2.1. Avaliar, *in vitro*, a citotoxicidade de um novo irrigante final composto por ácido glicólico, clorexidina e agente surfactante, por meio de ensaio MTT.

3.2.1.1. Avaliar a influência desse novo irrigante final na microdureza da dentina radicular por meio do microdurômetro de Vickers, e na ultraestrutura da dentina radicular por meio da microscopia eletrônica de transmissão.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

Este estudo foi apreciado e aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa da Universidade de Passo Fundo (protocolo nº 4.396.496).

### **4.1. Avaliação da Citotoxicidade**

Neste experimento, foram utilizadas células L929, que são culturas contínuas de fibroblastos de gengiva, provenientes da American Type Culture Collection (ATCC), gentilmente cedidas pelo Laboratório de Virologia Aplicada da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC, Florianópolis, SC, Brasil). Para a manutenção das células foi escolhido o meio MEM (Minimum Essential Media – Sigma-Aldrich, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil) em frascos de cultura de 75 cm<sup>2</sup> mantidos em atmosfera umidificada a 37° C e 5% de CO<sup>2</sup>. Não foram utilizados antibióticos ou antifúngicos durante a manutenção da cultura celular e/ou experimentos.

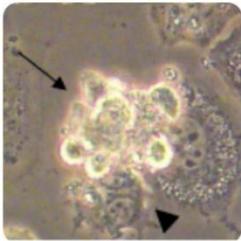
Para avaliação da citotoxicidade celular, foi realizado o ensaio com brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium ou MTT (Sigma-Aldrich), que corresponde a um

teste colorimétrico utilizado para avaliar a viabilidade celular. No dia anterior ao ensaio, as células L929 foram tripsinizadas, contadas e distribuídas em placas de 96 poços na concentração de  $1 \times 10^5$  células por poço. O meio para a realização dos experimentos foi o DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Sigma-Aldrich, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), enriquecido com 5% de soro fetal bovino.

Após a incubação durante 24 horas a  $37^\circ \text{C}$  em estufa com 5% de  $\text{CO}_2$ , foi realizada a observação da confluência do tapete celular através da visualização em microscópio invertido. A seguir, o meio DMEM foi retirado por aspiração e 100  $\mu\text{L}$  das seguintes soluções foram adicionadas: água destilada estéril (controle) (G1), EDTA 17% (G2), QMix (G3), Ácido Glicólico (AG) 17% (G4) e Novo Irrigante Final composto por ácido glicólico, clorexidina e agente surfactante (G5), sendo incubadas no período de tempo de 1 minuto.

Após o tempo de incubação, os poços foram lavados com 200  $\mu\text{L}$  de PBS estéril a temperatura de  $37^\circ \text{C}$ , e foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  da solução de MTT (1  $\text{mg/mL}$  em meio DMEM), para incubação pelo período de 4 horas. Posteriormente, o MTT foi cuidadosamente retirado evitando a danificação das células e foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de

dimetilsulfóxido (DMSO) para solubilização dos cristais de formazam. Também foi adicionado o DMSO em poços vazios para o cálculo do branco. A placa foi colocada em um agitador durante 10 minutos de incubação e a absorbância foi então mesurada em filtro de 490 nm (Figura 1).



Células L929, que são culturas contínuas de fibroblastos de gengiva, provenientes da American Type Culture Collection (ATCC).



Para a manutenção das células foi escolhido o meio MEM (Minimum Essential Media - Sigma-Aldrich).



Suplementação com 10% de soro fetal bovino em frascos de cultura de 75 cm<sup>2</sup>, mantidos em atmosfera umidificada a 37° C e 5% de CO<sub>2</sub>. Não foram utilizados antibióticos ou antifúngicos durante a manutenção da cultura celular e/ou experimentos.



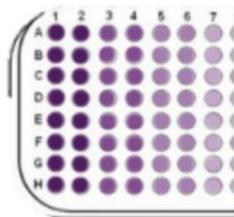
Ensaio com brometo de 3-(4,5-dimetiliazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium ou MTT (Sigma-Aldrich), que corresponde a um teste colorimétrico utilizado para avaliar a viabilidade celular. No dia anterior ao ensaio, as células L929 foram triplicadas, contadas e distribuídas em placas de 96 poços na concentração de 1x10<sup>5</sup> células por poço.



O meio para a realização dos experimentos foi o DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Sigma-Aldrich) enriquecido com 5% de soro fetal bovino.



Após a incubação durante 24 horas a 37° C em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> foi realizada a observação da confluência do tapete celular através da visualização em microscópio invertido.



Após o tempo de incubação os poços foram lavados com 200  $\mu$ l de PBS estéril a temperatura de 37°C e foram adicionados 50  $\mu$ l da solução de MTT (1 mg/ mL em meio DMEM) para incubação por 4 horas.

O MTT foi cuidadosamente retirado evitando a danificação das células e foram adicionados 100  $\mu$ l de dimetilssulfóxido (DMSO) para solubilização dos cristais de formazam.

Foi adicionado o DMSO em poços vazios para o cálculo do branco. A placa foi colocada em um agitador durante 10 minutos de incubação e a absorbância foi então mesurada em filtro de 490 nm.



Solução Tampão Fosfato Salina (PBS) como solução controle (G1);  
 (EDTA) 17% (G 2);  
 QMix (G3);  
 Ácido Glicólico ( AG ) 17% (G4);  
 Novo Irrigante Final (NF) composto por ácido glicólico, clorexidina e agente surfactante (G5);  
 Incubações no período de tempo de 3 minutos.

A seguir, o meio DMEM foi retirado por aspiração e 100  $\mu$ l das seguintes soluções foram adicionadas:



Figura 1 – Metodologia aplicada para a *Avaliação da Citotoxicidade*.

Ressalta-se que todos os experimentos foram realizados em triplicata e as porcentagens de viabilidade celular foram calculadas em relação aos controles celulares, conforme fórmula abaixo:

$$\% \text{ de viabilidade} = \frac{(\text{absorbância da amostra} - \text{média da absorbância do branco}) \times 100}{(\text{absorbância do controle} - \text{média da absorbância do branco})}$$

#### **4.2. Avaliação da microdureza da dentina radicular**

Cinquenta incisivos superiores humanos extraídos foram obtidos no Biobanco da Faculdade de Odontologia da Universidade de Passo Fundo. As coroas dentárias foram seccionadas com disco de diamante, obtendo-se raízes de 15 mm de comprimento (Figura 2). Todas as raízes foram preparadas até o forame apical com limas tipo K #15 (Dentsply Sirona, Tulsa, OK, Estados Unidos) e água destilada para remoção de tecido pulpar e padronização do diâmetro do canal (Figura 3). A seguir, dois sulcos longitudinais foram feitos na superfície radicular externa com um disco de diamante, sem atingir o espaço do canal (Figura 4). As raízes foram divididas em duas metades com lâminas

de micrótomo, totalizando 100 amostras (Figura 5). A superfície convexa recoberta com cimento foi planificada com broca de diamante, mantendo 2 mm de espessura entre a superfície desgastada e a luz do canal radicular. A camada de dentina entre o lúmen do canal radicular e o cimento também foi planificada com angulação de aproximadamente  $45^\circ$  para facilitar o polimento do canal radicular e sua visualização no dispositivo microscópico do microdurômetro (Figura 6).



(2)



(3)



(4)

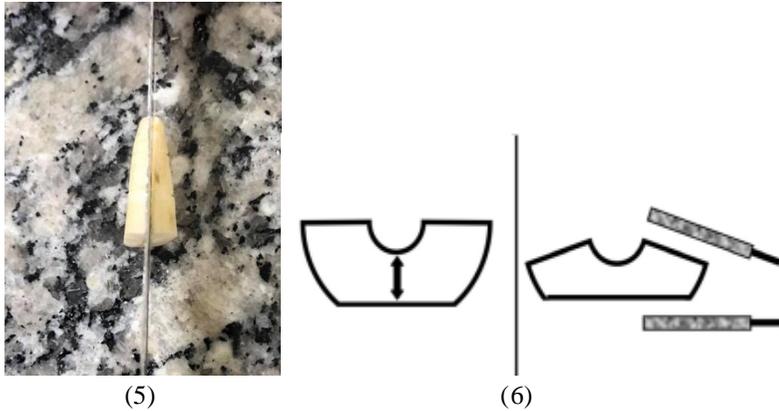


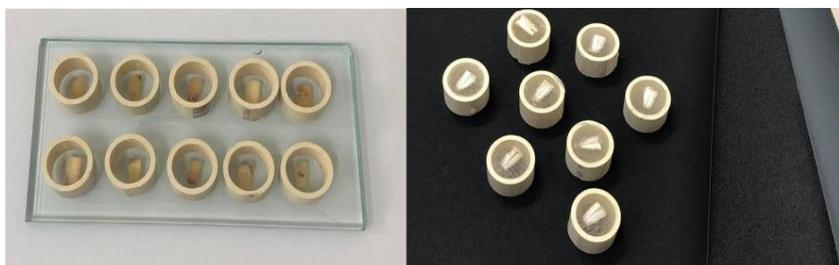
Figura (2) Raízes com 15 mm de comprimento; (3) Preparação das raízes para remoção do tecido pulpar e padronização do diâmetro do canal; (4) Confeção de 2 sulcos longitudinais na superfície radicular externa; (5) Divisão das raízes em duas metades com lâmina de micrótomato; (6) Planificação para obtenção de espessura mínima de 2 mm e desgastade com angulação de aproximadamente 45° entre lúmen do canal e cemento.

Todas as amostras foram fixadas em blocos de resina acrílica, deixando a dentina radicular exposta para cima. As amostras foram polidas com lixa de carboneto de silício (granulação 180, 320 e 600) e papel de polimento de diamante de 0,25 mm (Metkon, Bursa, Turquia) sob resfriamento com água destilada (Figura 7). Por fim, as amostras foram lavadas com água destilada e secas com cânula de aspiração.

As amostras foram divididas em 5 grupos (n=20), de acordo com os irrigantes testados, conforme descrito anteriormente para avaliação da citotoxicidade. Em todos os

grupos, as amostras foram cobertas com 1 mL da solução teste, ficando totalmente cobertas. O tempo de contato foi de 1 minuto (Figura 8). Após esse período, as amostras foram lavadas com 5 mL de água destilada e secas com cânula de aspiração.

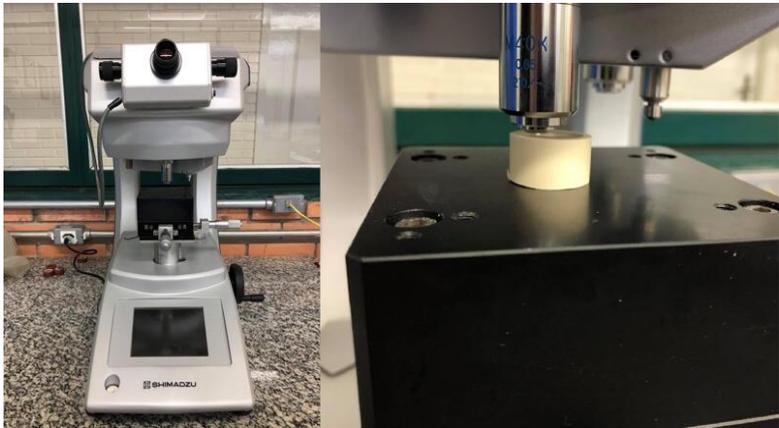
A microdureza foi mensurada por meio de microdurômetro Vickers (HVM-2000, Shimadzu, Kyoto, Japão) com aumento de 40x, carga de 300 g e tempo de permanência de 20 segundos (Figura 9). Três indentações foram feitas ao longo de linhas paralelas à borda do lúmen do canal radicular, sendo as primeiras a 1.000  $\mu\text{m}$  da entrada do canal radicular e as outras duas a 200  $\mu\text{m}$  uma da outra. O valor de microdureza para amostra foi obtido por meio do valor médio para as três indentações (Figura 10).



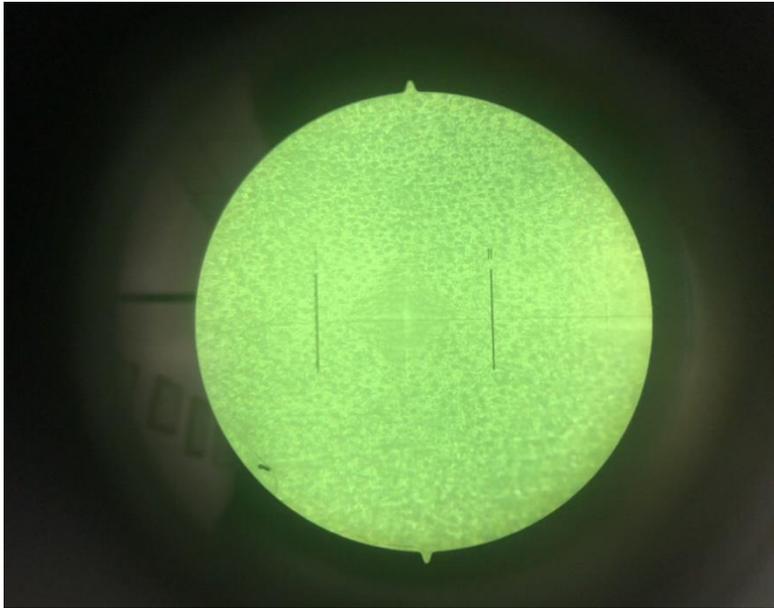
(7)



(8)



(9)



(10)

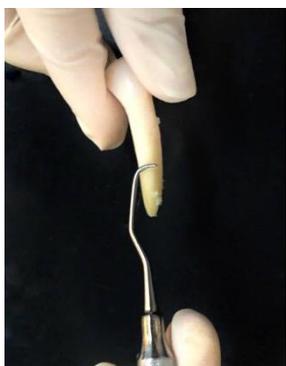
Figura (7) Fixação e polimento das amostras em blocos de resina acrílica; (8) Divisão das amostras em 5 grupos; (9) Avaliação da microdureza pelo microdurômetro Vickers (HMV-2000, Shimadzu, Kyoto, Japão); (10) Imagem das identificações nas amostras.

#### **4.3. Avaliação da ultraestrutura da dentina radicular**

Dez dentes incisivos bovinos extraídos foram utilizados para esta avaliação, obtidos de animais abatidos para fins comerciais. Logo após a extração, os dentes foram congelados até o momento do preparo das amostras, no intuito de preservar as propriedades dos mesmos. No referido dia, os

dentos foram descongelados em temperatura ambiente, realizando a limpeza da porção externa com auxílio de curetas periodontais (Golgran, São Caetano do Sul, SP, Brasil) (Figura 11). A porção coronária foi seccionada com disco diamantado de dupla face, acoplado a uma peça reta de baixa rotação, sob constante refrigeração, resultando em amostras radiculares de 15mm de comprimento (Figura 12).

Na sequência, foram confeccionados dois sulcos longitudinais nas faces vestibular e lingual, em toda a extensão do remanescente radicular, e dois sulcos circundantes à raiz, a 5 mm e a 10 mm do ápice, utilizando disco diamantado de dupla face (Figura 13). Após esta delimitação dos sulcos, as raízes foram irrigadas com água destilada, para remoção de raspas de dentina



(11)



(12)



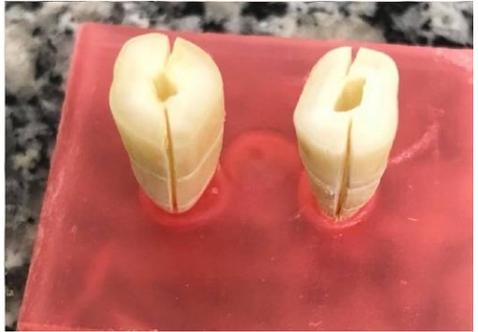
(13)

Figura (11) Limpeza dos dentes; (12) Seccionamento da coroa e remanescentes radiculares; (13) Confeção dos sulcos longitudinais e circundantes;

Todas as 10 raízes foram preparadas de forma similar, no intuito de remover o tecido pulpar e padronizar o diâmetro interno do canal radicular (Figura 14). O comprimento de trabalho foi estabelecido a partir da introdução de uma lima tipo-K #10 (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Suíça), no interior do canal radicular, até que sua ponta seja visualizada no forame apical. A partir desta medida, foi reduzido 1 mm, estabelecendo o comprimento de trabalho. O preparo foi realizado manualmente com limas tipo-K (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Suíça), por meio de instrumentação seriada, iniciando com uma lima #10 promovendo a ampliação do canal radicular até a lima #50, com movimentos

de alargamento e limagem (Figura 15). A substância química-auxiliar utilizada foi a água destilada, sendo realizada irrigação e renovação da mesma a cada troca de instrumento, com seringa descartável estéril e agulha Navi-Tip #30 (Ultradent, South Jordan, UT, Estados Unidos), e aspiração.

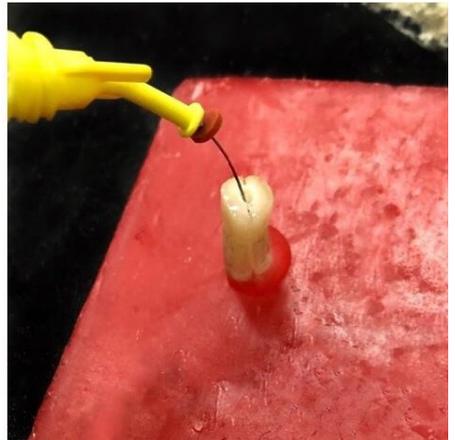
As 10 raízes foram divididas aleatoriamente em 5 grupos, de acordo com os irrigantes testados, conforme descrito nas avaliações anteriores, havendo duas raízes por grupo. Nos cinco grupos, os canais radiculares foram preenchidos até o extravasamento com o irrigante final testado, que permaneceu em contato com as paredes do canal radicular pelo período de 1 minuto. Para inserção dos irrigantes nos canais radiculares, foi utilizada seringa descartável estéril e agulha Navi-tip #30 (Ultradent, South Jordan, UT, Estados Unidos) (Figura 16). Após esse período, foi realizada irrigação com 5 ml de água destilada para remoção dos irrigantes finais testados. Por fim, os canais radiculares de todos os grupos foram secos com cânula de aspiração e cones de papel absorvente #50 (Tanari, Manacapuru, AM, Brasil) (Figura 17).



(14)



(15)



(16)



(17)

Figura (14) Raízes padronizadas; (15) Limagem e alargamento; (16) Inserção dos irrigantes nos canais radiculares; (17) Secagem final dos canais.

Após a conclusão dos protocolos de irrigação final, foi realizada para cada grupo a clivagem das raízes, iniciando pela clivagem do sulco vestibular ao lingual, obtendo duas metades de cada raiz (Figura 18). Posteriormente, foi feita a clivagem dos sulcos circundantes, obtendo-se duas amostras do terço cervical, médio e apical de cada raiz. As amostras dos terços cervical e apical foram descartadas, e as amostras do terço médio foram aproveitadas para a avaliação em microscopia eletrônica de transmissão (Figura 19), conforme

descrito por WAGNER *et al.*(2017), totalizando 4 amostras por grupo (n=4).



(18)



(19)

Figura (18) Clivagem do Sulco V ao L; (19) Amostra do Terço Médio.

As 4 amostras de cada grupo foram parcialmente descalcificadas a partir da imersão das mesmas em EDTA para descalcificação, pH 7,4 (Natupharma, Passo Fundo, RS, Brasil), em um volume 10x maior que as amostras. As amostras permaneceram em contato com o líquido descalcificante durante 40 dias, sendo renovado a cada 24 horas (Figura 20).



(20)

Figura (20) Descalcificação das amostras.

Após o processo de descalcificação, as amostras foram imersas em solução fixadora (Glutaraldeído 2,5%, Paraformaldeído 2%, Tampão fosfato 0,12 M, pH 7,2 – 7,4), passadas por três ciclos de lavagens de 30 minutos cada (Tampão fosfato 0,1 M), pós-fixadas (Tetróxido de Ósmio 2% e Tampão fosfato 0,2 M) e lavadas com mais três ciclos de lavagens igual o anterior. A desidratação ocorreu utilizando a sequência de Acetona P.a em 30% por 10 minutos, em 50% por 10 minutos, em 70% por 10 minutos, em 95% por 10 minutos e depois por 20 minutos, e, por fim, em 100% por 10 minutos e depois por 20 minutos. Seguindo, as amostras foram pré-embebidas (banhos com desidratante e com

proporções gradativas crescentes de resina por mínimo de 2 horas), e embebidas (banho de resina 100% durante 24 horas). Então, foram inclusas em moldes de silicone com resina pura e armazenadas em estufa com temperatura constante de 60°C por 72 horas (Figura 21).

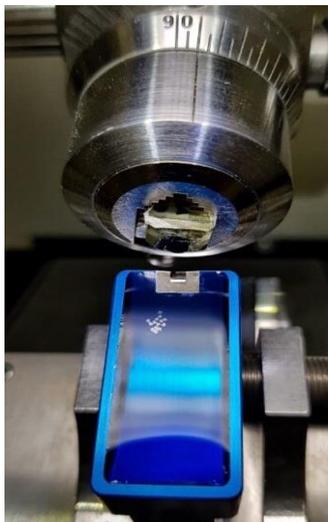


(21)

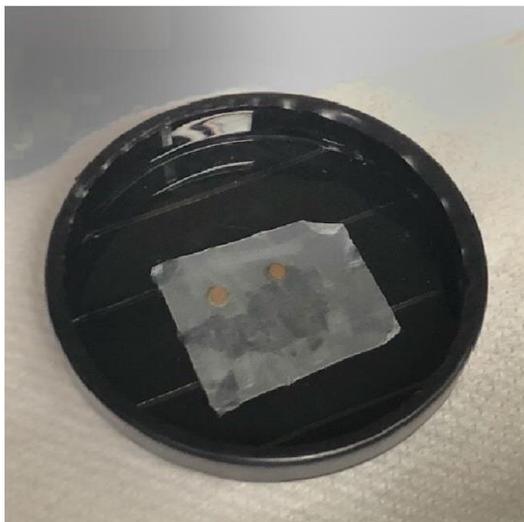
Figura (21) Amostras em molde com resina.

Após o período de armazenamento, foi realizada a ultramicrotomia das amostras em um micrótomo modelo EM U7 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) (Figura 22). Nesta etapa, secções de 100 nm de espessura foram confeccionadas na direção do longo eixo dos túbulos

dentinários, após, foram depositadas em grids (Figura 23) e inserido líquido de contraste Acetato de Uranila 2% e Citrato de Chumbo (Figura 24).



(22)



(23)



(24)

Figura (22) Cortes com Ultramicrotomo; (23) Amostras dispostas em grids; (24) Imersão em contraste.

Estas secções, obtidas das 4 amostras de terço médio de cada grupo, foram examinadas em microscópio eletrônico de transmissão, modelo TECNAI G2 T20 (FEI, Thermofisher Scientific, Hillsboro, Oregon, EUA), a 200 kV de potência (Figura 25).

Em cada grupo, foram captadas seis imagens das secções no aumento de 8.900x e seis imagens das secções no aumento de 39.000x de magnificação, totalizando 12 imagens por

grupo. A análise do colágeno, correspondente à ultraestrutura dentinária intrarradicular, considerou os seguintes status de classificação: intacto (INT), disperso (DIS) e alterado (ALT). Esta análise e atribuição de status foram realizadas por examinador sênior em ultraestrutura dentinária, estando este cegado quanto aos grupos de tratamento e previamente calibrado quanto à atribuição do status previamente descrito.



(25)

Figura (25) Análise das amostras no MET.

#### **4.4 Análise Estatística**

A análise estatística das avaliações de citotoxicidade e microdureza da dentina radicular foi realizada por meio de ANOVA, seguido por *post-hoc* de *Tukey*, com nível de significância estabelecido em 5%. Por se tratar de uma avaliação qualitativa, foi feito apenas uma análise descritiva das imagens obtidas de microscopia eletrônica de transmissão na avaliação da ultraestrutura dentinária. Os dados foram analisados utilizando o programa SPSS versão 17.0 (SPSS, Chicago, IL, Estados Unidos).

### **5. RESULTADOS**

A média e o desvio padrão do percentual da taxa de viabilidade celular, bem como da dos valores de microdureza dentinária, após o tratamento com os protocolos de irrigação final testados, estão expressos na Tabela 1. A maior taxa de viabilidade celular foi observada no grupo controle, sendo estatisticamente diferente aos demais grupos testados ( $p < 0,05$ ). O grupo EDTA 17% apresentou um maior percentual de viabilidade celular, sendo estatisticamente superior aos grupos QMix e Novo irrigante final ( $p < 0,05$ ), sem diferença estatisticamente significativa em relação ao GA

17% ( $p>0,05$ ). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos GA 17%, QMix e Novo irrigante final ( $p>0,05$ ). Por sua vez, os resultados de microdureza demonstraram que todos os irrigantes finais testados promoveram modificações da microdureza na dentina radicular, quando comparados ao grupo controle, sem diferença estatística entre eles ( $p<0,05$ ).

**Tabela 1.** Média  $\pm$  desvio padrão da taxa de viabilidade celular (%) e da microdureza dentinária após tratamento com os protocolos de irrigação final testados.

<b>Grupo</b>	<b>Viabilidade celular (%)</b>	<b>Microdureza</b>
<i>1. DW</i>	$98.09 \pm 4.91^a$	$29.42 \pm 2.38^a$
<i>2. EDTA</i>	$48.57 \pm 2.29^b$	$21.12 \pm 3.16^b$
<i>3. QMix</i>	$33.33 \pm 0.62^c$	$19.10 \pm 4.09^b$
<i>4. GA</i>	$38.57 \pm 2.88^{b,c}$	$21.89 \pm 1.37^b$
<i>5. Novo irrigante final</i>	$30.71 \pm 1.09^c$	$19.34 \pm 2.68^b$

Por fim, de acordo com a análise das imagens de MET, pode-se observar que a estrutura das amostras do grupo

controle encontrava-se INTACTA, em ambas magnificações. Ao mesmo tempo, a análise das imagens de MET revelaram que a estrutura das amostras de todos os grupos experimentais mostrou um colágeno DISPERSO, tanto na magnificação de 8.900x, quanto na magnificação de 39.000x. Além disso, pôde ser observado que não houve alteração estrutural do colágeno nos grupos experimentais, pois, mesmo na superfície da parede do canal, não foi encontrado afilamento proteico, nem áreas de perda de substância ou colapamento estrutural.

## 6. DISCUSSÃO

Os microorganismos correspondem aos principais agentes que dão origem às patologias de ordem pulpar e periapical (Kakehashi et al., 1965). Dessa forma, o preparo químico-mecânico, que alia o uso de substâncias químicas auxiliares e instrumentos endodônticos, é necessário para promover uma limpeza adequada, criando condições para permitir uma terapia endodôntica bem-sucedida (Bukhary et al., 2017). No entanto, durante o preparo químico e mecânico dos canais radiculares, ocorre a formação de uma camada denominada de *smear layer*, que é composta por raspas de dentina

oriundas da instrumentação, além de detritos orgânicos e remanescentes microbianos. Essa camada promove a obliteração dos túbulos dentinários, dificultando a penetração de agentes microbianos e cimentos obturadores endodônticos (Barcellos *et al.*, 2020). Como consequência, temos a redução da capacidade de descontaminação, bem como da adesão dos materiais obturadores nestas áreas, promovendo a redução da resistência de união do material obturador à dentina radicular (Shahravan *et al.*, 2007). Por essa razão, se torna imprescindível o uso de protocolos de irrigação final, no intuito de promover a remoção da *smear layer* (Baldasso *et al.*, 2017).

O EDTA é o irrigante final mais comumente utilizado na terapia endodôntica, apresentando capacidade de promover a remoção de *smear layer* (Ahir *et al.*, 2014). No entanto, possui algumas desvantagens, dentre as quais se incluem a citotoxicidade (Amaral *et al.*, 2007), uma limitada ação antimicrobiana contra o biofilme de *Enterococcus faecalis* (De Almeida *et al.*, 2016), uma reduzida ação de limpeza no terço apical de canais radiculares (Kuruvilla *et al.*, 2015), a redução da microdureza dentinária (Aslantas *et al.*, 2014) e a alteração do colágeno dentinário (Wagner *et al.*, 2016). O

QMix, por sua vez, é um irrigante final que apresenta na sua composição EDTA, clorexidina e um agente surfactante, sendo eficaz na remoção de smear layer, ao mesmo tempo em que possui uma excelente penetração na estrutura dentinária e contribui para a neutralização de microorganismos (Stojicic *et al.*, 2012; Elnaghy *et al.*, 2014). No entanto, o QMix apresenta na sua composição o EDTA, trazendo, em decorrência disso, os efeitos deletérios promovidos por esse componente, conforme descrito previamente. E, além disso, é um produto importado, trazendo um custo bastante elevado para a terapia endodôntica a ser realizada. Nesse sentido, o presente estudo traz uma nova proposição de irrigante final a ser testado.

A proposição do novo irrigante final testado no presente estudo, é apresentar uma substância química que promova, por meio da associação de três componentes, uma eficiente remoção da *smear layer*, aos mesmo tempo que contribua para o processo de descontaminação dos canais radiculares e não induza modificações profundas na estrutura da dentina radicular. Neste cenário, o novo irrigante é composto por ácido glicólico, clorexidina e agente surfactante. Estudos recentes demonstram que o ácido glicólico tem a capacidade

de promover a desmineralização do esmalte e da dentina (Cecchin *et al.*, 2018), uma efetiva remoção de *smear layer*, com menores valores de indução de citotoxicidade e sem comprometer de forma significativa a estrutura da dentina radicular (Dal Bello *et al.*, 2019; Dal Bello *et al.*, 2020). Por sua vez, a clorexidina tem atividade antimicrobiana de amplo espectro e substantividade (Ferraz *et al.*, 2001). Por fim o agente surfactante promove redução da tensão superficial, aumenta a molhabilidade, melhora eficácia de penetração nos túbulos dentinários e contribui para uma maior limpeza dos canais radiculares (Giardino *et al.*, 2006). A partir da união destes três componentes, temos a formulação de um novo irrigante final, com potencial para ser testado em diversas avaliações relacionadas diretamente ao tratamento endodôntico. Uma vez que diversas avaliações foram realizadas com esta substância em estudo prévio (Dias, 2020), o presente estudo retoma a continuidade das avaliações inicialmente propostas.

A principal função de um protocolo de irrigação final é promover de forma efetiva a remoção de *smear layer* das paredes do canal radicular (Ahir *et al.*, 2014). De acordo com estudo prévio de Yamada *et al.*, em 1983, os protocolos de

irrigação final removeram de forma efetiva a *smear layer* após 1 minuto de ação no interior do canal radicular. No mesmo estudo, não foram observadas melhorias nos resultados de remoção de *smear layer* com o aumento do tempo de permanência dos protocolos de irrigação final no interior do canal radicular. Resultados similares foram encontrados por Kuruvilla *et al.*, em 2015, onde a aplicação de EDTA 17% por 1 minuto foi eficiente para promover a remoção efetiva de *smear layer* do interior dos canais radiculares. Além disso, o uso de agentes quelantes por tempo excessivo no interior dos canais radiculares pode ocasionar erosão dentinária, bem como danos às propriedades mecânicas da dentina radicular (Çalt & Serper, 2002). Por essas razões, o tempo de ação dos irrigantes finais, no interior dos canais radiculares, foi estabelecido em 1 minuto no presente estudo.

O estudo da citotoxicidade de um irrigante final utilizado em endodontia se faz necessário, tanto para habilitar o uso clínico de novas substâncias, quanto para determinar quais são os riscos decorrentes do uso inadequado de um produto com potencial citotóxico. Durante o preparo do canal radicular, a extrusão não intencional de resíduos e irrigantes

para a área periapical pode ocorrer e causar reações temporais. Tais reações podem promover alterações vasculares, com ativação de células inflamatórias, tais como neutrófilos e macrófagos, produção de mediadores químicos e redução no reparo celular. Assim, os agentes químicos empregados devem ser biologicamente compatíveis, principalmente quando em contato com a região periapical. (Amaral *et al.*, 2007).

O ensaio MTT com células de fibroblastos L929 é um dos métodos mais utilizados na literatura para avaliar a citotoxicidade de um material, incluindo soluções irrigantes (Amaral *et al.*, 2007; Prado *et al.*, 2015; Chávez-Andrade *et al.*, 2017; Teixeira *et al.*, 2018). Este método avalia a citotoxicidade de materiais dentários com base nas mudanças no número de células viáveis, metabolismo celular e morfologia celular. É um método simples e reproduzível, e não requer radioisótopos (Mollashahi *et al.*, 2016). Embora os ensaios tenham sido realizados em triplicata e as porcentagens de viabilidade celular terem sido calculadas em relação aos controles celulares, somente o ensaio de MTT, segundo a literatura, é limitado para uma confiabilidade dos resultados. Diante disso, ressalta-se a importância de outros ensaios

comitentes a esse, como o vermelho neutro e fluorescência do citoesqueleto (Andolfatto *et al.*, 2017). Outro fator a ser considerado é que a avaliação da citotoxicidade de materiais, *in vitro*, é completamente celular. As células cultivadas em comparação com os tecidos periapicais são altamente suscetíveis aos efeitos tóxicos das drogas. Sob condições *in vivo*, os materiais são diluídos com fluidos corporais e sua concentração diminui. Além disso, eles são eliminados pela função dos sistemas vascular e linfático. Assim, em concentrações iguais, a citotoxicidade dos materiais diminui ao longo do tempo no ambiente clínico em comparação com o ambiente *in vitro* (Mollashahi *et al.*, 2016), o que torna os resultados generalizados e aproximados quando comparados *in vivo*.

Os irrigantes finais utilizados em endodontia devem ser biologicamente compatíveis, especialmente quando em contato com a região periapical. De acordo com estudos prévios, o EDTA demonstra potencial citotóxico quando utilizado nas formulações e concentrações preconizadas para a endodontia (Amaral *et al.*, 2007; Prado *et al.*, 2015; Chávez-Andrade *et al.*, 2017; Teixeira *et al.*, 2018). Apesar de apresentar um maior percentual de viabilidade celular quando

comparado aos demais grupos no presente estudo, pode-se afirmar que a solução de EDTA 17% demonstrou potencial citotóxico, considerando o fato de que uma redução de 50 a 70% da viabilidade celular é um indicativo para revelar citotoxicidade (Amaral *et al.*, 2007). O GA, por sua vez, também induziu redução significativa da viabilidade celular no presente estudo, corroborando com os estudos de Dal Bello *et al.*, em 2019, onde foram demonstrados resultados elevados de citotoxicidade para o GA em menores diluições. A presença do EDTA e do GA na composição do QMix e do Novo Irrigante Final, respectivamente, podem ajudar a explicar os reduzidos percentuais de viabilidade celular nestes grupos. Além disso, a clorexidina também pode apresentar potencial citotóxico, reduzindo a viabilidade de células fibroblásticas e induzindo migração celular (Coaguila-Lierena *et al.*, 2019). Uma vez que a clorexidina também está presente na composição de ambos irrigantes finais, QMix e Novo Irrigante Final, este fator pode auxiliar na explicação dos resultados de citotoxicidade obtidos nestes grupos, sendo similares entre si.

Os dispositivos utilizados para mensurar a microdureza da dentina radicular são denominados de microdurômetros,

sendo que os modelos Knoop e Vickers correspondem aos mais amplamente utilizados nos estudos da área da Endodontia. Ambos os métodos são considerados adequados para avaliar esta propriedade mecânica. O método de indentação Vickers permite ampla faixa de medição, sendo sensível às condições da superfície e mais sensível a erros de medição quando cargas iguais são aplicadas (Cruz-Filho *et al.*, 2011). Por esses aspectos positivos, o método Vickers foi utilizado no presente estudo. Além disso, a microdureza dentinária está relacionada à localização das indentações e seu valor reduz na região próxima ao tecido pulpar (Pashley *et al.*, 1985). Portanto, os indentações foram realizados ao longo de linhas paralelas à borda da luz do canal radicular. Desse modo, se consegue fazer uma avaliação efetiva da microdureza da dentina radicular (Cruz-Filho *et al.*, 2011), após a utilização dos protocolos de irrigação final testados.

De acordo com os resultados do presente estudo, todos os protocolos de irrigação final testados, inclusive do Novo Irrigante Final, induziram modificações na microdureza da dentina radicular, sendo diferentes do grupo controle e similares entre si. Resultados similares foram encontrados por Baldasso *et al.*, em 2017, revelando redução significativa da

microdureza da dentina radicular após a utilização de EDTA 17% e QMix como irrigantes finais. Da mesma forma, resultados similares foram encontrados por Dal Bello *et al.*, em 2019, onde o GA 17% reduziu de forma significativa a microdureza da dentina radicular quando comparado ao grupo controle. Tais achados podem ser explicados pelo pH ácido dos agentes quelantes utilizados no presente estudo, sejam utilizados de forma isolada ou na composição do QMix e do Novo Irrigante final, o que contribui para a descalcificação da dentina radicular (Eldeniz *et al.*, 2005).

Apesar de haver diferença estatística, os valores de microdureza dos grupos experimentais não demonstram grande distância em relação aos valores do grupo controle, levando a crer que a redução da microdureza é superficial. Neste cenário, a redução superficial da microdureza pode facilitar o acesso e a ação dos instrumentos endodônticos em canais radiculares estreitos e calcificados, bem como a penetração de agentes antimicrobianos (Hulsmann *et al.*, 1997). Por outro lado, a redução mais profunda da microdureza da dentina radicular pode ser desfavorável, pois pode induzir à redução do módulo de elasticidade da dentina radicular e da resistência à flexão, comprometendo a

resistência à fratura do dente (Pashley *et al.*, 1985), o que não é desejável ao dente tratado endodonticamente.

O colágeno é o principal componente orgânico da dentina e tem a função de atuar como matriz para depósito de cristais de hidroxiapatita, desempenhando a função de ligação entre sistemas adesivos e dentina. Porém, há um déficit de informações na literatura a respeito de alterações na ultraestrutura da dentina radicular a partir do uso de diferentes irrigantes finais utilizados na endodontia. Nesse sentido, após o preparo químico-mecânico, é ideal utilizarmos protocolos de irrigação final que não interfiram negativamente na união do material obturador com o substrato dentário, uma vez que adesão depende da qualidade do substrato dentinário e integridade do mesmo, no intuito fornecer longevidade ao procedimento restaurador (Moreira *et al.*, 2009).

No presente estudo, a microscopia eletrônica de transmissão foi o método de escolha, com base em estudo prévio de Wagner *et al.*, em 2017, que utilizaram este tipo de microscopia para realizar uma análise descritiva das imagens adquiridas, mostrando modificações na ultraestrutura orgânica da dentina. A microscopia eletrônica de transmissão é uma ferramenta de suma importância em estudos que

buscam avaliar a morfologia e componentes estruturais da dentina radicular, de forma qualitativa e quantitativa (Wagner *et al.*, 2017). Após a captação das imagens no microscópio, o avaliador previamente calibrado, que estava cegado quanto aos grupos de tratamento, analisou e descreveu as imagens, fornecendo os resultados das alterações dentinárias que os grupos promoveram.

Os resultados do presente estudo demonstram a ação dos protocolos de irrigação final testados sobre o padrão normal da dentina radicular. Mesmo que não tenha havido alteração estrutural significativa do colágeno, é possível observar nas imagens adquiridas que a superfície dentinária fora afetada no processo de união entre as pontes de colágeno de forma superficial. Do ponto de vista clínico, isso pode ser considerado benéfico. A separação das ligações entre colágeno, caracterizada por dispersão, permite uma maior penetração das substâncias químicas auxiliares do preparo, sendo mais efetiva sua ação desinfetante. Além disso, serve para receber maior quantidade de cimento endodôntico, o que pode aumentar o embricamento mecânico do material obturador com a dentina radicular. Como esse efeito é

somente na superfície da dentina radicular, não promove alteração da resistência deste tecido (Wagner *et al.*, 2017).

O Novo Irrigante Final, testado no presente estudo, apresentou citotoxicidade similar ao QMix e GA, bem como induziu modificação superficial na microdureza da dentina radicular, com resultados similares aos irrigantes finais convencionalmente utilizados. Além disso, não promoveu alteração significativa da ultraestrutura da dentina radicular, induzindo, apenas, alterações superficiais no colágeno e substrato dentinário. De acordo com os resultados de estudo prévio de Dias, em 2020, o Novo Irrigante Final demonstrou significativo potencial antimicrobiano, sendo este superior ao EDTA 17% e GA, demonstrou capacidade de promover a *smear layer* nos três terços do canal radicular, bem como aumentou a resistência de união do material obturador/restaurador à dentina radicular. Além disso, o custo para obtenção do Novo Irrigante Final é extremamente baixo, quando comparado à obtenção do irrigante final QMix. A partir do exposto, estudos futuros são necessários para avaliação de efetivos resultados relacionados ao uso do Novo Irrigante Final, no intuito de consolidar esse protocolo como uma alternativa a ser utilizada na terapia endodôntica.

## **7. CONCLUSÕES**

Diante das limitações do presente estudo, pode-se concluir que o Novo Irrigante Final apresenta citotoxicidade similar aos irrigantes finais convencionalmente utilizados e induz modificações superficiais na microdureza e ultraestrutura da dentina radicular, podendo ser obtido a um custo significativamente mais baixo

## 8. REFERÊNCIAS

AHIR, B; PAREKH, V; KATYAYAN, MK; KATYAYAN, PA. Smear layer removal efficacy of different irrigating solutions: a comparative scanning electron microscope evaluation. *Indian Journal of Dentistry Research*. v.25, n.5, p.617-22, 2014.

ALKAHTANI, A.; ALKAHTANY, A.; MAHMOOD, A; ELSAFADI, M.; ALDAHMAH, A.; ANIL, S. Cytotoxicity of Qmix endodontic irrigating solution on human bone marrow mesenchymal stem cells. *BMC Oral Health*, v.14, n.27, p. 14- 27, 2014.

AMARAL, K.; ROGERO, M.; FOCK, R.; BORELLI, P.; GAVINI, G. Cytotoxicity analysis of EDTA and citric acid applied on murine resident macrophages culture. *International Endodontic Journal*, v.40, n.5, p. 338-343, 2007.

ANDOLFATTO, C.; BONETTI-FILHO, I.; CARLOS, I.Z.; TONOMARU, J.M.G.; KUGA, M.K.; TORMIN, F.B.C.; FARIA, G.; Cytocompatibility, physical properties, and antibiofilm activity of endodontic sealers with amoxicillin. *Microsc Res Tech*, v. 80, n. 9, p. 1036-1048, 2017.

ASHOFTEH, K.; SABETI, M.; MOTAHHARY, P.; KOLAHDOUZAN, A.; SHAYESTEHE, M.; SHOKOUHINEJAD, N. Subcutaneous tissue responses to three endodontic irrigants: a comparative study. *Iranian Endodontic Journal*, v.7, n.3, p. 144-148, 2012

ASLANTAS, E.E.; BUZOGLU, H.D.; ALTUNDASAR, E.; SERPER, A. Effect of EDTA, sodium hypochlorite, and chlorhexidine gluconate with or without surface modifiers on dentin microhardness. *Journal Endodontics*. v. 40, n. 6, p. 876-879, 2014.

BALDASSO, F.; ROLETO, L.; SILVA, V.; MORGENTAL, R.; KOPPER, P. Effect of final irrigation protocols on microhardness reduction and erosion of root canal dentin. *Brazilian Oral Research*, v. 31, n.40, p.1-8, 2017a.

BALDASSO, F.E.R.; CARDOSO, L.R.; SILVA, V.D.D.; MORGENTAL, R.D.; KOPPER, P.M.P. Evaluation of the effect of four final irrigation protocols on root canal dentin components by polarized light microscopy and scanning electron microscopy. *Microscopy Research Technique*, v. 80, n. 12, p. 1337-1343, 2017b.

BALLAL, N.; MALA, K.; BATH, K. Evaluation of the effect of maleic acid and ethylenediaminetetraacetic acid on the microhardness and surface roughness of human root canal dentin. *Journal of endodontics*, v.36, n.8, p.1385-1388, 2010.

BARCELLOS, D.P.D.; FARINA, A.P.; BARCELLOS, R.; SOUZA, M.A.; BORBA, M.; PIMENTA, A.K.B.; BELLO, Y.D.; VIDAL, C.M.; CECCHIN, D.; Effect of a new irrigant solution containing glycolic acid on smear layer removal and chemical/mechanical properties of dentin. *Scient Rep*, v.10, n.1, p. 7313, 2020.

BELLO, Y.D.; FARINA, A.P.; SOUZA, M.A.; CECCHIN, D. Glycolic acid: Characterization of a new final irrigant and effects on flexural strength and structural integrity of dentin. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, 2020 [in press].

BELLO, Y.D.; PORSCH, H.F.; FARINA, A.P.; SOUZA, M.A.; SILVA, E.J.N.L.; BEDRAN-RUSSO, A.K.; CECCHIN, D. Glycolic acid as the final irrigant in endodontics: Mechanical and cytotoxic effects. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, v.100, n.1, p. 323-329, 2019.

BUKHARY, S.; BALTO, H. Antibacterial efficacy of octenisept, alexidine, chlorhexidine, and sodium hypochlorite against *Enterococcus faecalis* biofilms. *J Endod*, v. 43, n. 4, p. 643-647, 2017.

CALT, S.; SERPER, A. Time-dependent effects of EDTA on dentin structures. *J Endod* 2002;28:17-19.

CECCHIN, D.; FARINA, A.P.; VIDAL, C.; BEDRAN-RUSSO, A.K. A Novel Enamel and Dentin Etching Protocol Using  $\alpha$ -hydroxy Glycolic Acid: Surface Property, Etching Pattern, and Bond Strength Studies. *Operative Dentistry*, v.43, n.1, p.101-110, 2018.

CHÁVEZ ANDRADRE, GM.; TONOMARU-FILHO, M.; RODRIGUES, E.M.; CORMÉLIO, A.L.G.; FARIA, G.; BERNARDI, M.I.; TONOMARU, J.M.G.; Cytotoxicity, genotoxicity and antibacterial activity of poly(vinyl alcohol)-coated silver nanoparticles and farnesol as irrigating solutions. *Art Oral Bio*. v. 84. p. 89-93, 2017.

COAGUILA-LIERENA, H.; RODRIGUES, E.M.; TANOMARU-FILHO, M.; GUERREIRO-TANOMARU, J.M.; FARIA, G. Effects of calcium hypochlorite and octenidine hydrochloride on L929 and human periodontal ligament cells. *Braz Dent J*. v. 30, p. 213-219, 2019.

CRUZ-FILHO A. M.; SOUSA-NETO, M. D.; SAVIOLI, R. N.; SILVA, R. G.; VANSAN, L. P.; PÉCORÁ, J. D. Effect of chelating solutions on the microhardness of root canal lumen dentin. *Journal of Endodontics*, v. 37, p. 358-362, 2011.

DAL BELLO, Y.; FARINA, AP.; SOUZA, MA.; CECCHIN, D. Glycolic acid: characterization of a new final irrigant and effects on flexural strength and structural integrity of dentin. *Materials Science And Engineering: C*, v. 106, p. 110283-110289, jan. 2020.

DALBELLO, Y.; PORSCH, H.F.; FARINA, A.P.; SOUZA, M.A.; SILVA, E.J.N.L.; BEDRAN RUSSO, A.K.; CECCHIN, D. Glycolic acid as the final irrigant in endodontics: Mechanical and cytotoxic effects. *Mater Sci Eng*, v. 100, n. , p.323-29, 2019.

DE ALMEIDA, J.; HOOGENKAMP, M.; FELIPPE, W.T.; CRIELAARD, W.; VAN DER WAAL, S.V. Effectiveness of EDTA and Modified Salt Solution to Detach and Kill Cells from *Enterococcus faecalis* Biofilm. *Journal Endodontic*, v.42, n.2, p.320-323, 2016.

DE-DEUS, G.; PACIORNIK, S.; MAURICIO, M. Evaluation of the effect of EDTA, EDTAC and citric acid on the microhardness of root dentine. *Internacional endodontic journal*, n.39, v. 5, p. 401-407, 2006.

DIAS, C.T. *Avaliação de um novo irrigante final experimental em diferentes propriedades da terapia endodôntica – estudo in vitro*. 2020. 70f. Tese (Doutorado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia da Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS, Brasil.

DINESHKUMAR, M.; VINOCHKUMAR, T.; ARATHI, G.; SHANTHISREE, P.; KANDASWAMY, D. Effect of ethylene diamine tetra-acetic acid, MTAD™, and HEBP as a final rinse on the microhardness of root dentin. *Journal of conservative dentistry*, v.15, n.2, p.170-173, 2012.

ELDENIZ, A.; ERDEMIR, A.; BELLI, S. Effect of EDTA and citric acid solutions on the microhardness and the roughness of human root canal dentin. *Journal of endodontics*, v.31, n.2, p. 107-110, 2005.

ELNAGHY , AM. Influence of QMix irrigant on the micropush-out bond strength of biodentine and white mineral trioxide aggregate. *J Adhes Dent*, v.16, n.3, p.277-283, 2014.

FARHAD,M.N.; SABERI, E., KARKEHABADI,H. Evaluation of Cytotoxic Effects of Various Endodontic Irrigation Solutions on the Survival of Stem Cell of Human Apical Papilla. *Iran Endodontic Journal*, v.11, n.4, p.293-297,2016.

FERRAZ, C.C.; GOMES, B.P.; ZAIA, A.A.; TEIXEIRA, F.B.; SOUZA-FILHO, F.J. In vitro assessment of the antimicrobial action and the mechanical ability of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant. *J Endod*, v. 27, p. 452-5, 2001.

GHISI, A.C.; KOPPER, P.M.; BALDASSO, F.E.; STURMER, C.P.; ROSSI-FEDELE, G.; STEIER, L.; et al. Effect of superoxidized water and sodium hypochlorite, associated or not with EDTA, on organic and inorganic components of bovine root dentin. *J Endod*, v. 4, p. 925-30, 2015.

GIARDINO, L.; AMBU, E.; BECCE, C.; RIMONDINI, L.; MORRA, M. Surface tension comparison of four common root canal irrigants and two new irrigants containing antibiotic. *J Endod*, v.32, p. 1091-3, 2006.

HAAPASALO, M.; SHEN, Y.; QIAN, W.; GAO, Y. Irrigation in endodontics. *Dent Clin North Am*, v. 54, n. 2, p. 291-312, 2010.

HULSMANN, M.; RUMMELIN, C.; SCHAFERS F. Root canal cleanliness after preparation with different endodontic handpieces and hand instruments: a comparative SEM investigation, *J. Endod.* v.23, p. 301–306, 1997.

KAKEHASHI, S.; STANLEY, H.R.; FITZGERALD, R.J.  
The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, v. 20, n. 3, p. 340-349, 1965.

KOULAOUZIDOU, E.; MARGELOS, J.; BELTES, P.; KORTSARIS, A. Cytotoxic Effects of Different Concentrations of Neutral and Alkaline EDTA Solutions Used as Root Canal Irrigants. *Journal of Endodontics*, v.25, n. 1, p. 21-23, 1999.

KURUVILLA, A; JAGANATH, BM; KRISHNEGOWDA, SC; RAMACHANDRA, PK; JOHNS, DA; ABRAHAM, A. A comparative evaluation of smear layer removal by using EDTA, etidronic acid, and maleic acid as root canal irrigants: An in vitro scanning electron microscopic study. *Journal of Conservative Dentistry*, v.18, n.3, p.247-51, 2015.

MANCINI, M.; ARMELLIN, E.; CASAGLIA, A.; CERRONI, L.; CIANCONI, L. A comparative study of smear layer removal and erosion in apical intraradicular dentine with three irrigating solutions: a scanning electron microscopy evaluation. *Journal of Endodontics*, v. 35, n. 1, p. 900–903, 2009.

MARINS, J. S. R., SASSONE, L. M., FIDEL S. R., & RIBEIRO, D. A. In vitro genotoxicity and cytotoxicity in murine fibroblasts exposed to EDTA, NaOCL, MTAD and citric acid. *Brazilian Dental Journal*, v.23, n.5, p.527–533, 2012.

MOLLASHAHI, N.F.; SABERI, E.; KARKEHABADI, H.; Evaluation of Cytotoxic Effects of Various Endodontic Irrigation Solutions on the Survival of Stem Cell of Human Apical Papilla. *Irâ Endod J.* v. 11, n. 4, p.293-297. 2016.

MOREIRA, D.M.; ALMEIDA, J.F.; FERRAZ, C.C.; GOMES, B.P.; LINE, S.R.; ZAIA, A.A. Structural analysis of bovine root dentin after use of different endodontics auxiliary chemical substances. *J Endod*, v.35, n.7, p.1023-1027, 2009.

PASHLEY, D.; OKABE, A.; PARHAM, P. The relationship between dentin microhardness and tubule density. *Endod Dent Traumatol*. v.1, p. 176-179, 1985.

PRADO, M.; SILVA, E.J.; DUQUE, T.M.; ZAIA, A.A.; FERRAZ, C.C.; ALMEIDA, J.F.; GOMES, B.P.; Antimicrobial and cytotoxic effects of phosphoric acid solution compared to other root canal irrigants. *J Appl Oral Sci*. v.23, n.2, p 158-163, 2015.

SHAHRAVAN, A; HAGHDOOST, AA; ADL A. Effect of smear layer on sealing ability of canal obturation: a systematic review and meta-analysis. *Journal Endodontic*, v. 33, p. 96–105, 2007.

SILLANPÄÄ M. Environmental fate of EDTA and DTPA. *Rev Environ Contam Toxicol*, v. 152, p. 152-185, 1997.

STOJICIC, S; SHEN, Y; QIAN, W; JOHNSON, B; HAAPASALO, M. Antibacterial and smear layer removal ability of a novel irrigant QMiX. *International Endodontic Journal*, v.45, n 4, p.363-71, 2012.

TEIXEIRA, P.A.; COELHO, M;S.; KATO, A.S.; FONTANA, C.E.; PEDRO-ROCHA, D.G.; Citotoxicity assessment of 1% peracetic acid, 2,5% sodium hypochlorite and 17% EDTA on FG11 and FG15 human fibroblasts. *Acta Odontol Latinoam*. v.31, n.1, p 11-15, 2018.

TORABINEJAD, M; HANDYSIDES, R; KHADEMI, AA; et al. Clinical implications of the smear layer in endodontics: a review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Rad and Endod*, v.94, p.658-666, 2002.

TUNCER, K.; TUNCER, S.; SISO, S. Effect of QMix irrigant on the microhardness of root canal dentine. *Australian dental journal*, v.60, n.2, p.163-168, 2015.

VOUZARA, T., KOULAOUZIDOU, E., ZIOUTI, F., ECONOMIDES, N. Combined and independent cytotoxicity of sodium hypochlorite, ethylenediaminetetraacetic acid and chlorhexidine. *International Endodontic Journal*, v.49,n.8,p. 764–773, 2016.

WAGNER, M. H.; DA ROSA, R. A.; DE FIGUEIREDO, J. A.; DUARTE, M. A.; PEREIRA, J. R.; SÓ, M. V. Final irrigation protocols may affect intraradicular dentin ultrastructure. *Clin Oral Investig*, v. 21, n. 7, p.2173, 2016.

WAGNER, M.H.; DA ROSA, R.A.; DE FIGUEIREDO, J.A.; DUARTE, M.A.; PEREIRA, J.R.; SÓ, M.V.; Final irrigation protocols may affect intraradicular dentin ultrastructure. *Clin Oral Investig*. v.21, n.7, p.2173-2182, 2017.

YAMADA, R.S.; ARMAS, A.; GOLDMAN, M.; LIN, P.S. A scanning electron microscopic comparison of a high volume final flush with several irrigating solutions: Part 3. *J Endod* 1983;9:137– 142.