

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
NÍVEL: DOUTORADO
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: ENDODONTIA

**EFEITO DO HIPOCLORITO DE SÓDIO, EDTA E STERILOX® NA
MICRODUREZA E NA ESTRUTURA DENTINÁRIA DO CANAL RADICULAR.**

Alexandre Corrêa Ghisi

Porto Alegre
2014

Alexandre Corrêa Ghisi

**EFEITO DO HIPOCLORITO DE SÓDIO, EDTA E STERILOX® NA
MICRODUREZA E NA ESTRUTURA DENTINÁRIA DO CANAL RADICULAR.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, como requisito para obtenção do título de Doutor em Odontologia, na área de concentração de Endodontia.

Orientadora: Profa. Dr. Fabiana Vieira Vier Pelisser

Co-orientadora: Profa. Dr. Patrícia Maria Poli Kopper Móra

Porto Alegre

2014

“Dedico esta tese aos meus pais, Ione e Jaime, à minha mulher Lísia e ao meu filho Rafael que representam a razão e o sentido para minha vida” .

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pois acima de tudo me proporcionou a vida, rodeado de pessoas amadas sem as quais eu não estaria aqui.

Aos meus pais, Ione e Jaime, os responsáveis pela minha história. Motivo de admiração e orgulho para mim. Vocês me deram tudo: amor, valores, educação, apoio infinito. Sem vocês nunca realizaria meus sonhos.

À minha mulher Lísia, minha companheira de todos os momentos, otimista e incentivadora. Agradeço o amor, carinho e compreensão. E por, algumas vezes, ter desempenhado o papel de examinadora.

Ao meu filho Rafael, meu parceirinho amado. Obrigado pelos seus sorrisos, seus abraços. Por entender que “papai” precisava trabalhar e pelas palavras de incentivo: “Papai! Está quase terminando teu trabalho!”

Às minhas orientadoras, Profa. Dr. Fabiana Vieira Vier Pelisser e Patrícia Maria Poli Kopper Móra pela dedicação, paciência e persistência dispensadas a mim durante todos esses anos. Obrigado também pela amizade e todos os ensinamentos proporcionados.

Ao Prof. Dr. José Antonio Poli de Figueiredo, um amigo motivador, exemplo de dedicação à Endodontia. Obrigado por proporcionar esse momento.

À amiga e colega de curso Renata Dornelles Morgental pelo incentivo e inestimável ajuda na execução deste trabalho.

Às colegas Flávia Baldasso e Caroline Stürmer pela grande contribuição para este trabalho.

À amiga e colega de muitos anos, Profa. Maristela, que me incentivou a encarar o desafio do doutorado. Obrigado pelo apoio nos momentos difíceis e por estar presente até o fim dessa jornada.

Às demais colegas de disciplina, Profa. Nicole, examinadora também deste trabalho e Profa. Roberta, pela parceria de todos os dias e compreensão.

À Profa. Dr. Simone Luisi pela amizade conquistada durante anos de convivência na PUCRS e por sua contribuição como examinadora deste trabalho.

À Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), minha segunda casa, e a todos funcionários e professores que fazem parte dessa grande instituição de ensino.

Aos colegas do curso de Pós Graduação em Odontologia pela convivência agradável e ajuda para realizar as tarefas do curso.

Ao colega e amigo Dr. Giampiero Rossi-Fedele pela contribuição para este trabalho.

Agradeço também aos meus irmãos pela torcida.

A todos vocês, meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

RESUMO.....	07
ABSTRACT.....	09
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	11
1 INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Dentina.....	14
1.2 Hipoclorito de Sódio e EDTA.....	16
1.3 Sterilox®.....	21
2 OBJETIVOS.....	25
2.1 Geral.....	25
2.2 Específicos.....	25
3 CAPÍTULO I.....	26
4 CAPÍTULO II.....	42
5 DISCUSSÃO.....	61
6 REFERÊNCIAS.....	67
ANEXOS.....	74

RESUMO

O presente estudo objetivou avaliar a influência das soluções irrigadoras NaOCl 2% e 5%, Sterilox[®] 400 ppm e EDTA a 17% na microdureza e na estrutura dentinária do canal radicular. Para tanto, 80 raízes de incisivos bovinos foram divididas aleatoriamente em 8 grupos (n=10): NaOCl 2%; NaOCl 5%; Sterilox[®] 400 ppm, associados (NaOCl2+E, NaOCl5+E, Sx+E) ou não (NaOCl2, NaOCl5, Sx) ao EDTA 17% (5 min de irrigação final); EDTA 17% (E); e água destilada (H₂O) – controle negativo. O preparo químico mecânico dos canais radiculares (30 min), utilizando uma das soluções irrigadoras testadas, foi realizado pela técnica clássica. A seguir as amostras foram seccionadas perpendicularmente ao longo eixo na porção mais coronal, a fim de serem obtidos um segmento radicular cervical (5 mm) e um apical (15 mm). A tese foi então dividida em dois capítulos. No primeiro, os segmentos cervicais foram submetidos ao Teste de Microdureza Vickers, em dois pontos, um em aproximadamente 500-1000 µm a partir da luz do canal (distância 1), e o outro, em aproximadamente 500-1000 µm a partir da superfície externa do dente (distância 2). O teste de Wilcoxon comparou as distâncias 1 e 2 em cada grupo, e o Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn, compararam os grupos entre si. O nível de significância considerado foi de 5%. Os resultados mostraram valores de microdureza na distância 1 significativamente menores do que os valores da distância 2, exceto para os grupos NaOCl5 e NaOCl5+E (P>0.05). O EDTA demonstrou os menores valores de microdureza, sendo significativamente diferente apenas em relação ao Sx na distância 2. Concluiu-se que todas as soluções testadas mostraram menores valores de microdureza próximos à luz do canal em comparação com os encontrados próximos à superfície externa radicular, sendo que o EDTA promoveu uma maior redução desta em comparação com o Sterilox[®] próximo à superfície externa da raiz. No segundo capítulo, os segmentos apicais foram seccionados longitudinalmente em duas hemirraízes, sendo uma preparada para o estudo da estrutura do colágeno, em microscopia óptica (MO), e a outra para a análise da topografia do componente inorgânico da dentina, em microscopia eletrônica de varredura (MEV). As lâminas coradas com Picrossírius foram analisadas e classificadas

em 4 escores de acordo com o padrão de orientação das fibras colágenas próximas à luz do canal e com a regularidade do contorno perimetral do canal. As imagens em MEV dos túbulos dentinários cervicais próximos à luz do canal radicular foram analisadas descritivamente com relação ao paralelismo entre os túbulos dentinários, a existência de obliteração na sua entrada e presença de áreas de erosão. Os dados da análise histológica foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis seguido pelo Teste de Comparações Múltiplas ao nível de significância de 5%. Os resultados mostraram que quanto maior a concentração do NaOCl testado, maior foi seu efeito em profundidade na camada orgânica da dentina (colágeno). Foi possível concluir que o NaOCl 5%, associado ou não ao EDTA 17% e o NaOCl 2% + EDTA causaram a maior alteração na matriz orgânica de colágeno. O NaOCl 2% teve comportamento semelhante à solução de Sterilox[®], associada ou não ao EDTA, promovendo desorganização mais superficial do colágeno e em uma área menor. Em relação à alteração do componente inorgânico da dentina, em todos os grupos em que o EDTA foi empregado observaram-se áreas de desmineralização. No entanto, áreas de erosão e túbulos abertos somente foram observados quando este foi associado ao NaOCl. É possível concluir que NaOCl 5%, quando associado ou não ao EDTA 17%, provocou expressivo dano ao colágeno da dentina. As imagens obtidas em MEV revelaram desmineralização em todos os grupos em que o EDTA foi utilizado, no entanto áreas de erosão e túbulos abertos foram verificados somente quando este foi associado ao NaOCl.

Palavras-chave: microdureza, colágeno, componente inorgânico, dentina, irrigantes, hipoclorito de sódio, água superoxidada, EDTA.

ABSTRACT

The present study aimed to evaluate the influence of the following irrigating solutions on dentin microhardness and structure of the root canal: 2% and 5% NaOCl, 400 ppm Sterilox[®] and 17% EDTA. Therefore, 80 roots from bovine incisors were randomly divided into 8 groups (n=10): 2% NaOCl, 5% NaOCl, 400 ppm Sterilox[®], associated (2NaOCl+E, 5NaOCl+E, Sx+E) or not (2NaOCl, 5NaOCl, Sx) with 17% EDTA (final irrigation for 5 min), 17% EDTA (E), and distilled water (H₂O) - negative control. Chemomechanical preparation of the root canals (30 min), using one of the irrigating solutions tested, was performed by the classical technique. All samples were then sectioned perpendicularly to the long axis at the coronal portion in order to obtain a coronal (5 mm) and an apical root segment (15 mm). The thesis was divided into two chapters. First, coronal segments were submitted to Vickers Microhardness Test at two points, one at about 500-1000 μ m from the root canal lumen (distance 1) and the other at about 500-1000 μ m from the external root surface (distance 2). Wilcoxon test was applied to compare distances 1 and 2 in each group, and Kruskal-Wallis test, followed by Dunn test, compared the groups to each other. The significance level was set at 5%. Results showed microhardness values significantly smaller at distance 1 than distance 2, except for 5NaOCl and 5NaOCl+E ($P>0.05$). EDTA presented the lowest microhardness values, significantly different only from Sx at distance 2. In conclusion, all tested solutions showed lower microhardness values near the root canal lumen compared to those found near the external root surface, and at this point, EDTA promoted a greater microhardness reduction in comparison to Sterilox[®]. In the second chapter, apical segments were longitudinally cut into two hemi-roots, one prepared for the study of the collagen structure by light microscopy (LM), and the other for the analysis of the topography of the inorganic component of dentin, by scanning electron microscopy (SEM). Picrosirius stained slides were analyzed and classified into 4 scores classified into four scores according to the orientation pattern of the collagen fibers and the regularity of the root canal contour. SEM images of coronal dentinal tubules near the root canal lumen were analyzed descriptively in relation to their parallelism, obliteration and the

presence of dentinal erosion. Data from histological analyzes were submitted to Kruskal-Wallis test followed by multiple comparisons test at 5% significance level. Results showed that the higher the concentration of the NaOCl, the greater its effect, in depth, on organic layer of dentin (collagen). It is possible to conclude that 5% NaOCl, associated or not with 17% EDTA, and 2% NaOCl + EDTA caused the greatest change in the organic matrix of collagen. 2% NaOCl was similar to Sterilox[®], associated or not with EDTA, promoting a more superficial disorganization of collagen and in a smaller area. Regarding changes of the inorganic component of dentin, demineralized areas were observed in all groups in which EDTA was employed. However, areas of erosion and open tubules were detected only when it was combined with NaOCl. It was concluded that 5% NaOCl, whether associated or not with 17% EDTA, caused significant damage to dentin collagen. SEM images obtained by SEM revealed demineralization in all groups in which EDTA was used, however areas of erosion and open tubules were observed only when it was combined with NaOCl.

Key-words: microhardness, collagen, inorganic component, dentin, irrigants, sodium hypochlorite, super-oxidized water, EDTA.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AA: anolito ácido
AN: anolito neutro
BHI: brain heart infusion (meio de cultivo)
#: calibre
C⁺: controle positivo
C⁻: controle negativo
C/NA: catolito e anolito neutro
Ca(OH)₂: hidróxido de cálcio
Cl: cloro
cm: centímetro
CO₂: gás carbônico
°C: graus Celsius
CT: comprimento de trabalho
ECA: água eletroquimicamente ativada
EDTA: ácido etilenodiamino-tetracético
et al: e colaboradores
E. faecalis: Enterococcus faecalis
g: grama
h: horas
H₂O₂: água oxigenada
HOCl: ácido hipocloroso
Kg: quilograma
Ltda: limitada
MEV: microscopia eletrônica de varredura
mg: miligrama
mg/L: miligrama por litro
min.: minuto
mL: mililitro
MLP: microscópio de luz polarizada
mm: milímetro

mv: milivolts

MO: microscopia óptica

N: Newton

nº : número

N/s: Newton por segundo

NaOCl: hipoclorito de sódio

NaOH: hidróxido de sódio

nm: nanometro

PBS: solução salina

pH: potencial hidrogeniônico

ppm: partes por milhão

PQM: preparo químico-mecânico

s: segundo

sem: semanas

UFC: Unidades Formadoras de Colônia

VHN: Unidade de Dureza Vickers

1. INTRODUÇÃO

A terapia endodôntica, alicerçada em meios mecânicos (instrumentos endodônticos), físicos (irrigação e aspiração do canal radicular) e químicos (substâncias irrigadoras) visa promover a limpeza e a modelagem do canal radicular. Esta limpeza objetiva, fundamentalmente, a eliminação de restos pulpares e de microrganismos do canal radicular almejando o reparo dos tecidos periapicais (Schilder, 1974).

No entanto, em casos de necrose pulpar associada a lesões periapicais radiograficamente visíveis e de retratamento endodôntico, o índice de insucesso do tratamento é superior aquele de situações de polpa vital (Kerekes & Tronstad, 1979; Sjögren et al., 1990). Estes insucessos têm sido atribuídos, principalmente, a persistência microbiana na região apical de canais obturados, ocasionada pela inacessibilidade da instrumentação e irrigação ou mesmo pela organização em biofilmes (Molander et al., 1998; Nair, 1990).

Nessas situações, os procedimentos para controle de infecção tornam-se decisivos para o aumento do sucesso da terapia. Ainda que a ação mecânica dos instrumentos proporcione uma redução microbiana significativa durante o preparo do canal radicular, as soluções químicas são auxiliares indispensáveis para o procedimento, principalmente pela ação fundamental em áreas inacessíveis aos instrumentos endodônticos (Siqueira et al., 2002).

Diversas substâncias têm sido utilizadas para irrigação dos canais radiculares, durante o preparo químico-mecânico (PQM), com o objetivo de remover debris e tecido pulpar necrótico, assim como auxiliar na eliminação de microrganismos (Safavi et al., 1990). Entretanto, as soluções irrigadoras produzem alterações na permeabilidade da estrutura dentinária, modificando, também, suas propriedades mecânicas (Barbosa et al., 1994).

Alguns irrigantes endodônticos são capazes de alterar a composição química da dentina e modificar a proporção cálcio/fósforo na superfície dentinária. Essas alterações poderiam modificar a proporção original entre componentes orgânicos e inorgânicos, provocando modificações nas características de permeabilidade e solubilidade deste tecido, afetando,

conseqüentemente, a adesão de materiais odontológicos a estrutura dentinária (Doğan & Çalt, 2001).

A literatura tem mostrado também, que o hipoclorito de sódio, agente irrigante largamente utilizado, produz alterações significativas no colágeno da dentina ocasionando, cumulativamente e interagindo com outros fatores, a diminuição da resistência do elemento dentário (Pascon et al., 2009; Moreira et al. 2009).

Para a compreensão da permeabilidade da dentina, assim como o efeito de soluções químicas irrigantes, medicações intracanal e cimentos endodônticos utilizados atualmente é essencial o conhecimento detalhado dessa estrutura (Mjör et al., 2001).

1.1 Dentina

A dentina é a porção de tecido duro do complexo dentina-polpa que forma o maior volume do dente, sendo delimitada pelo esmalte coronário e pelo cemento radicular. Anatomicamente, caracteriza-se pela presença de múltiplos túbulos dentinários dispostos muito próximos que atravessam toda a sua espessura e contêm as extensões citoplasmáticas dos odontoblastos, os quais formaram a dentina e, agora, a mantém. Os corpos celulares dos odontoblastos alinham-se ao longo da face interna da dentina, formando o limite periférico da polpa dental (Ten Cate, 2001).

A dentina é um substrato composto, em peso, por aproximadamente 20% de matriz orgânica, 70% de matriz inorgânica e 10% de água (adsorvida na superfície do mineral ou nos interstícios entre os cristais), e 33%, 45% e 22%, respectivamente, por volume (Goldberg et al., 1995).

Seu componente inorgânico consiste principalmente de hidroxiapatita, sendo o cálcio (Ca) e o fósforo (P) seus maiores componentes. Cerca de 91% da fase orgânica é constituída por colágeno com inclusões fracionais de glicoproteínas, proteoglicanos e fosfoproteínas. Aproximadamente 56% da fase mineral (hidroxiapatita) estão contidos no colágeno (Goldberg et al., 1995; Torneck, 2001; Doğan & Çalt, 2001).

Uma das propriedades físicas da dentina é sua elasticidade. Esta é importante para o funcionamento do dente por fornecer flexibilidade e prevenir a fratura do esmalte, estrutura frágil e intimamente ligada à dentina através da junção amelodentinária (Ten Cate, 2001).

O número e o diâmetro dos túbulos dentinários são determinantes para a penetração e os subseqüentes efeitos dos agentes terapêuticos aplicados diretamente sobre a dentina (Camargo et al., 2007). Diversas técnicas têm sido usadas para revelar detalhes desta estrutura, incluindo histoquímica, microscopia de imunofluorescência, óptica, de polarização e eletrônica de varredura (Vidal & Melo, 1987; Schilke et al., 2000; Camargo et al., 2007).

Atualmente, há grande dificuldade na obtenção de dentes humanos para serem destinados a pesquisas científicas. A maioria dos dentes extraídos apresenta perda de estrutura associada a lesões cáries, limitando seu uso para este fim. Além disso, o aspecto ético deve ser ressaltado. A extração de dentes em indivíduos “post-mortem” caracteriza violação da Lei 9434 de 02/04/1997, que proíbe este tipo de procedimento.

Em virtude dessa dificuldade, Schilke et al. (2000) compararam o número e o diâmetro de túbulos dentinários de 30 molares permanentes humanos, de 30 molares decíduos e de 30 incisivos bovinos, mediante o emprego da microscopia eletrônica de varredura (MEV). Após a amputação coronária e a remoção do tecido pulpar, os dentes foram irrigados, sequencialmente, com EDTA 0,27 M (pH 7,4) por 5min, NaOCl 0,34 M (pH 12,3) por 3min e água por 5 min, para remoção da *smear layer*. Não foram verificadas diferenças significantes entre a dentina humana e bovina, com relação à concentração de túbulos por mm² na porção coronária. Entretanto, a densidade de túbulos dentinários na raiz bovina foi significativamente maior. A média do diâmetro dos túbulos dentinários bovinos foi levemente maior do que a dos túbulos dentinários humanos, porém não significativa.

Camargo et al. (2007) estudaram a correlação do número e do diâmetro de túbulos dentinários nos terços apical, médio e cervical, entre dentes humanos e bovinos, utilizando MEV. O terço cervical da raiz, de ambas espécies, apresentou diâmetro e número de túbulos dentinários maiores, comparado aos demais terços radiculares. Os dentes bovinos mostraram maior

número de túbulos dentinários do que os humanos, entretanto não houve diferença estatística em relação ao diâmetro dos mesmos.

Assim sendo, dentes bovinos, que são obtidos com maior facilidade e apresentam baixo índice de cárie (Camargo et al., 2007), têm sido usados em várias publicações recentes (Schilke et al., 2000; Slutzky-Goldberg et al., 2004; Moreira et al., 2009; Rossi-Fedele et al., 2010), como alternativa aos humanos.

1.2 Hipoclorito de sódio (NaOCl) e Ácido etilenodiamino tetracético (EDTA)

Uma das soluções irrigadoras mais utilizadas em Endodontia é o NaOCl, em concentrações que variam de 0,5% a 6%. Dentre as principais propriedades desta substância estão a capacidade de dissolver matéria orgânica e de eliminar microrganismos, características desejáveis por auxiliar na remoção de tecido pulpar e de restos necróticos (Zehnder, 2006).

O NaOCl é um agente proteolítico não específico capaz de remover matéria orgânica, assim como íons magnésio e carbonato. Em contrapartida, esta solução pode afetar a estrutura e as propriedades mecânicas da dentina, devido à degradação, especialmente do colágeno (Pascon et al., 2009; Moreira et al., 2009).

Agentes quelantes têm sido sugeridos para remoção da *smear layer*, assim como para a desmineralização e “amolecimento” da dentina. Os agentes quelantes mais utilizados são baseados em diferentes concentrações de EDTA (Doğan & Çalt, 2001).

O EDTA passou a ser utilizado na Endodontia a partir de 1957, quando Otsby sugeriu o uso desta solução para a instrumentação de canais radiculares atresados. Esse sal, derivado de um ácido fraco, é capaz de promover a quelação de íons cálcio da dentina, em pH alcalino (Lopes et al., 2004). Porém, sua aplicação endodôntica mais freqüente é como auxiliar na remoção da *smear layer*. Para uma remoção mais eficiente da superfície das paredes do canal radicular, tem sido recomendado o seu uso associado ao NaOCl (Yamada et al., 1983; Garberoglio & Becce, 1994).

Baumgartner & Mader (1987) afirmaram que a combinação de EDTA/NaOCl causa uma dissolução progressiva da dentina, às expensas das áreas de dentina inter e intratubular. Tal efeito resulta da ação alternada do NaOCl, que dissolve os componentes orgânicos, com o EDTA, que desmineraliza os componentes inorgânicos da dentina.

Conforme Garberoglio & Becce (1994), além do efeito desmineralizador, o EDTA desnatura as fibras colágenas. Beltz et al. (2003) demonstraram que este irrigante foi capaz de remover componentes orgânicos e inorgânicos da dentina bovina. Neste estudo, as amostras foram imersas em tubos contendo as soluções testadas e depois centrifugadas.

O efeito de diferentes substâncias químicas auxiliares, utilizadas durante o tratamento endodôntico, nas paredes do canal radicular também foi avaliado por Moreira et al. (2009) com microscópio de luz polarizada (MLP) e MEV. Foram selecionados 60 incisivos bovinos que foram divididos aleatoriamente em seis grupos (n=10), conforme o protocolo de irrigação instituído: G1 - NaOCl 5,25% (30 min) +EDTA 17% (5 min); G2 - Clorexidina (CHX) gel 2% (30 min); G3 - NaOCl 5,25% (30 min); G4 - EDTA 17% (5 min); G5 - CHX 2% (30 min) + EDTA 17% (5 min) e G6 - solução de cloreto de sódio 0,9% como controle (30 min). Os dentes foram preparados quimicamente e divididos em dois fragmentos. Um dos fragmentos foi utilizado para avaliação em MLP e o outro para MEV. Os grupos tratados com NaOCl 5,25%, quando associado ou não ao EDTA 17%, apresentaram significativa diferença nos padrões de birrefringência comparada ao grupo controle. Os resultados revelaram que os grupos irrigados com CHX 2% e EDTA 17%, isoladamente ou combinados, não apresentaram diferenças significativas quando comparados ao grupo controle. As análises em MEV mostraram alterações estruturais na matriz inorgânica em todos os grupos em que foi usado o EDTA 17%. Concluíram que NaOCl 5,25%, associado ou não ao EDTA 17%, causa alterações no colágeno da dentina. As imagens obtidas em MEV revelaram também áreas de desmineralização em todos os grupos em que o EDTA 17% foi utilizado sozinho ou associado com outras substâncias.

Niu et al. (2002) examinaram a erosão dentinária em MEV, causadas por protocolos de irrigação final com EDTA e NaOCl, quando associados ou

isolados. Verificaram a ocorrência de erosão dentinária quando o EDTA a 15%, por 3 min, foi utilizado na irrigação final do canal radicular, seguido do NaOCl a 6%, por 2 min. Essa associação foi mais eficaz na remoção dos debris da superfície da parede do canal radicular do que quando o EDTA foi empregado isoladamente.

Em trabalho semelhante, Doğan & Çalt (2001) demonstraram que o uso da irrigação final com NaOCl a 2,5%, após o EDTA a 17%, alterou significativamente a ação quelante na dentina radicular. Já EDTA e RC-Prep sozinhos não provocaram mudanças significativas. Esses resultados sugerem que a descalcificação pelo EDTA neutro não é apenas baseada na quelação de cálcio, sendo que a parte orgânica da dentina também desempenha um papel crítico no processo de descalcificação.

Com o objetivo de estudar a relação entre erosão e microdureza da dentina radicular, após o uso de diferentes irrigantes, Saghiri et al. (2009) selecionaram 72 pré-molares humanos unirradiculares, preparados com instrumentos rotatórios ProTaper e irrigados com cloreto de sódio a 0,9% (solução salina). Os espécimes foram então divididos em 6 grupos (n=12): NaOCl a 2,6% (5 min); EDTA a 17% (5 min) e após NaOCl 2,6% (5 min); EDTA a 17% (1 min) e após NaOCl a 2,6% (1 min); MTAD (5 min); Clorexidina 2% (5 min) e solução salina (controle). Valores iniciais e finais de microdureza Vickers foram mensurados, no terço médio radicular, nas profundidades de 100 e 500 µm da interface polpa-dentina. A quantidade de erosão dentinária foi examinada em MEV. O grupo NaOCl/EDTA 5 min mostrou o maior efeito erosivo na dentina, assim como a menor redução da microdureza, a uma profundidade de 100 µm. Já o uso do MTAD mostrou efeitos opostos, maior redução da microdureza dentinária e menor efeito erosivo na dentina. Com estes resultados, concluíram que a erosão não é o principal fator na redução da microdureza dentinária, e sim a quantidade de penetração do irrigante na dentina.

Grigoratos et al. (2001) avaliaram os efeitos do NaOCl 3% e 5% e da solução saturada de hidróxido de cálcio, individual ou consecutivamente, na resistência flexural e no módulo de elasticidade em 121 peças padronizadas de dentina. Estas peças foram expostas às seguintes soluções: salina (controle);

NaOCl 3% e 5% por 2 h; solução saturada de Ca(OH)₂ por 1 sem e NaOCl 3% e 5% por 2 h associado a solução saturada de Ca(OH)₂ por 1 sem. As porções de dentina foram induzidas a falhas através do *three point bend test*. O NaOCl 3% e 5% reduziu o módulo de elasticidade e a resistência flexural da dentina. Já a solução de Ca(OH)₂ reduziu a resistência flexural da dentina, mas não teve efeito no módulo de elasticidade. O uso seqüencial de NaOCl e Ca(OH)₂ não provocou efeitos adicionais aqueles constatados com o uso individual do NaOCl.

Sim et al. (2001) estudaram os efeitos do NaOCl nas propriedades mecânicas da dentina. Primeiramente, 50 dentes humanos hígidos foram seccionados longitudinalmente e aleatoriamente mergulhados e constantemente agitados em 200 mL de uma das três soluções: salina; NaOCl 0,5%; NaOCl 5,25%, por 2 h, trocados a cada 10 minutos. Em um segundo momento, objetivando-se a mensuração da resistência, 15 segundos pré-molares inferiores unirradiculares hígidos foram empregados. O esmalte dos espécimes experimentais (n=10) e C+ (n=2) e C- (n=2) foi totalmente removido. Os canais foram preparados e irrigados com as mesmas soluções descritas acima, por um tempo padronizado de 30 min. O 15° dente permaneceu com esmalte intacto. Após, os dentes foram submetidos a uma carga inicial de 10 N, seguidos de ciclos entre 10 e 110 N a 33,33 N/s, num total de seis ciclos, na máquina de Teste (MTS 830 Elastomer). O NaOCl 5,25%, comparado à solução salina, reduziu a resistência flexural e o módulo de elasticidade da dentina.

Slutzky-Goldberg et al. (2004) verificaram, em 42 incisivos inferiores bovinos, o efeito do NaOCl 2,5% e 6%, em diferentes tempos de irrigação (5, 10 ou 20 min), sobre a microdureza dentinária. O grupo controle foi irrigado com solução salina. Após a irrigação, as raízes foram seccionadas em dois segmentos de 10 mm e incluídas em resina acrílica autopolimerizável. As medidas de microdureza em Unidade de dureza Vickers (VHN) foram realizadas, em cada segmento, a 500, 1000 e 1500 µm da interface polpa-dentina. A cada profundidade, três identações foram feitas usando uma carga de 300 g / 10 seg, perpendicular à superfície da indentação. Houve redução da microdureza dentinária, quando do emprego do NaOCl 6%,

independentemente do tempo, comparado com a solução salina. Porém esta redução foi significativa exclusivamente nos períodos de 10 e 20 min. Em todos os tempos mensurados, a redução da microdureza foi maior, quanto maior a concentração do NaOCl.

Ari et al. (2004) avaliaram o efeito de diferentes soluções irrigadoras na microdureza e na rugosidade da dentina do canal radicular. Os 180 dentes humanos foram divididos em 6 grupos (n=30) e mergulhados, por 15 min em: NaOCl 5,25% e 2,25%; H₂O₂ 3%; EDTA 17%; gluconato de clorexidina 0,2% e água destilada (controle). Metade da amostra (n=15) foi submetida ao Teste de Microdureza Vickers e a outra, foi utilizada para determinação da rugosidade dentinária radicular. Todas as soluções testadas, exceto a clorexidina, apresentaram redução significativa da microdureza da dentina do canal radicular. A rugosidade da dentina não foi alterada com a H₂O₂ e com a clorexidina.

Para Pascon et al. (2009), a redução da microdureza produz um efeito de solução dos componentes minerais da dentina, afetando a adesão e a capacidade de selamento de materiais dentários.

Segundo Cruz-Filho et al. (2011), a redução na microdureza da camada mais superficial da dentina na luz do canal radicular é um efeito desejável. Conforme os autores, o uso de agentes quelantes durante o PQM remove a *smear layer*, aumenta o acesso da solução irrigadora aos túbulos dentinários, permite adequada desinfecção e também reduz a microdureza da dentina, facilitando a ação dos instrumentos. Em vista desses conceitos, avaliaram os efeitos de diferentes agentes quelantes (EDTA 15%, ácido cítrico 10%, ácido maleico 5%, ácido acético 5%, vinagre de maçã, citrato de sódio 10%) na microdureza da camada mais superficial da dentina. Todas as soluções foram usadas como irrigação final, por 5min, em um volume de 50 µL. A microdureza da dentina foi medida com indentação Knoop. Todas as soluções quelantes, exceto o citrato de sódio, reduziram a microdureza da camada superficial da dentina. No entanto, o EDTA e o ácido cítrico foram os mais eficientes neste aspecto.

Embora as causas que mais predisponham um dente à fratura sejam a perda da estrutura dentária por cáries e preparos de cavidades de acesso, a

literatura tem demonstrado que o uso do NaOCl, durante o tratamento endodôntico, pode ser responsável por uma modificação na rigidez do dente e, conseqüentemente, pelo estabelecimento de uma tendência maior à fratura (Pascon et al., 2009). É provável que a interação destes fatores, cumulativamente, influencie na perda de resistência e na possibilidade de fratura (Sim et al., 2001).

1.3 Sterilox®

Em razão das limitações do NaOCl, tais como seus efeitos citotóxicos a tecidos vitais, probabilidade de produzir reações inflamatórias no periápice (Pashley et al., 1985) e a redução do módulo de elasticidade e da resistência flexural da dentina (Grigoratos et al., 2001; Sim et al., 2001) por ele causada, algumas alternativas à essa solução têm sido estudadas. Há a necessidade de se obter um irrigante com propriedades antimicrobianas equivalentes, que proporcione um efeito suave sobre tecidos vitais e que seja capaz de remover debris da superfície dentinária sem enfraquecer a estrutura dentária (O'Driscoll et al., 2002).

Recentemente tem sido sugerido na literatura, o emprego de irrigantes conhecidos como “água eletroquimicamente ativada (ECA)” (Marais, 2000; Solovyeva e Dummer, 2000) ou “água com potencial oxidativo” (Hata et al., 1996). Estas soluções são, geralmente, obtidas através da eletrólise de uma solução salina, em um processo semelhante ao usado na produção comercial do hipoclorito de sódio.

A tecnologia que permite adquirir as respectivas soluções está baseada no projeto de uma Unidade ânodo-cátodo. Para sua obtenção, a solução salina é eletrolisada na passagem por eletrodos de titânio, produzindo duas soluções:

1) Anólito com alto potencial oxidativo e antimicrobiano (400-1200 mv), podendo ser ácido, neutro ou alcalino (pH 2-8).

2) Católito com alto potencial de redução (-80 a -900 mv), sendo uma solução alcalina (pH 7-12), tendo efeito detergente e de limpeza (Marais, 2000).

Embora com denominações diferentes, a ECA e a água com potencial oxidativo são manufaturadas de acordo com os mesmos princípios. A literatura endodôntica sobre o assunto ainda é escassa, porém revela futuro promissor.

Estas soluções têm sido testadas com relação à capacidade de remover debris dentinários dos canais radiculares (Marais, 2000; Solovyeva e Dummer, 2000), remover *smear layer* e eliminar bactérias (Gulabivala et al., 2004; Garcia et al., 2010; Rossi-Fedele et al., 2010), mostrando resultados favoráveis e biocompatibilidade com tecidos vitais (Hata et al., 1996).

Marais (2000) investigou, em MEV, a eficácia da ECA como irrigante em 23 dentes humanos unirradiculares extraídos e preparados mediante a técnica seriada. Os dentes foram irrigados com solução de NaOCl 2,5% ativado com ultrassom (n=10) e ECA (STEDS™, Radical Waters, Johannesburg, South África) (n=10), produzida nas formas de catolito (pH 9,8) e anolito (pH 7,4). Três dentes serviram como controle. A ECA produziu limpeza da superfície do canal radicular superior à promovida pelo NaOCl e removeu *smear layer* em grandes áreas.

Gulabivala et al. (2004) testaram a efetividade da ECA na remoção de *Enterococcus faecalis* na forma de biofilme, em 198 dentes humanos unirradiculares extraídos. Os dentes tiveram as coroas removidas e foram preparados até o instrumento 30.06 (Profile, Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Switzerland) sob irrigação com água. Estes foram divididos em 11 grupos (n=18), sendo 8 experimentais: Anolito neutro (AN), pH=6,5; Anolito ácido (AA) pH=3,0; Catolito (C) pH=11,5 e Catolito alternado com Anolito neutro (C/AN), associados ou não a ativação por ultrassom e 3 controles: solução salina (PBS) com e sem ativação por ultrassom (controle negativo) e NaOCl 3% (controle positivo). Após a contaminação dos canais, as amostras foram irrigadas. A mensuração da eficácia antibacteriana foi realizada através da contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs). As soluções anolito neutro (AN) e anolito ácido (AA), ativadas por ultrassom, foram efetivas sendo, no entanto, inferiores ao NaOCl 3% na eliminação de bactérias.

O irrigante Sterilox® (Sterilox Technologies Inc., Radnor-PA, United States), uma água superoxidada, também é produzido sob os mesmos princípios. A solução de cloreto de sódio é eletrolisada pela passagem em eletrodos de titânio, resultando em uma solução de ácido hipocloroso, com um potencial de oxidação maior do que 950 mv e um pH entre 5,0 e 6,5. Este irrigante possui alta capacidade microbicida e vem sendo utilizado para

desinfecção de mangueiras e reservatórios de água em unidades odontológicas e médicas, pois apresenta baixa toxicidade e não causa corrosão nos equipamentos (Selkon et al., 1999; Martin & Gallagher, 2005). O fabricante sugere que a produção do ácido hipocloroso (HOCl), no Sterilox Dental System (Optident Dental, Ilkley, West Yorkshire, UK), não produz radical livre de Cl (Cl[•]) e que, a concentração de cloro livre disponível na solução é de 200 ppm.

Shetty et al. (1999), avaliando a solução de Sterilox[®], na desinfecção de endoscópios, encontraram uma alta efetividade na eliminação de esporos, micobactérias, fungos e uma variedade de outros microrganismos, quando utilizada em até 24 h após seu preparo. No entanto, constataram que a atividade antimicrobiana é reduzida sensivelmente, na presença de matéria orgânica.

Garcia et al. (2010), em um estudo *ex vivo*, avaliaram a efetividade da solução de Sterilox[®] na remoção de biofilme. A amostra foi composta por 45 dentes humanos unirradulares extraídos, divididos em 5 grupos de irrigantes: água destilada (controle negativo); Sterilox[®]; Sterilox[®] e EDTA 17% (irrigação final por 15 s); NaOCl 6% e NaOCl 6%; e EDTA 17% (irrigação final 15 s). A solução de Sterilox[®] foi empregada na concentração de 180-250 ppm, em um pH de 5,35 - 6,75. Os dentes foram contaminados com *E. faecalis* por 28 dias. Após, os canais radiculares foram instrumentados com o sistema Profile e irrigados com as soluções propostas, no volume de 5 mL, a cada troca de instrumento. Os dentes foram cortados longitudinalmente e, as paredes dos canais radiculares, avaliadas em MEV. Os protocolos de irrigação que empregaram a solução de Sterilox e o NaOCl 6% demonstraram efetividade similar na remoção do biofilme de *E. faecalis*.

Rossi-Fedele et al. (2010) compararam, em dentes bovinos, o efeito sobre o *Enterococcus faecalis*, de três soluções irrigadoras: NaOCl 4%, solução salina (Optident Sterilox Electrolyte Solution[®]), usada como controle negativo, e a água superoxidada Sterilox[®] 200 ppm (Aquatine Alpha Eletrolyte[®]). Secções de raízes foram preparadas e contaminadas com *Enterococcus faecalis*. Após dez dias, os canais radiculares foram irrigados usando uma das três soluções. Os debris foram colocados em BHI e as diluições semeadas em placa de ágar

para quantificar o crescimento. O efeito antimicrobiano do Sterilox[®] foi significativamente maior do que o da solução salina. Entretanto, o NaOCl foi a única solução capaz de erradicar consistentemente o *Enterococcus faecalis*.

Rossi-Fedele et al. (2011) estudaram fatores que podem influenciar na estabilidade da água superoxidada Sterilox[®], alertando que o aumento do pH da solução diminui seu potencial desinfetante e que a solução de Sterilox[®], após seu preparo, seja corretamente abrigada da luz, permanecendo, assim, estável por um período de 14 dias.

Em 2013, Rossi-Fedele et al. avaliaram a capacidade de dissolução do tecido pulpar bovino por HealOzone[®], Aquatine Alpha Electrolyte[®] (Sterilox[®] 200 ppm, pH 5,0) e hipoclorito de sódio 0,5%, quando empregados isoladamente ou associados. Os resultados do estudo mostraram que em todos os grupos que continham hipoclorito de sódio, o tecido pulpar bovino foi dissolvido, sendo que a velocidade de dissolução foi maior quando HealOzone[®] foi associado. Nos grupos com Sterilox[®], isolado ou associado ao HealOzone[®], não houve dissolução do tecido pulpar.

Embora o NaOCl seja amplamente utilizado na terapia endodôntica convencional, mostrando-se efetivo na redução microbiana do canal radicular, há a necessidade de se buscar alternativas a este irrigante, tendo em vista os diversos efeitos indesejáveis que sua utilização pode ocasionar. Existem poucas informações a respeito das alterações que substâncias químicas auxiliares como o Sterilox[®], possam causar na estrutura dentinária e qual a relação deste fato com a microdureza dos dentes submetidos aos referidos procedimentos. Estudos com esse objetivo tornam-se necessários para uma melhor compreensão das possíveis alterações nos componentes orgânicos e inorgânicos da dentina. Além disso, podem contribuir para o entendimento da relevância de tais alterações, quando presentes.

Sendo assim, torna-se importante o estudo da influência do hipoclorito de sódio, em diferentes concentrações, assim como do EDTA e de auxiliares químicos alternativos, como o Sterilox[®], sobre a microdureza e sobre a estrutura dentinária, com objetivo de buscar protocolos de preparo químico-mecânico do canal radicular seguros e eficientes, diminuindo o risco à fratura de dentes submetidos a tratamento.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar o efeito de diferentes soluções irrigadoras, como o NaOCl 2% e 5% e Sterilox[®], associados ou não ao EDTA, sobre a microdureza e os componentes orgânico e inorgânico da dentina bovina.

2.2 Específicos

a) Avaliar a microdureza da dentina, mediante o Teste de Microdureza Vickers, em diferentes distâncias da luz do canal radicular, em dentes preparados e irrigados com as substâncias supracitadas.

b) Avaliar, através da MEV, os efeitos de diferentes soluções irrigadoras, utilizadas durante o PQM, sobre o componente inorgânico das paredes do canal radicular;

c) Avaliar, através da microscopia óptica, os efeitos de diferentes soluções irrigadoras, utilizadas durante o PQM, sobre o componente orgânico das paredes do canal radicular.

3 CAPÍTULO I

Artigo 1

Effect of super-oxidized water, sodium hypochlorite and EDTA on dentin microhardness

Formatado conforme diretrizes do periódico *Journal of Applied Oral Science*, Qualis B1 e Fator de impacto 0,966.

Effect of super-oxidized water, sodium hypochlorite and EDTA on dentin microhardness

Alexandre Corrêa Ghisi¹, DDS, MSc, Patrícia Maria Poli Kopper², DDS, MSc, PhD, Flávia E. R. Baldasso², DDS, Carolina P. Stürmer¹, DDS, Giampiero Rossi-Fedele³, DDS, MSc, PhD, José Antonio Poli de Figueiredo¹, DDS, MSc, PhD, Renata Dornelles Morgental¹, DDS, MSc, PhD, Fabiana Vieira Vier-Pelisser¹, DDS, MSc, PhD.

1 - Department of Endodontics; School of Dentistry, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil;

2 - Department of Conservative Dentistry; School of Dentistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

3 – Department of Endodontics; Dentistry, Warwick Medical School, Warwick, United Kingdom.

Corresponding author:

Alexandre Corrêa Ghisi / Fabiana Vieira Vier-Pelisser
Graduate Program in Dentistry
Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul – PUCRS
Av. Ipiranga 6681, Prédio 6
CEP 90619-900
Porto Alegre – RS – Brazil
Phone: 55 51 3320 3562
Email: aghisi@terra.com.br / endopelisser@gmail.com

Abstract

Objective: The present study aimed to evaluate the influence of the following irrigating solutions on the microhardness of root canal dentin: 2% sodium hypochlorite (2NaOCl), 5%, sodium hypochlorite (5NaOCl), super-oxidized water (400 ppm Sterilox[®] - Sx) and 17% EDTA (E). **Material and Methods:** 80 roots from bovine incisors were randomly divided into 8 groups (n =10): 2NaOCl, 5NaOCl, Sx, and 2NaOCl + E, 5NaOCl + E, Sx + E (associated with E as final irrigant for 5 min), E used individually and distilled water (H₂O), as the negative control. Root canal preparation was performed by the classical technique, using one of the irrigation protocols for 30 minutes. Then, cervical 5 mm were perpendicularly cut from each sample and subjected to the Vickers hardness test, at two points, one at approximately 500-1000 μm from the root canal lumen (distance 1), and the other at approximately 500-1000 μm from the external root surface (distance 2). Data were analyzed statistically by Wilcoxon and Kruskal-Wallis tests at 5% significance level. **Results:** Microhardness values at distance 1 were significantly lower than those at distance 2 for all groups, except 5NaOCl and 5NaOCl+E groups (P>0.05). EDTA showed the lowest microhardness values. However, no statistically significant difference was detected among groups at distance 1 and EDTA was significantly different only from Sx at distance 2. **Conclusion:** All tested solutions showed lower microhardness at the most superficial root canal dentin layer compared to that found near the outside root surface, except 5NaOCl and 5NaOCl + E; EDTA promoted greater microhardness reduction in comparison to Sterilox[®] at this point.

Key words: Dentin. EDTA. Electrochemically activated solutions. Microhardness. Sodium hypochlorite. Super-oxidized water.

Introduction

Root canal instrumentation comprises the combined action of endodontic instruments and irrigating solutions, with the objective of eliminating the

microbial content and its byproducts, as well as inorganic and organic remnants and debris generated during operative procedures¹³. An irrigating solution should present a number of physicochemical and biological properties in order to be effective.

Sodium hypochlorite (NaOCl), in concentrations ranging from 0.5% to 6%, is the most widely used irrigating solution in endodontics³⁰. However, despite its excellent antimicrobial potential and ability to dissolve organic tissues¹⁶, it is not effective in removing the smear layer⁶. For this reason, NaOCl is usually used in combination with a chelating agent such as EDTA³. The demineralizing activity of this substance can be observed in root dentin due to the exposure of collagen and decreased surface microhardness, which facilitates the action of endodontic instruments, especially in narrow root canals. In addition, smear layer removal increases dentin permeability, which may improve the penetration of irrigating solutions into the dentinal tubules, allowing greater root canal disinfection⁶.

In vitro studies have shown that the higher the concentration of NaOCl and its time of use, the greater its influence on dentin microhardness, especially close to the root canal lumen^{29,30}. Furthermore, chelating solutions such as EDTA, citric acid and combinations containing EDTA also promote a reduction on microhardness of the most superficial layer of dentin⁶.

Due to the limitations of NaOCl, such as its potential cytotoxic effect on periapical tissues¹⁶ and its deleterious effect on dentin elastic modulus and flexural strength¹⁰, some alternatives to this solution have been studied. There is a need to obtain an irrigant with equivalent antimicrobial properties, gentle effect on vital tissues and capable of removing debris from dentin surfaces without unduly weakening the dental structure⁷.

It has been recently suggested in the literature the use of irrigants known as "electrochemically activated water" (ECA)^{11,31}, "oxidative potential water"^{12,26} or even "super-oxidized water"^{21,22,23}. These solutions are typically obtained by electrolysis of a saline solution, in a process similar to that used in the commercial production of sodium hypochlorite.

The endodontic literature on the subject is still scarce, but reveals a promising future. The solutions obtained by that process have been tested for their ability to remove debris and smear layer from root canals^{9,12,31}, remove smear layer and eliminate bacteria^{11,21} and also for their cytotoxic effects²⁶.

Investigations have evaluated the effectiveness of these solutions in removing *Enterococcus faecalis* biofilms with divergent results. Some studies have demonstrated greater efficacy of NaOCl in comparison to super-oxidized waters^{11,21} while others suggest that the disinfecting ability of those solutions are equivalent¹⁵.

Sterilox[®], a commercially available super-oxidized water, has been evaluated for its capacity of disinfecting endoscopes²⁷. The authors found high effectiveness in eliminating spores, mycobacteria, fungi and a variety of other microorganisms, when used within 24 hours after its preparation. However, they also found that its antimicrobial activity is significantly reduced in the presence of organic matter. Although Sterilox[®] solution has emerged as an alternative irrigant in endodontics, so far, its effect on dentin microhardness is unknown. Information about such effect is critical since an improper irrigation protocol, capable of weakening the dental structure in depth, may affect its strength and increase the probability of fracture.

Thus, this study aimed to evaluate the effect of Sterilox[®] (super-oxidized water) and two concentrations of sodium hypochlorite, associated or not with EDTA, on bovine dentin microhardness, considering the inner layer of dentin (close to the root canal lumen), compared to the outer layer of dentin (close to the root surface).

Materials e Methods

Experimental groups distribution

Eighty (80) bovine incisors were selected, with standard lengths of 20 mm, after previous removal of the cervical portions. Teeth were stored in distilled water until the time of use and randomly divided into eight groups

(n=10), according to the irrigating solution used during chemomechanical preparation of the root canal: 2% NaOCl (2NaOCl), 5% NaOCl (5NaOCl), 400 ppm Sterilox® (Sx) and 17% EDTA (E) used individually; 2% NaOCl and 17% EDTA (2NaOCl+E); 5% NaOCl and 17% EDTA (5NaOCl+E); 400 ppm Sterilox® and 17% EDTA (Sx+E) (groups associated with final irrigation of EDTA for 5 min); and distilled water (H₂O) – negative control.

NaOCl and EDTA solutions were prepared (CIENTEC - Science and Technology Foundation, Porto Alegre, RS, Brazil) seven days prior to use and stored away from light at room temperature. Also, 400 ppm Sterilox® solution (Optident Dental, Ilkley, West Yorkshire, UK) was obtained about fifteen minutes before use by a double passage of sodium chloride solution into titanium electrodes, using the Sterilox Dental System (Optident Dental).

Chemomechanical preparation of the root canals

All root canals were prepared by a single and calibrated operator, by attaching the specimens in a fixing device (NBLBC; Neboluz, São Paulo, Brazil). For this purpose, the root canals were initially irrigated with 2 mL of the corresponding irrigating solution, and then explored with a size #35 K-file (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Switzerland). The endodontic instrument was introduced into the root canal until its tip was visible at the apical foramen. The working length (WL) was determined by reducing 1 mm from the total canal length and recorded.

Irrigating solutions were delivered by using Endo-Eze® 30G needles (Ultradent Products Inc., South Jordan, UT) attached to 10 mL disposable plastic syringes (BD - Becton Dickinson, São Paulo, SP, Brazil). Simultaneously, suction was performed with the aid of a n. 20 cannula (Indusbello, Londina, PR, Brazil) adapted to the root canal entrance. All root canals were instrumented by the classic technique¹⁴ and the first instrument was the one that fitted the canal walls at full WL. The last instrument used was a size #80 K-file. At each instrument change, irrigation/suction were carried out, with 2 mL of the

corresponding solution, using back and forth movements. Needle penetration reached up to 3 mm short of the WL, thus allowing space for solution reflux.

Total irrigation time was standardized at 30 minutes per specimen. In the groups with final irrigation (2NaOCl+E, 5NaOCl+E and Sx+E), 2 mL of EDTA were used and remained for extra 5 minutes in the root canal. At the end, 2 mL of NaOCl or Sx were employed. All canals were dried with size #80 absorbent paper points (Tanari; Tanariman Industrial Ltda, Manacapuru, AM, Brazil).

Dentin microhardness measurements

After chemomechanical preparation, cervical 5 mm of each sample were sectioned perpendicular to its long axis and embedded in acrylic resin (JET, São Paulo, SP, Brazil), except for the cervical surface, which was submitted to polishing with silicon carbide sandpapers (3M, St. Paul, MN) of three different grits (400, 600 and 1200) in order to obtain a smooth surface without gradients. Finishing was performed by felt discs impregnated with diamond paste (Buehler, Lake Bluff, IL) and the specimens were washed in running water.

Afterwards, specimens were positioned in a Microhardness Tester (HMV-G; Shimadzu Corp., Tokyo, Japan) and measurements were taken in Vickers hardness units (VHN). Two indentations were made, under 300-g load and 10-second dwell time, oriented perpendicular to the indentation surface. The first indentation was performed at approximately 500-1000 μm from the root canal lumen (distance 1) and the other at approximately 500-1000 μm from the outside surface of the root (distance 2).

Statistical Analysis

Data were analyzed by Wilcoxon's test for comparing distance 1 and 2 in each group. Moreover, Kruskal-Wallis's test, followed by Dunn's test, was applied for the comparison among groups at each distance. A significance level of 5% was set for all analyses.

Results

Vickers microhardness values (mean and standard deviation) for each irrigation protocol are illustrated in Figure 1. Values at distance 1 were significantly lower than those at distance 2 for all groups, except 5NaOCl and 5NaOCl+E ($P>0.05$). EDTA showed the lowest microhardness values. However, no statistically significant difference was detected among groups at distance 1 and EDTA was significantly different only from Sx at distance 2.

Discussion

The use of auxiliary chemical substances during root canal preparation, associated with the mechanical action of endodontic instruments, is of fundamental importance for infection control in the root canal system²⁸. However, the substances used in clinical practice may induce considerable changes in dentin surface morphology, which may cause changes in its physical and mechanical properties¹⁸. Some substances modify the inorganic component of dentin and consequently its hardness³². Panighi and G'Sell¹⁷ (1993) found a positive correlation between the mineral component of dentin and its hardness. Accordingly, the determination of hardness can provide important evidence about the effects of irrigating solutions on dentin and consequently on its resistance to fracture.

In the present study, the effect of NaOCl and Sterilox[®], combined or not with EDTA, on root dentin microhardness was investigated. Two indentation methods, Knoop and Vickers, have been used to evaluate this property⁸. Irrigants are usually compared to distilled water¹, saline³⁰ or no irrigation⁶, as the negative control. Although some studies had suggested lower sensitivity of Vickers microhardness to surface conditions⁸, this method has support in the literature^{1,29,30} when the proposal is to compare the reduction of dentin microhardness in superficial and deep areas. For this reason, it was selected for this study, using a 300-g load for 10 seconds, as previously described³⁰.

Microhardness values at distance 1, close to the root canal walls, were significantly lower than the values obtained at distance 2 for all groups, except 5NaOCl and 5NaOCl+E ($P>0.05$). This finding was expected since lower microhardness measurements near the root canal lumen have already been reported in the literature in connection with greater dentinal tubules density^{4,19}. The lack of significant difference between those two distances in groups 5NaOCl and 5NaOCl+E may be explained by the collagen degradation promoted by concentrated NaOCl and, consequently, the penetration of the solution into deeper areas. The degradation of the organic component of dentin, mainly formed by collagen, causes mechanical changes in its structure⁷ and occurs after the first 10 minutes of contact between the solution and the dentin walls³⁰.

The application of chelating agents such as EDTA is suggested to assist root canal preparation, since they act on the inorganic component of dentin and potentially reduce dentin microhardness^{6,24}, facilitating the cutting action of endodontic instruments. In the present investigation, when used individually, EDTA showed the lowest microhardness values, but statistically significant difference was detected only in comparison to the Sterilox[®] group at distance 2. In this context, it is considered that Sterilox[®] solution acts superficially on organic matter and can hardly cause changes in the dentin layer close to the root surface. Furthermore, the contact time between EDTA and dentin in this study (30 minutes) was higher than the usual final irrigation regimen (5 minutes), which may have caused greater change also in depth.

Due to the crescent difficulty of obtaining human teeth, bovine incisors were used as an alternative. It was possible to obtain samples of similar donor age and dentin characteristics, thereby allowing the distribution of teeth from the same animal into several experimental groups. Moreover, studies have shown similarities between these two models; bovine dentin has higher number of dentinal tubules⁵ but with equivalent diameters^{5,25}.

The number and diameter of dentinal tubules are crucial for the penetration and subsequent effects of therapeutic agents directly applied on

dentin⁵. According to Pashley et al¹⁹ (1985), there is an inverse correlation between dentin hardness and dentinal tubules density. Since a greater density of tubules is verified near the root canal lumen, it is attributed to this fact the lower resistance in that region. A lower hardness of human dentin in the cementum-dentin junction and near the root canal walls was first suggested by Patterson²⁰ (1963).

Burrow et al⁴ (1994) assessed the influence of age and depth of dentin on the tensile bond strength of different bonding systems. In their study, the important information with respect to dentin microhardness is the fact that hydraulic conductance is higher in young dentin. This feature, besides tubules density and diameter, may affect the penetration of irrigating solutions and, consequently, decrease the influence of the solution on the dentin microhardness in depth. According to Barbosa et al² (1994), the hydraulic conductance of dentin increases over 100% after treatment with 5% NaOCl, which suggests a negative effect of high concentrations of this substance on the integrity of the root canal walls.

Based on a previous study²⁹, in which the authors suggest a crucial effect of the irrigation period on dentin microhardness, we standardized the time of irrigation combined with mechanical preparation at 30 minutes. We have tried to simulate the clinical condition in contrast to the research of Ari et al¹ (2004), who dived the dentin samples in the tested solutions for 15 minutes, or the investigation of Cruz-Filho et al⁶ (2011) who delivered the irrigating solution directly onto previously sectioned dentin samples with the aid of micropipettes. These alternative forms of contact between solutions and dentin may explain the results slightly different from those obtained in our study, but with the same tendency. Microhardness values found in our study were higher in comparison to the effect found in their work.

Although the reduction in dentin microhardness close to the root canal is a desirable effect⁶, mainly provided by chelating agents, it is necessary to prevent a prolonged permanence of EDTA in contact with the root canal walls and the use of NaOCl solutions in high concentrations, at the risk of causing

relevant mechanical changes in dental structure and decreasing the resistance of teeth to fracture as a result.

Conclusions

Based on the experimental methods and results, it is concluded that after using the irrigating solutions, with the exception of 5% NaOCl, associated or not with EDTA, dentin microhardness close to the root canal lumen was significantly lower than that near the external root surface. Also, EDTA promoted greater microhardness reduction in comparison to Sterilox[®] at the outside layer of dentin.

References

1. Ari H, Erdemir A, Belli S. Evaluation of the effect of endodontic irrigation solutions on the microhardness and the roughness of root canal dentin. *J Endod.* 2004;30:792-795.
2. Barbosa SV, Safavi KE, Spangberg SW. Influence of sodium hypochlorite on the permeability and structure of cervical human dentine. *Int Endod J.* 1994;27:309-312.
3. Baumgartner JC, Mader CL. A scanning electron microscopic evaluation of four root canal irrigation regimens. *J Endod.* 1987;13:147-157.
4. Burrow MF, Takakura H, Nakajima M, Inai N, Tagami J, Takatsu T. The influence of age and depth of dentin on bonding. *Dent Mater.* 1994;10:241-246.
5. Camargo CH, Siviero M, Camargo SE, de Oliveira SH, Carvalho CA, Valera MC. Topographical, diametral, and quantitative analysis of dentin tubules in the root canals of human and bovine teeth. *J Endod.* 2007;33:422-426.
6. Cruz-Filho AM, Sousa-Neto MD, Savioli RN, Silva RG, Vansan LP, Pecora JD. Effect of chelating solutions on the microhardness of root canal lumen dentin. *J Endod.* 2011;37:358-362.

7. Driscoll CO, Dowker SE, Anderson P, Wilson RM, Gulabivala K. Effects of sodium hypochlorite solution on root dentine composition. *J Mater Sci Mater Med.* 2002;13:219-223.
8. Fuentes V, Toledano M, Osorio R, Carvalho RM. Microhardness of superficial and deep sound human dentin. *J Biomed Mater Res A.* 2003;66:850-853.
9. Garcia F, Murray PE, Garcia-Godoy F, Namerow KN. Effect of Aquatine Endodontic Cleanser on smear layer removal in the root canals of ex vivo human teeth. *J Appl Oral Sci.* 2010;18:403-408.
10. Grigoratos D, Knowles J, Ng YL, Gulabivala K. Effect of exposing dentine to sodium hypochlorite and calcium hydroxide on its flexural strength and elastic modulus. *Int Endod J.* 2001;34:113-119.
11. Gulabivala K, Stock CJ, Lewsey JD, Ghori S, Ng YL, Spratt DA. Effectiveness of electrochemically activated water as an irrigant in an infected tooth model. *Int Endod J.* 2004;37:624-631.
12. Hata G, Hayami S, Weine FS, Toda T. Effectiveness of oxidative potential water as a root canal irrigant. *Int Endod J.* 2001;34:308-317.
13. Hulsmann M, Heckendorff M, Lennon A. Chelating agents in root canal treatment: mode of action and indications for their use. *Int Endod J.* 2003;36:810-830.
14. Ingle JI. A standardized endodontic technique utilizing newly designed instruments and filling materials. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1961;14:83-91.
15. Marais JT. Investigations into the application of electrochemically activated water in dentistry. *SADJ.* 2000;55:381-386.
16. Mohammadi Z. Sodium hypochlorite in endodontics: an update review. *Int Dent J.* 2008;58:329-341.
17. Panighi M, G'Sell C. Effect of the tooth microstructure on the shear bond strength of a dental composite. *J Biomed Mater Res.* 1993;27:975-981.
18. Pascon FM, Kantovitz KR, Sacramento PA, Nobre-dos-Santos M, Puppini-Rontani RM. Effect of sodium hypochlorite on dentine mechanical properties. A review. *J Dent* 2009;37:903-8.

19. Pashley D, Okabe A, Parham P. The relationship between dentin microhardness and tubule density. *Endod Dent Traumatol.* 1985;1:176-179.
20. Patterson SS. In vivo and in vitro studies of the effect of the disodium salt of ethylenediamine tetra-acetate on human dentine and its endodontic implications. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1963;16:83-103.
21. Rossi-Fedele G, Figueiredo JA, Steier L, Canullo L, Steier G, Roberts AP. Evaluation of the antimicrobial effect of super-oxidized water (Sterilox®) and sodium hypochlorite against *Enterococcus faecalis* in a bovine root canal model. *J Appl Oral Sci.* 2010;18:498-502.
22. Rossi-Fedele G, Dogramaci EJ, Steier L, de Figueiredo JA. Some factors influencing the stability of Sterilox®, a super-oxidised water. *Br Dent J.* 2011;210:E23.
23. Rossi-Fedele G, Steier L, Dogramaci EJ, Canullo L, Steier G, de Figueiredo JA. Bovine pulp tissue dissolution ability of HealOzone(R), Aquatine Alpha Electrolyte(R) and sodium hypochlorite. *Aust Endod J* 2013;39:57-61.
24. Saleh AA, Ettman WM. Effect of endodontic irrigation solutions on microhardness of root canal dentine. *J Dent.* 1999;27:43-46.
25. Schilke R, Lisson JA, Bauss O, Geurtsen W. Comparison of the number and diameter of dentinal tubules in human and bovine dentine by scanning electron microscopic investigation. *Arch Oral Biol.* 2000;45:355-361.
26. Serper A, Calt S, Dogan AL, Guc D, Ozcelik B, Kuraner T. Comparison of the cytotoxic effects and smear layer removing capacity of oxidative potential water, NaOCl and EDTA. *J Oral Sci.* 2001;43:233-238.
27. Shetty N, Srinivasan S, Holton J, Ridgway GL. Evaluation of microbicidal activity of a new disinfectant: Sterilox 2500 against *Clostridium difficile* spores, *Helicobacter pylori*, vancomycin resistant *Enterococcus* species, *Candida albicans* and several *Mycobacterium* species. *J Hosp Infect.* 1999;41:101-105.
28. Siqueira JF, Jr., Rocas IN, Santos SR, Lima KC, Magalhaes FA, de Uzeda M. Efficacy of instrumentation techniques and irrigation regimens in reducing the bacterial population within root canals. *J Endod.* 2002;28:181-184.

29. Slutzky-Goldberg I, Liberman R, Heling I. The effect of instrumentation with two different file types, each with 2.5% NaOCl irrigation on the microhardness of root dentin. *J Endod.* 2002;28:311-312.
30. Slutzky-Goldberg I, Maree M, Liberman R, Heling I. Effect of sodium hypochlorite on dentin microhardness. *J Endod.* 2004;30:880-882.
31. Solovyeva AM, Dummer PM. Cleaning effectiveness of root canal irrigation with electrochemically activated anolyte and catholyte solutions: a pilot study. *Int Endod J.* 2000;33:494-504.
32. Van Meerbeek B, Willems G, Celis JP, Roos JR, Braem M, Lambrechts P et al. Assessment by nano-indentation of the hardness and elasticity of the resin-dentin bonding area. *J Dent Res.* 1993;72:1434-1442.

Figure Legend

Figure 1. Dentin microhardness after different irrigation protocols. Asterisk indicates statistically significant difference between distance 1 and 2 ($P < 0.05$). Horizontal bar indicates statistically significant difference between groups in the same distance ($P < 0.05$).

Dentin Microhardness

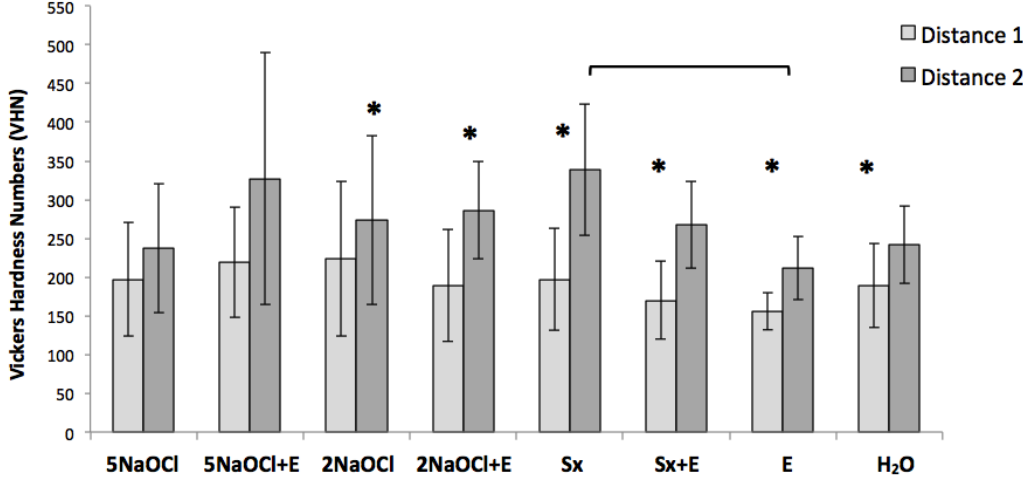


Figure 1

4 CAPÍTULO II

Artigo 2

Effect of super-oxidized water and sodium hypochlorite, associated or not with EDTA, on organic and inorganic structures of bovine root dentin

Formatado conforme diretrizes do periódico *Journal of Endodontics*, Qualis A1 e Fator de impacto 2,929.

Effect of super-oxidized water and sodium hypochlorite, associated or not with EDTA, on organic and inorganic structures of bovine root dentin

Alexandre Corrêa Ghisi¹, DDS, MSc, Patrícia Maria Poli Kopper², DDS, MSc, PhD, Flávia E. R. Baldasso², DDS, Carolina P. Stürmer¹, DDS, Giampiero Rossi-Fedele³, DDS, MSc, PhD, Renata Dornelles Morgental¹, DDS, MSc, PhD, Fabiana Vieira Vier-Pelisser¹, DDS, MSc, PhD.

1 - Department of Endodontics; School of Dentistry, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil;

2 - Department of Conservative Dentistry; School of Dentistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

3 – Department of Endodontics; Dentistry, Warwick Medical School, Warwick, United Kingdom.

Corresponding author:

Alexandre Corrêa Ghisi / Fabiana Vieira Vier-Pelisser
Graduate Program in Dentistry
Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul – PUCRS
Av. Ipiranga 6681, Prédio 6
CEP 90619-900
Porto Alegre – RS – Brazil
Phone: 55 51 3320 3562
Email: aghisi@terra.com.br / endopelisser@gmail.com

Abstract

Introduction: The present study aimed to evaluate the effects of a super-oxidized water (400 ppm Sterilox[®] - Sx), 5% and 2% sodium hypochlorite (5 and 2NaOCl) and 17% EDTA (E) on the organic and inorganic components of bovine dentin. **Methods:** Eighty bovine incisors were randomly divided into eight groups (n=10): 5NaOCl, 2NaOCl, Sx, associated (5NaOCl+E, 2NaOCl+E, Sx+E) or not (5NaOCl, 2NaOCl, Sx) with E (as final irrigant for 5 min), E alone, and distilled water (H₂O), as the negative control. Classical root canal instrumentation was performed, using the corresponding irrigation solution for 30 minutes. Apical 15 mm were longitudinally sectioned into two fragments; one for light microscopy (LM) analysis, in slides stained with Picosirius red (organic component), and the other for scanning electron microscopy (SEM) analysis (inorganic structure). Scores data obtained in the LM analysis were submitted to the Kruskal-Wallis test followed by multiple comparisons test (P<.05). SEM images were analyzed descriptively. **Results:** The higher the concentration of NaOCl, the greater its effect on the organic component of dentin in area and depth. 5NaOCl+E, 5NaOCl and 2NaOCl+E caused the greatest change in the collagenous organic matrix near the root canal lumen. 2NaOCl showed similar behavior to Sx, associated or not with E, promoting more superficial disorganization of collagen in a smaller area. Demineralization was observed in all groups in which E was employed. However, areas of erosion and open dentinal tubules were detected only when it was combined with NaOCl. **Conclusions:** 5NaOCl should be used with caution, since it promotes extensive damage to the organic component of dentin. Sx could be an alternative for NaOCl. EDTA alone caused demineralization and, when associated with NaOCl, promoted areas of erosion and open dentinal tubules.

Key Words: collagen matrix, dentin, EDTA, sodium hypochlorite, Sterilox, super-oxidized water, SEM, demineralization.

Introduction

The use of auxiliary chemical substances is essential for endodontic treatment success. However, these substances alter the dentin structure, mainly collagen, which may cause negative effects on its mechanical properties (1-3). As a consequence, the union of dental materials, especially adhesive systems, to dentin may be compromised, impairing the durability of cemented intracanal posts and restorations, or even dentin fracture strength may be affected (4).

Sodium hypochlorite (NaOCl), a chemical solution widely used in concentrations ranging from 0.5% to 6%, has high antimicrobial activity and is effective in dissolving organic tissues (5). However, it has well-known cytotoxic effects (6) and leads to the degradation of dentin matrix components, especially collagen (7).

Because of these limitations of NaOCl, a better root canal irrigant is still being searched for. Sterilox[®] solution, initially used in the disinfection of endoscopes in health care facilities (8, 9), has been suggested for endodontic use. This solution is obtained by the electrolysis of a saline solution, in a process similar to that used in the commercial production of sodium hypochlorite. It is also known as "electrochemically activated water" or "super-oxidized water" and shows low toxicity (10). Furthermore, it has been shown that Sterilox[®] presents favorable antimicrobial potential (11, 12), and such property is reduced in the presence of organic matter (8). Although the literature reveals a promising future for its use in endodontics, some features, such as its effect on dentin structure, need to be further investigated.

It is also a known fact that chelating agents such as EDTA are important auxiliary substances in root canal cleaning, particularly for removing the smear layer created by chemomechanical preparation (13, 14). However, their demineralizer effect promotes changes in the most superficial inorganic layer of dentin as well as in its physicochemical properties (15).

To investigate the effects of auxiliary chemical substances on the organic components of dentin, Picrosirius red staining and light microscopy have been

used (16, 17). This methodology allows a better view of collagenous structures. On the other hand, changes in the inorganic layer of dentinal walls caused by these agents have been analyzed by scanning electron microscopy (17).

Thus, the purpose of this study was to evaluate the effect of Sterilox[®], 5% and 2% sodium hypochlorite, associated or not with 17% EDTA, in the collagen matrix and in the topography of the inorganic matrix of bovine root dentin.

Materials and Methods

Eight (80) bovine incisors were used in this study. Their crowns and cervical portions were removed and the root length was standardized at 20 mm. Specimens were stored in distilled water and then randomly divided into eight groups (n=10), considering the irrigating solutions used during chemomechanical preparation: 5% NaOCl (5NaOCl), 2% NaOCl (2NaOCl), 400 ppm Sterilox[®] (Sx) and 17% EDTA (E) used individually; 5% NaOCl and 17% EDTA (5NaOCl+E); 2% NaOCl and 17% EDTA (2NaOCl+E); 400 ppm Sterilox[®] and 17% EDTA (Sx+E) (groups associated with final irrigation of EDTA for 5 min); and distilled water (H₂O) – negative control.

Root canal preparations were performed by a single and calibrated operator. For this purpose, specimens were attached to a fixing device (NBLBC; Neboluz, São Paulo, Brazil). First, 2 mL of the corresponding irrigating solution were used, and the root canal was explored with a size #35 K-file (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Switzerland). It was inserted until its tip was visible at the apical foramen and the working length (WL) was determined by reducing 1 mm from the total canal length. Afterwards, the root canal was instrumented by the classical technique (18). The first instrument was the one that fitted the canal walls at full WL and the last instrument was a size #80 K-file.

Sterilox[®] solution (Optident Dental, Ilkley, West Yorkshire, UK) was obtained about fifteen minutes before use by a double passage of sodium chloride solution into titanium electrodes, using the Sterilox Dental System

(Optident Dental). Moreover, NaOCl and EDTA solutions were prepared (CIENTEC - Science and Technology Foundation, Porto Alegre, RS, Brazil) seven days prior to use and stored away from light at room temperature.

Irrigating solutions were delivered by a 10 mL disposable plastic syringe (BD - Becton Dickinson, São Paulo, SP, Brazil) and a 30G Endo-Eze® needle (Ultradent Products Inc., South Jordan, UT). Simultaneously, a n. 20 cannula (Indusbello, Londina, PR, Brazil) was adapted to the root canal entrance for suction. At each instrument change, irrigation/suction were carried out, with 2 mL of the corresponding solution, using back and forth movements. Needle penetration reached up to 3 mm short of the WL in order to permit irrigating solution reflux.

The total time for each irrigation protocol was standardized at 30 minutes. In the groups with final irrigation (5NaOCl+E, 2NaOCl+E and Sx+E), 2 mL of EDTA were used and remained for extra 5 minutes in the root canal. At the end, 2 mL of NaOCl or Sx were employed. All canals were dried with size #80 absorbent paper points (Tanari; Tanariman Industrial Ltda, Manacapuru, AM, Brazil).

After root canal preparation, apical 15 mm of each sample were sectioned perpendicular to its long axis and then cleaved longitudinally into two halves; one was designated for LM analysis (n=10 per group) and the other for SEM analysis (n=10 per group).

Light Microscopy (LM)

After decalcification, dehydration and inclusion of the samples, 6- μ m-thick slices were obtained and stained with Picrosirius red. A representative section of each root canal third was examined under a light microscope (Olympus BX50; Olympus Optical Co. Ltd., Tokyo, Japan), at 40 to 400X magnifications, by a calibrated operator ($Kappa=0.855$), blinded to the experimental groups.

The following scores were assigned to the sections, considering the lack of parallel orientation and organization of collagen fibers near the root canal lumen, as well as the presence of gaps between them, featuring a discontinuous outline of the root canal (RC) perimeter:

- Score 0: organized collagen fibers, arranged parallel to each other and homogeneous contour of the RC lumen;
- Score 1: collagen fibers showing an altered pattern with discontinuous and irregular contour of the RC lumen in up to 25% of the analyzed structure;
- Score 2: collagen fibers showing an altered pattern with discontinuous and irregular contour of the RC lumen in up to 50% of the analyzed structure;
- Score 3: collagen fibers showing an altered pattern with discontinuous and irregular contour of the RC lumen in more than 50% of the analyzed structure.
- Score 4: collagen fibers showing an altered pattern with discontinuous and irregular contour of the RC lumen throughout the analyzed structure.

The final score of each sample corresponded to the root canal third in which the damage to the organic structure was more expressive. Data were submitted to the Kruskal-Wallis test followed by multiple comparisons test at 5% significance level.

Scanning Electron Microscopy (SEM)

Samples were fixed in 2.5% glutaraldehyde (Miyako, Guarulhos, SP, Brazil) overnight, mounted on stubs with the root canal portion facing upward, dried and then sputter coated with 150-Å thick gold (BAL-TEC SCD 005; Balzer, Lichtenstein).

Topography of the inorganic matrix of the root canal walls was analyzed under a scanning electron microscope (Phillips XL-30, Eindhoven, Netherlands) using secondary electrons (SE) emission. SEM images were evaluated by a single examiner, blinded to the experimental groups. The areas examined were

those corresponding to dentinal tubules of the coronal third, near the root canal lumen, exposed due to the root cleavage, at 1000× and 1500× magnification.

The parallelism between dentinal tubules, their obliteration and the presence of areas of erosion (divergence of tubules orientation near the root canal lumen) were indicated descriptively in each group.

Results

LM

The effects caused by irrigating solutions on the organic component of dentin are expressed in Table 1.

In general, the higher the concentration of NaOCl, the greater the effect, in area and depth, on the organic component of dentin. Moreover, its association with EDTA appears to have increased this deleterious effect.

5NaOCl+E group caused an expressive damage to the collagen layer near the canal lumen, also advancing deep into the root dentin (Figure 1A and B). This group showed the highest mean rank, but did not differ from 5NaOCl and 2NaOCl+E. When 5NaOCl was used (Figure 1A, B and C), the damage to collagen was higher than 2NaOCl (Figure 1D and E), regardless of their association with EDTA.

In the 2NaOCl group, the effect on collagen was statistically similar to Sx and Sx+E. Although these substances have caused some alteration, with more superficially disorganized collagen in a small area (Figure 1E, F and G), it was significantly lower than that displayed by 5NaOCl, 5NaOCl+E and 2NaOCl+E.

The isolated use of EDTA and distilled water had no effect on the organic component of dentin (Figure 1H and I). In the group where EDTA was used alone it was observed a higher concentration of organic matter near the root canal space (Figure 1H).

SEM

EDTA, alone or associated with other solutions, caused areas of erosion, i.e., divergence in dentinal tubules orientation, associated with open tubules, without smear layer (Figure 2A-D).

In 2NaOCl, 5NaOCl and Sx groups, where EDTA was not applied as a final irrigant, no loss of dentin structure was observed. Dentinal tubules were obliterated by smear layer and showed a parallel arrangement (Figure 2E and F).

Samples treated with distilled water showed no effect on the inorganic component of dentin. However, a massive presence of pulpal debris was observed, obliterating the dentinal tubules.

Discussion

Although several studies address the properties of chemical substances used during chemomechanical preparation, information about the influence of these substances on the organic component of dentin is scarce (17). This aspect is important because collagen is essential for resin-dentin bonds, considering either restorative materials or endodontic sealers. Bonding efficiency of contemporary adhesive systems to the dentin substrate depends on several factors, such as the integrity of dentin collagen. Furthermore, the implications for dental fracture strength need to be further elucidated, since the literature reports structural changes caused by NaOCl, which may compromise tooth resistance, depending on certain factors related to its use, especially the concentration (19).

Another implication related to NaOCl use is a decrease in the rigidity of root-treated teeth, which provides a greater tendency to fracture. This probability is clinically relevant because it can lead to tooth loss. However, the most important factors that predispose a tooth to fracture are dental structure loss produced by carious lesions or endodontic access cavities. Probably, the interaction of all these factors, cumulatively, influences the occurrence of

fracture (2). The harmful effects of NaOCl, such as toxicity (6) and collagen degradation (7), are well recognized, but some beneficial properties of this substance are still surpassing as the ability to dissolve organic matter (20) and the antimicrobial potential (12).

In this context, the present study compared the effects of NaOCl with a super-oxidized water (Sterilox[®]), a not yet common irrigating solution. The product was prepared just before use to avoid changes in its properties, since the period that it remains stable if stored under ideal conditions is 14 days (21). Similar caution was taken with NaOCl and EDTA solutions.

Bovine incisors were used in this study because of their availability and the similarities between human and bovine dentin, especially regarding the number and diameter of dentinal tubules (22, 23). Yet, bovine teeth, derived from animals of similar genetic lineage and dietary environment, might show higher homogeneity of mineral composition than different human teeth, which are collected from various donors with diverse dietary or fluoride supplementation (24, 25).

The images obtained under LM allowed analyzing the effect of different irrigating solutions on the organic component of dentin, since Picrosirius red is a specific stain for collagen visualization (17). It was noticed major damage on collagen when 5NaOCl was used (Figure 1 A, B and C), regardless of their association with EDTA, if compared to a less concentrated solution, 2NaOCl (Figure 1D and F). It has been shown that NaOCl dissolves the collagen by breaking down bonds between carbon atoms and disorganizing the protein primary structure (26).

Also, EDTA associated with NaOCl appears to have increased the degradation of collagen. Although no statistically significant difference was observed, average ranks of 5NaOCl+E (Figure 1A and B) and 2NaOCl+E (Figure 1D) were higher than 5NaOCl (Figure 1C) and 2NaOCl (Figure 1D), respectively. In addition, EDTA combined with NaOCl seems to have caused an increased damage in depth. This effect results from the alternating action of

NaOCl, which dissolves the organic components, and EDTA, which demineralizes the inorganic components of dentin (27).

On the other hand, when the samples were individually treated with EDTA, no structural changes were observed in the organic matrix of dentin. These findings are in accordance with those of Moreira et al (17), however are conflicting with other studies (13, 28). These controversial results may be explained by differences in methodology. In addition, the single use of EDTA resulted in greater concentrations of organic matter near the root canal lumen (Figure 1H), indicated by the higher concentration of stain in that area, demonstrating their inability to degrade organic materials (17). Thus, once again it is reinforced the importance of irrigation regimes where different solutions are associated, in order to optimize their properties, so that one potentiates the beneficial effect of the other, with no interference between them, which could have a deleterious effect on the endodontic treatment outcome.

Sx showed a slight effect on the organic component of dentin in some samples (Figure 1G), while in others it demonstrated a normal aspect with parallel collagen fibers and integrity of the root canal perimeter (Figure 1F). In this regard, Sx proves to be an alternative irrigating solution, especially if the aim is to improve bonding ability of resinous materials and decrease the impact on fracture resistance.

Regarding SEM analysis, only the coronal third of the root canals was evaluated, since it shows higher number and diameter of dentinal tubules compared to the other segments. Moreover, the use of adhesive systems for the cementation of intracanal posts at that location has been a routine procedure in prosthetic rehabilitation of endodontically treated teeth. Photomicrographs were taken in order to illustrate structural changes in the inorganic matrix of the dentin wall caused by the auxiliary chemical substances.

SEM results revealed that a combination of EDTA and NaOCl causes areas of erosion near the root canal lumen, associated with wide-open tubules (Figure 2A and B), in agreement with the reports of Baumgartner and Mader (27) and Moreira et al (17). The first investigation suggests that EDTA

associated with NaOCl causes a progressive dissolution of dentin at the expense of the peritubular and intertubular dentin. This is due to the alternating action of these substances as mentioned above (27). However, the isolated use of NaOCl and Sx did not cause significant changes in the inorganic matrix, showing the absence of demineralizing action.

According to the results of this study, the indication of 5NaOCl as a root canal irrigant should be questioned, once this substance acts intensively in the organic component of dentin, not only superficially but also in depth. This action can have a detrimental effect on tooth strength, as well as compromise the adhesion of restorative materials. Thus, the use of a 2% solution would be preferable for clinical use, since it aggregates the properties of a relatively concentrated solution with less harmful effects to the periapical tissues and the organic component of dentin.

Finally, the search for safe and efficient irrigation protocols with alternative substances to NaOCl should be encouraged. The present results indicate Sterilox® as a promising irrigating solution, despite its limitations as the ineffectiveness in dissolving organic tissues (20). However, additional research is needed to find the optimal concentration of chlorine and the stability of their properties.

Conclusions

Based on the present methodology and results, it is possible to conclude that 5% NaOCl, whether associated or not with 17% EDTA, causes significant changes in dentin collagen. On the other hand, 2% NaOCl has a behavior similar to 400 ppm Sterilox®, combined or not with 17% EDTA, promoting more superficial disorganization of collagen in a smaller area when compared to 5% NaOCl. Regarding modifications of inorganic structures, demineralization areas were detected in all groups in which EDTA was employed. However, areas of erosion and open tubules were observed only when it was combined with NaOCl.

References

1. Grigoratos D, Knowles J, Ng YL, Gulabivala K. Effect of exposing dentine to sodium hypochlorite and calcium hydroxide on its flexural strength and elastic modulus. *Int Endod J* 2001;34:113-9.
2. Sim TP, Knowles JC, Ng YL, Shelton J, Gulabivala K. Effect of sodium hypochlorite on mechanical properties of dentine and tooth surface strain. *Int Endod J* 2001;34:120-32.
3. Marending M, Luder HU, Brunner TJ, Knecht S, Stark WJ, Zehnder M. Effect of sodium hypochlorite on human root dentine--mechanical, chemical and structural evaluation. *Int Endod J* 2007;40:786-93.
4. Morris MD, Lee KW, Agee KA, Bouillaguet S, Pashley DH. Effects of sodium hypochlorite and RC-prep on bond strengths of resin cement to endodontic surfaces. *J Endod* 2001;27:753-7.
5. Estrela C, Estrela CR, Barbin EL, Spano JC, Marchesan MA, Pecora JD. Mechanism of action of sodium hypochlorite. *Braz Dent J* 2002;13:113-7.
6. Pashley EL, Birdsong NL, Bowman K, Pashley DH. Cytotoxic effects of NaOCl on vital tissue. *J Endod* 1985;11:525-8.
7. Oyarzun A, Cordero AM, Whittle M. Immunohistochemical evaluation of the effects of sodium hypochlorite on dentin collagen and glycosaminoglycans. *J Endod* 2002;28:152-6.
8. Shetty N, Srinivasan S, Holton J, Ridgway GL. Evaluation of microbicidal activity of a new disinfectant: Sterilox 2500 against *Clostridium difficile* spores, *Helicobacter pylori*, vancomycin resistant *Enterococcus* species, *Candida albicans* and several *Mycobacterium* species. *J Hosp Infect* 1999;41:101-5.
9. Selkon JB, Babb JR, Morris R. Evaluation of the antimicrobial activity of a new super-oxidized water, Sterilox, for the disinfection of endoscopes. *J Hosp Infect* 1999;41:59-70.
10. Serper A, Calt S, Dogan AL, Guc D, Ozcelik B, Kuraner T. Comparison of the cytotoxic effects and smear layer removing capacity of oxidative potential water, NaOCl and EDTA. *J Oral Sci* 2001;43:233-8.

11. Gulabivala K, Stock CJ, Lewsey JD, Ghori S, Ng YL, Spratt DA. Effectiveness of electrochemically activated water as an irrigant in an infected tooth model. *Int Endod J* 2004;37:624-31.
12. Rossi-Fedele G, Figueiredo JA, Steier L, Canullo L, Steier G, Roberts AP. Evaluation of the antimicrobial effect of super-oxidized water (Sterilox(R)) and sodium hypochlorite against *Enterococcus faecalis* in a bovine root canal model. *J Appl Oral Sci* 2010;18:498-502.
13. Garberoglio R, Becce C. Smear layer removal by root canal irrigants. A comparative scanning electron microscopic study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1994;78:359-67.
14. Cruz-Filho AM, Sousa-Neto MD, Savioli RN, Silva RG, Vansan LP, Pecora JD. Effect of chelating solutions on the microhardness of root canal lumen dentin. *J Endod* 2011;37:358-62.
15. Kishen A, Sum CP, Mathew S, Lim CT. Influence of irrigation regimens on the adherence of *Enterococcus faecalis* to root canal dentin. *J Endod* 2008;34:850-4.
16. Roush JK, Breur GJ, Wilson JW. Picrosirius red staining of dental structures. *Stain Technol* 1988;63:363-7.
17. Moreira DM, Almeida JF, Ferraz CC, Gomes BP, Line SR, Zaia AA. Structural analysis of bovine root dentin after use of different endodontics auxiliary chemical substances. *J Endod* 2009;35:1023-7.
18. Ingle JI. A standardized endodontic technique utilizing newly designed instruments and filling materials. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1961;14:83-91.
19. Pascon FM, Kantovitz KR, Sacramento PA, Nobre-dos-Santos M, Puppini-Rontani RM. Effect of sodium hypochlorite on dentine mechanical properties. A review. *J Dent* 2009;37:903-8.
20. Rossi-Fedele G, Steier L, Dogramaci EJ, Canullo L, Steier G, de Figueiredo JA. Bovine pulp tissue dissolution ability of HealOzone(R), Aquatine Alpha Electrolyte(R) and sodium hypochlorite. *Aust Endod J* 2013;39:57-61.
21. Rossi-Fedele G, Dogramaci EJ, Steier L, de Figueiredo JA. Some factors influencing the stability of Sterilox((R)), a super-oxidised water. *Br Dent J* 2011;210:E23.

22. Schilke R, Lisson JA, Bauss O, Geurtsen W. Comparison of the number and diameter of dentinal tubules in human and bovine dentine by scanning electron microscopic investigation. *Arch Oral Biol* 2000;45:355-61.
23. Camargo CH, Siviero M, Camargo SE, de Oliveira SH, Carvalho CA, Valera MC. Topographical, diametral, and quantitative analysis of dentin tubules in the root canals of human and bovine teeth. *J Endod* 2007;33:422-6.
24. Wegehaupt F, Gries D, Wiegand A, Attin T. Is bovine dentine an appropriate substitute for human dentine in erosion/abrasion tests? *J Oral Rehabil* 2008;35:390-4.
25. Wegehaupt FJ, Widmer R, Attin T. Is bovine dentine an appropriate substitute in abrasion studies? *Clin Oral Investig* 2010;14:201-5.
26. Ishizuka T, Kataoka H, Yoshioka T, Suda H, Iwasaki N, Takahashi H, et al. Effect of NaClO treatment on bonding to root canal dentin using a new evaluation method. *Dent Mater J* 2001;20:24-33.
27. Baumgartner JC, Mader CL. A scanning electron microscopic evaluation of four root canal irrigation regimens. *J Endod* 1987;13:147-57.
28. Calt S, Serper A. Time-dependent effects of EDTA on dentin structures. *J Endod* 2002;28:17-9.

Table 1. Mean ranks of the effect caused by irrigating solutions on the organic component of dentin close to the root canal lumen.

Escore	Grupo							
	5NaOCl+E	5NaOCl	2NaOCl+E	2NaOCl	Sx+E	Sx	E	H ₂ O
0	0	0	0	2	5	0	6	8
1	0	1	1	2	2	6	0	1
2	0	2	2	2	1	2	0	0
3	1	5	5	1	2	1	0	0
4	9	2	0	0	0	0	0	0
Total	10	10	8	7	10	9	6	9
Mean rank	62.1 ^A	50.4 ^{AB}	46.9 ^{ACD}	30.9 ^{CE}	20.3 ^{EF}	34.7 ^{DE}	11.0 ^{FG}	13.1 ^{FG}

Mean ranks followed by distinct letters differ significantly, according to the non-parametric Kruskal-Wallis test, complemented by multiple comparisons Student-Newman-Keuls test, at 5% significance level.

Figure Legends

Figure 1. Histological sections stained with Picrosirius red showing the effect of irrigating solutions on the organic component of dentin, near the root canal lumen. A - note the distinguished effect of 5NaOCl+E in depth and along the entire perimeter of the root canal, altering the structural pattern of collagen fibers, including loss of substance. The root canal outline is discontinuous (score 4); B – magnification of the area traced in A, with disoriented collagen fibers and loss of substance; C - 5NaOCl with score 3, since the damage was detected in more than 50% of the perimeter, D - 2NaOCl+E - score 3; E - 2NaOCl - score 3. Note that the damage created by 2NaOCl (D and E) was smaller than that caused by 5NaOCl (A, B and C), regardless of their association with EDTA. Also, in groups where 2NaOCl and Sx (D, E and G) were used, the prejudice was more superficial and in a smaller area of the root canal; F, H and I – Sx+E, E and H₂O, respectively - score 0 (no damage to the collagen fibers and continuous root canal outline. EDTA alone resulted in higher concentration of organic matter close to the canal space (H); G – Sx with score 1 (A, C, D, E, F, G, H and I - $\times 100$, B - $\times 400$).

Figure 2. SEM images ($\times 1000$ and $\times 1500$) showing the effects caused by irrigating solutions on the inorganic component of dentin. A and B - 5NaOCl+E and 2NaOCl+E, respectively. Both indicate extensive areas of erosion associated with open dentinal tubules with a divergent arrangement near the root canal lumen (arrows), C - Sx+E showing parallelism between tubules (absence of demineralization), D - EDTA showing less intense demineralization, while maintaining parallelism between tubules, E and F - 2NaOCl and SX, respectively. No demineralized areas and parallel tubules, obliteration by smear layer (*) - (A-B $\times 1500$, $\times 1000$ C-F).

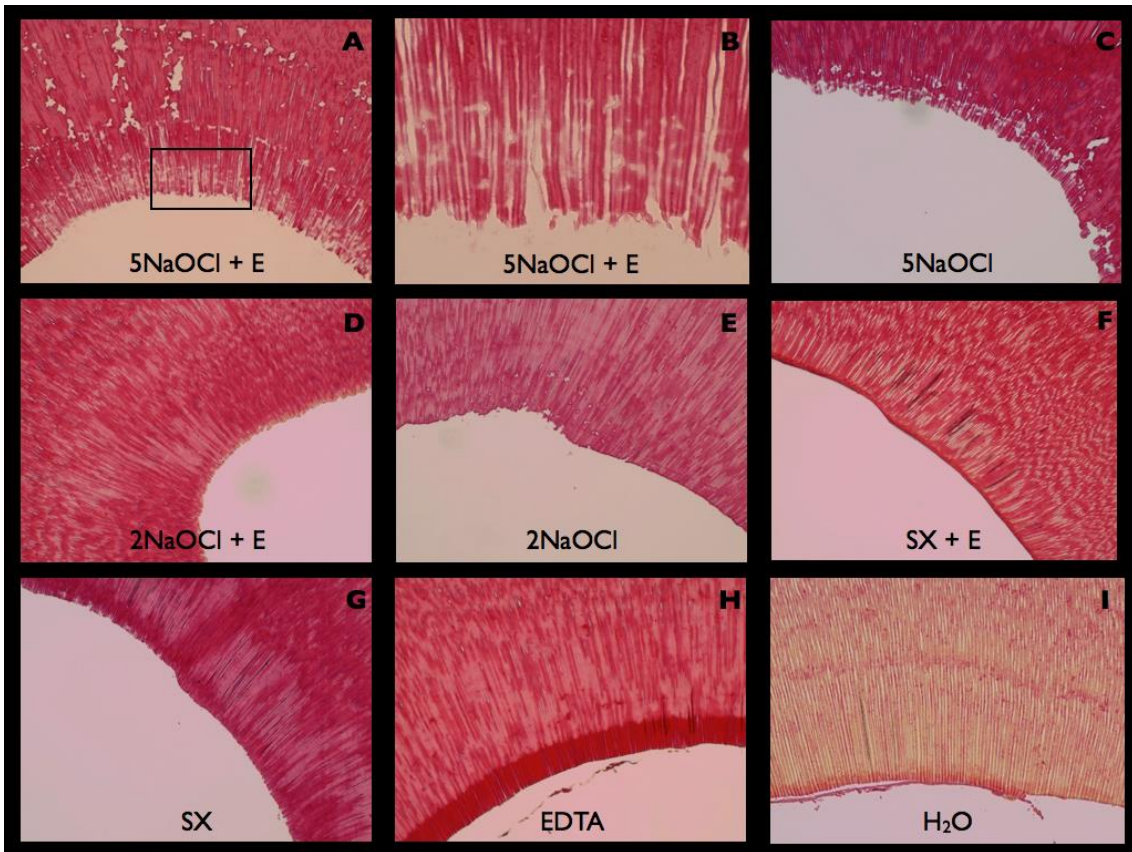


Figure 1

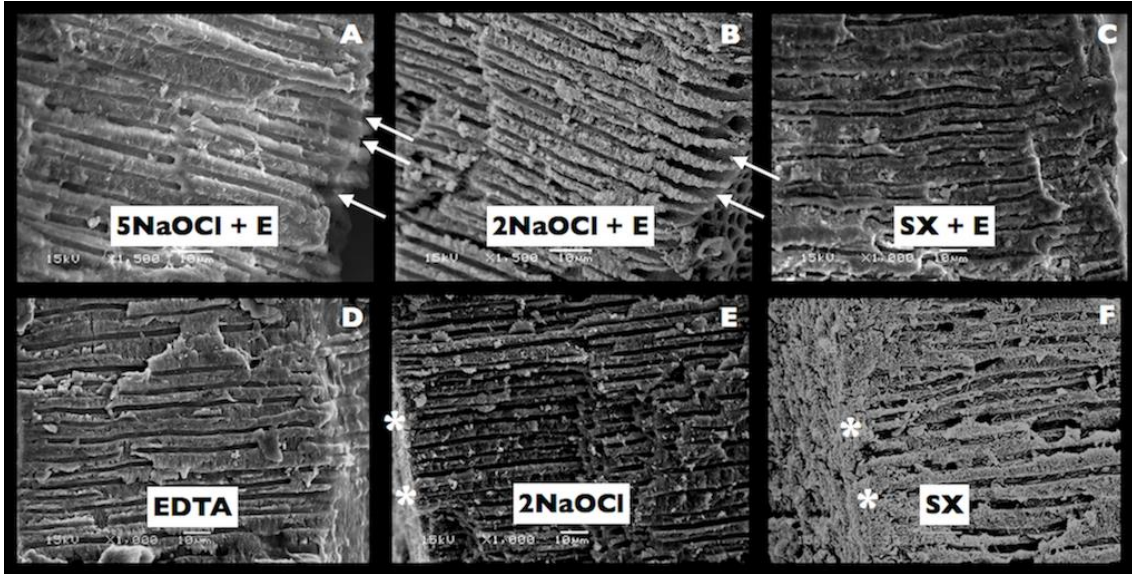


Figure 2

5 DISCUSSÃO

A importância do emprego de substâncias químicas auxiliares para o sucesso do tratamento endodôntico é plenamente reconhecida na literatura. Essas substâncias têm por objetivo promover a dissolução de tecidos orgânicos, vivos ou necrosados, a eliminação ou redução de microorganismos tanto quanto possível, e a suspensão e remoção de detritos formados durante a instrumentação (Safavi et al., 1990; Zehnder, 2006).

Muita atenção é dada ao potencial antimicrobiano dos agentes irrigantes e à capacidade de limpeza atingida por eles durante o preparo químico-mecânico. Com isso, diversas soluções são utilizadas em concentrações elevadas privilegiando essas propriedades. Em contrapartida, essa conduta clínica pode aumentar a ocorrência de efeitos adversos sobre as propriedades mecânicas da dentina, principalmente, ocasionando degradação do colágeno. Alguns desses irrigantes são capazes de alterar a composição química da dentina, modificando a proporção cálcio/fósforo na superfície dentinária, alterando também a proporção original entre componentes orgânicos e inorgânicos, provocando modificações nas características de permeabilidade e solubilidade deste tecido, afetando, conseqüentemente, a adesão de materiais odontológicos à estrutura dentinária (Doğan & Çalt, 2001).

Neste contexto, o hipoclorito de sódio, que é uma das soluções mais empregadas em Endodontia, em concentrações que variam de 0,5 % a 6%, reconhecidamente produz alterações significativas no colágeno da dentina. Por ser um agente proteolítico, não específico, capaz de remover matéria orgânica, causa não só a dissolução de tecido pulpar e remanescentes necróticos desse tecido, mas também uma degeneração na dentina através da dissolução do colágeno. Essa degeneração, somando-se a outros fatores, ocasiona a diminuição da resistência do elemento dentário (Pascon et al., 2009; Moreira et al., 2009)

O componente inorgânico da dentina (70%) é composto predominantemente por hidroxiapatita. O colágeno, por sua vez, representa 91% da fase orgânica da estrutura dentinária (20%), serve como matriz para deposição de cristais de apatita e, também, exerce papel importante para a

adesão de materiais resinosos e conseqüentemente para resistência do dente. A literatura mostra também que quanto maior a concentração do NaOCl maior é a sua capacidade de dissolução de tecidos, no entanto, maior também são seus efeitos deletérios na estrutura dentinária (Pashley et al., 1985; Pascon et al., 2009). Apesar disso, existem poucas informações sobre as conseqüências do emprego das substâncias químicas nas propriedades mecânicas da estrutura dentinária e suas repercussões.

Este fato motivou nosso estudo que buscou comparar os efeitos das soluções de NaOCl 2% e 5% com a solução de Sterilox[®], associados ao EDTA 17% ou não, sobre a microdureza da dentina e sobre os componentes orgânicos e inorgânicos dessa estrutura. E, com isso, buscar uma alternativa ao hipoclorito de sódio, visando diminuir os danos aos componentes da parede dentinária.

O estudo da microdureza dentinária é uma questão importante para a Odontologia Restauradora, principalmente porque sua redução produz um efeito negativo sobre os componentes minerais da dentina, afetando a adesão e a capacidade de selamento de materiais dentários (Dogan & Çalt, 2001; Pascon et al., 2009). No entanto, com o emprego de cimentos endodônticos resinosos, o conhecimento do assunto se torna fundamental também para a Endodontia.

Em razão das limitações para obtenção de dentes humanos para o estudo, os experimentos foram realizados em dentes bovinos, que possuem características semelhantes aos humanos quanto ao número e diâmetro dos túbulos dentinários (Schilke et al., 2000). Segundo Camargo et al. (2007), o número e o diâmetro dos túbulos dentinários são determinantes para a penetração e subseqüentes efeitos dos agentes terapêuticos aplicados diretamente sobre a dentina. De acordo com Pashley et al. (1985) há correlação inversa entre a microdureza dentinária e a densidade dos túbulos dentinários. Considerando que próximo à luz do canal radicular há maior densidade de túbulos, atribui-se a esse fator a menor resistência da região. A menor dureza da dentina humana na junção cimento-dentinária e nas proximidades da superfície do canal radicular foi sugerida no trabalho de Patterson (1963).

Estudos anteriores avaliaram a microdureza dentinária utilizando dois métodos de indentação, Knoop e Vickers. Nestes, as soluções irrigadoras foram comparadas com um grupo controle: água destilada (Ari et al., 2004), soro fisiológico (Slutzky-Goldberg et al., 2004) ou nenhum irrigante (Cruz-Filho et al., 2011). Apesar de alguns trabalhos sugerirem menor sensibilidade da dureza Vickers às condições superficiais (Cruz-Filho et al., 2011), este método tem amparo na literatura (Slutzky-Goldberg et al., 2002, 2004; Ari et al., 2004) quando a proposta é comparar a redução da microdureza dentinária superficial com áreas mais profundas. Por essa razão o Teste de Dureza Vickers foi selecionado para o estudo, programado com força de 300 g por 10 s, perpendicular à indentação.

O tempo de ação dos regimes de irrigação foi padronizado em 30 min combinados com o preparo mecânico, pois, de acordo com Slutzky-Goldberg et al. (2002), o período de irrigação tem efeito crucial na microdureza dentinária. Dessa maneira, reproduziu-se a condição clínica, onde a irrigação é realizada no período em que o preparo mecânico está sendo realizado. O mesmo não ocorreu nos estudos de Ari et al. (2004), que mergulharam as amostras de dentina nas soluções testadas por 15 min, e de Cruz-Filho et al. (2011) que levaram as soluções diretamente sobre as amostras com micropipetas. Nesses estudos não foram realizadas medidas prévias de microdureza. As referidas investigações encontraram resultados com tendências semelhantes aos da presente, porém com algumas diferenças. Tal fato pode ser explicado pelas formas diversas de contato das soluções com a dentina. A redução da Microdureza Vickers observada no nosso estudo foi menor se comparada a esses trabalhos.

Os resultados do nosso estudo mostraram medidas menores de microdureza na distância 1, próxima à luz do canal radicular, se comparadas às medidas na distância 2, situada nas proximidades da superfície externa, exceto para os grupos NaOCl5 e NaOCl5 + E que não apresentaram diferenças significativas ($p > 0.05$). Era esperado que os valores de microdureza próximo à luz do canal fossem menores, conforme já relatado na literatura (Patterson, 1963). O fato de não ter sido observada diferença significativa entre as duas

distâncias nos grupos NaOCl5 e NaOCl5 + E pode ser atribuído à degradação do colágeno promovida pelo NaOCl em alta concentração e, conseqüentemente, à penetração da solução em maior profundidade.

O uso de agentes quelantes, como o EDTA, é sugerido para auxiliar o preparo químico-mecânico, uma vez que, agindo sobre o componente inorgânico da dentina, reduz significativamente a microdureza dentinária (Saleh e Ettman, 1999; Cruz-Filho et al., 2011) e facilita a ação dos instrumentos. Em nosso estudo, na distância 2, o EDTA usado isoladamente apresentou menor microdureza que o Sterilox®. Considera-se nesse fato que a solução de Sterilox® não tenha ação potente sobre a matéria orgânica e dificilmente poderá causar alguma alteração na camada de dentina próxima à superfície externa. Além disso, o tempo de contato da solução de EDTA (30 min), durante o regime de irrigação, foi maior que o habitual, o que provocou maior alteração também em profundidade.

Com o objetivo de encontrar mais evidências dos efeitos das substâncias químicas testadas sobre a estrutura dentinária, as modificações causadas por elas no componente orgânico em MO e no componente inorgânico em MEV também foram investigadas. A coloração picrossirius foi escolhida por ser específica para visualização de componentes orgânicos, conforme reportado no estudo de Moreira et al., 2009.

A análise das imagens em MO mostraram que o NaOCl 5%, associado ou não ao EDTA 17%, no período de 30 minutos durante o preparo, causou grande alteração morfológica da matriz orgânica e áreas de perda estrutural próximas ao canal. Isso se deve, provavelmente, ao seu efeito proteolítico que causa desnaturação das proteínas das fibras colágenas modificando a estrutura e removendo outras fibras. Essa matriz de colágeno modificada pela ação da solução torna-se um substrato de baixa qualidade para a adesão de materiais resinosos e, conseqüentemente, diminui a capacidade de selamento dos mesmos. Já o NaOCl 2% e o Sterilox®, quando associados ou não ao EDTA, apresentaram áreas menores e mais superficiais de desorganização do colágeno. Esses resultados sugerem que as concentrações mais elevadas de

NaOCl causam danos mais extensos e profundos a essa estrutura e, portanto, devem ser evitadas. Essa afirmação pode ser reforçada também pelos achados relativos a microdureza. Conforme já relatado, as altas concentrações do hipoclorito atuaram em profundidade, ocasionando uma redução desta também nas proximidades da superfície externa radicular, sendo comparável a da dentina próxima a luz do canal.

O EDTA, assim como a água destilada, não causou alterações na camada orgânica da dentina. Essa observação difere de outras pesquisas (Garberoglio & Becce, 1994 e Beltz et al., 2003) que relataram ação do EDTA também sobre os componentes orgânicos. Provavelmente as diferenças metodológicas entre os trabalhos sejam a razão para os resultados divergentes.

As imagens obtidas em MEV evidenciaram o efeito desmineralizador do EDTA que foi potencializado quando este foi associado ao NaOCl. Nesses casos, foi possível visualizar grandes áreas de erosão e túbulos dentinários abertos. Quando associado ao Sterilox® não foi possível observar o mesmo padrão, talvez porque a água superoxidada demonstrou ter um efeito muito suave sobre a matriz orgânica, deixando áreas mineralizadas menos expostas à ação do EDTA.

A partir do exposto e dos resultados obtidos em nosso estudo, foi possível concluir que o NaOCl 5%, associado ou não ao EDTA, promoveu maiores danos à matriz orgânica da dentina, tanto em área quanto em profundidade, e com evidente perda de substância. Essa associação causou também maior erosão no componente mineral e maiores áreas de túbulos dentinários abertos, justamente pela ação alternada dessas substâncias (Baumgartner & Mader, 1987). Com isso, pode-se sugerir que regimes de irrigação com o NaOCl 5% sejam evitados, visando diminuir o efeito sobre o colágeno. Além disso, a associação dessa substância com o EDTA deve ser igualmente evitada devido à possibilidade de grandes áreas de erosão sob risco de diminuir a resistência do elemento dentário.

A água superoxidada (Sterilox[®]), que promoveu alterações suaves no componente orgânico da dentina mesmo quando associada ao EDTA, pode ser uma alternativa ao emprego do NaOCl como irrigante endodôntico. No entanto, mais estudos são necessários a fim de aprimorá-la, principalmente, quanto à ineficácia na dissolução do tecido pulpar.

6 REFERÊNCIAS

- Ari H, Erdemir A, Belli S. Evaluation of the effect of endodontic irrigation solutions on the microhardness and roughness of root canal dentin. *J Endod* 2004;30:792-5.
- Barbosa SV, Safavi KE, Spangberg LSW. Influence of sodium Hypochlorite on the permeability and structure of cervical human dentine. *Int Endod J* 1994;27:309-312.
- Baumgartner JC, Mader CL. A scanning electron microscopic evaluation of four root canal irrigation regimens. *J Endod* 1987;13:147-57.
- Beltz RE, Torabinejad M, Pouresmail M. Quantitative analysis of the solubilizing action of MTDA, sodium hypochlorite and EDTA on bovine pulp and dentin. *J Endod* 2003;29: 334-337.
- Brasil, lei nº 9.434, de 4 de fevereiro de 1997. Dispõe sobre a remoção de órgãos, tecidos e partes do corpo humano para fins de transplante e tratamento e dá outras providências. *Diário Oficial da União*, 05 de fevereiro de 1997.
- Calt S, Serper A. Time-dependent effects of EDTA on dentin structures. *J Endod* 2002;28:17-9.
- Camargo CHR, Siviero M, Camargo SEA, Oliveira SHG, Carvalho CAT, Valera MC. Topographical, Diametral, and Quantitative Analysis of Dentin Tubules in the Root Canals of Human and Bovine Teeth. *J Endod* 2007;33:422-426.
- Cruz-Filho AM, Souza-Neto MD, Savioli RN, Silva RB, Vansan LP, Pécora JD. Effect of Chelating Solutions on the Microhardness of Root Canal Lumen Dentin. *J Endod* 2011; 37:358-362.
- Doğan H, Çalt S. Effects of Chelating Agents and Sodium Hypochlorite on Mineral Content of Root Dentin. *J Endod* 2001; 27: 578-580.
- Estrela C, Estrela CRA, Barbin EL, Spanó JCE, Marchesan MA, Pécora JD. Mechanism of Action of Sodium Hypochlorite. *Braz Dent J* 2002; 13:113-7.

Fuentes V, Toledano M, Osorio R, Carvalho RM. Microhardness of superficial and deep sound human dentin. *J Biomed Mater Res A*. 2003;66:850-853.

Garberoglio R, Becce C. Smear layer removal by root canal irrigants: a comparative scanning electron microscopic study. *Oral Surg* 1994; 78: 359-367.

Garcia F, Murray PE, Garcia-Godoy F, Namerow KN. Effect of aquatine endodontic cleanser on smear layer removal in the root canals of ex vivo human teeth. *J Appl Oral Sci* 2010:170-5.

Goldberg M, Septier D, Lécolle S, Chardin H, Quintana MA, Acevedo AN, et al. Dental mineralization. *Int J Dev Biol* 1995;39: 93-110.

Grigoratos D, Knowles J, Ng Y-L, Gulabivala K. Effect of exposing dentine to sodium hypochlorite and calcium hydroxide on its flexural strength and elastic modulus. *Int Endod J* 2001;34:113-119.

Gulabivala K, Stock CJR, Lewsy JD, Ghori S, Ng YL, Spratt DA. Effectiveness of electrochemically activated water as an irrigant in an infected tooth model. *Int Endod J* 2004;37:624-631.

Hata G, Uemura M, Weine FS, Toda T. Removal of Smear Layer in the Root Canal Using Oxidative Potential Water. *J Endod* 1996;22:643-645.

Hata G, Hayami S, Weine FS, Toda T. Effectiveness of oxidative potential water as a root canal irrigant. *Int Endod J*. 2001;34:308-317.

Hulsmann M, Heckendorff M, Lennon A. Chelating agents in root canal treatment: mode of action and indications for their use. *Int Endod J*. 2003;36:810-830.

Ingle JI. A standardized endodontic technique utilizing newly designed instruments and filling materials. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1961;14:83-91.

Ishizuka T, Kataoka H, Yoshioka T, Suda H, Iwasaki N, Takahashi H, et al. Effect of NaClO treatment on bonding to root canal dentin using a new evaluation method. *Dent Mater J* 2001;20:24-33.

Kerekes K, Tronstad L. Long-term results of endodontic treatment performed with a standardized technique. *J Endod* 1979;5:83-90.

Kishen A, Sum CP, Mathew S, Lim CT. Influence of irrigation regimens on the adherence of enterococcus faecalis to root canal dentin. *J Endod* 2008;34:850-854.

Lopes HP, Siqueira-Jr JF, Carlos Nelson Elias. Substâncias químicas empregadas no preparo dos canais radiculares. In: Lopes HP, Siqueira-Jr JF. *Endodontia: Biologia e Técnica*. 2. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A.; 2004. p. 535-579.

Marais JT. Cleaning efficacy of a new root canal irrigation solution: a preliminary evaluation. *Int Endod J* 2000;33:320-325.

Mareending M, Luder HU, Brunner TJ, Knecht S, Stark WJ, Zehnder M. Effect of sodium hypochlorite on human root dentine – mechanical, chemical and structural evaluation. *Int Endod J* 2007;40:786-793.

Mareending M, Paqué F, Fischer J, Zehnder M. Impact of irrigant sequence on mechanical properties of human root dentin. *J Endod* 2007;33:1325-8.

Martin MV, Gallagher MA. An investigation of the efficacy of super-oxidized (Optident/Sterilox) water for the disinfection of dental unit water lines. *Br Dent J* 2005;198:353-354.

Mohammadi Z. Sodium hypochlorite in endodontics: an update review. *Int Dent J*. 2008;58:329-341.

Mjör IA, Smith MR, Ferrari M, Mannocci F. The structure of dentine in the apical region of human teeth. *Int Endod J* 2001;34:346-353.

Molander A, Reit C, Dahlén G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 1998;31:1-7.

Moreira DM, Almeida J FA, Ferraz CCR, Gomes BPFAG, Line SRP, Zaia AA. Structural Analysis of Bovine Root Dentine after Use of Different Endodontics Auxiliary Chemical Substances. *J Endod* 2009;35:1023-27.

Morris MD, Lee KW, Agee KA, Bouillaguet S, Pashley DH. Effects of sodium hypochlorite and RC-Prep on bond strengths of resin cement to endodontic surfaces. *J Endod* 2001;27:753-757

Nair PNR, Sjögren U, Krey G, Kahnberg KE, Sundqvist G. Intraradicular

bacteria and fungi in root-filled, asymptomatic human teeth with therapy resistant periapical lesions: a long-term light and electron microscopic follow-up study. *J Endod* 1990;16:580–8.

Niu W, Yoshioka T, Kobayashi C, Suda H. A scanning electron microscopic study of dentinal erosion by final irrigation with EDTA and NaOCl solutions. *Int Endod J* 2002;35:934-939.

O'Driscoll C, Dowker S, Anderson P, Wilson R, Gulabivala K. Effect of sodium hypochlorite depletion of dentin (Abstract). *Int Endod J* 2000;33:143.

O'Driscoll C, Dowker S, Anderson P, Wilson R, Gulabivala K. Effects of sodium hypochlorite solution on root dentine composition. *Journal of Material Science: Materials in Medicine* 2002;13:219-223.

Oyarzún A, Cordero AM, Whittle M. Immunohistochemical evaluation of effects of sodium hypochlorite on dentin collagen and glycosaminoglycans. *J Endod* 2002;28:152-156.

Pascon FM, Kantovitz KR, Sacramento PA, Nobre-dos-Santos M, Puppini-Rontani RM. Effect of sodium hypochlorite on dentine mechanical properties. A review. *J Dent* 2009;37:903-08.

Pashley D, Okabe A, Parham P. The relationship between dentine microhardness and tubule density. *Endod Dental Traumatol* 1985;1:176–9.

Pashley EL, Birdsong NL, Bowman K, Pashley DH. Cytotoxic effects of NaOCl on vital tissue. *J Endod* 1985;11:525-528.

Panighi M, G'Sell C. Effect of the tooth microstructure on the shear bond strength of a dental composite. *J Biomed Mater Res.* 1993;27:975-981.

Rossi-Fedele G, Figueiredo JAP, Steier L, Canullo L, Steier G, Roberts AP. Evaluation of the antimicrobial effect of super-oxidized water (Sterilox®) and sodium hypochlorite against *Enterococcus faecalis* in a bovine root canal model. *J Appl Oral Sci* 2010;18:498-502.

Rossi-Fedele G, Dogramaci EJ, Steier L, Figueiredo JAP. Some factors influencing the stability of Sterilox, a super-oxidized water. *Br Dent J* 2011; In Brief.

Rossi-Fedele G, Steier L, Dogramaci EJ, Canullo L, Steier G, Figueiredo JAP. Bovine pulp tissue dissolution ability of HealOzone[®], Aquatine Alpha Electrolyte[®] and sodium hypochlorite. *Aust Endod J* 2013;39:57-61.

Roush JK, Breur GJ, Wilson JW. Picrosirius red staining of dental structures. *Stain Tech* 1988;63:363-7.

Safavi KE, Spangberg LSW, Langeland K. Root canal dentine tubule disinfection. *J Endod* 1990;16:207-10.

Saghiri MA, Delvarani A, Mehrvarzfar P, Malganji G, Lotfi M, Dadresanfar B, Dadvand S, Saghiri AM. A study of the relation between erosion and microhardness of root canal dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009;108:e29-e34.

Sakae T, Mishima H, Kozawa Y. Changes in Bovine Dentin Mineral with Sodium Hypochlorite Treatment. *J Dent Res* 1988;67:1229-1234.

Saleh AA, Ettman WM. Effect of endodontic irrigation solutions on microhardness of root canals dentine. *J Dent* 1999;27:43-46

Schilder H. Cleaning and shaping the root canal. *Dent Clin North Am* 1974;18:269-96.

Selkon JB, Babb JR, Morris R. Evaluation of the antimicrobial activity of a new super-oxidized water, Sterilox[®], for the disinfection of endoscopes. *J Hosp Infect* 1999;41:59-70.

Shetty NS, Srinivasan J, Holton, Ridgway GL. Evaluation of microbiocidal activity of a new disinfectant: Sterilox 2500 against *Clostridium difficile* spores, *Helicobacter pylori*, vancomycin resistant *Enterococcus* species, *Candida albicans* and several *Mycobacterium* species. *J Hosp Infect* 1999;41:101-105.

Shilke R, Lisson JA, Bauß O, Geurtsen W. Comparison of the number and diameter of dentinal tubules in human and bovine dentine by scanning electron microscopic investigation. *Arch Oral Biol* 2000; 45:355-61.

Sim TPC, Knowles JC, Ng Y-L, Shelton J, Gulabivala K. Effect of sodium hypochlorite on mechanical properties of dentine and tooth surface strain. *Int Endod J* 2001;34:120-132.

Siqueira JF Jr, Roças IN, Santos SR, et al. Efficacy of instrumentation techniques and irrigation regimes in reducing the bacterial population within root canals. *J Endod* 2002;28:181-4.

Sjogren U, Hagglund B, Sundqvist G, Wing K. Factors affecting the long-term results of endodontic treatment. *J Endod* 1990;16:498-504.

Slutzky-Goldberg I, Liberman R, Heling I. The effect of instrumentation with two different file types, each 2,5% NaOCl irrigation on the microhardness of root dentin. *J Endod* 2002;28:311-2.

Slutzky-Goldberg I, Maree M, Liberman R, Heling I. Effect of sodium hypochlorite on dentin microhardness. *J Endod* 2004;30:880-2.

Soares JC, Santana FR, Silva NR, Preira JC, Pereira CA. Influence of endodontic treatment on mechanical properties of root dentin. *J Endod* 2007;33:603-606.

Solovyeva AM, Dummer PMH. Cleaning effectiveness of root canal irrigation with electrochemically activated anolyte and catholyte solutions: a pilot study. *Int Endod J* 2000;33:494-50.

Ten Cate AR. *Histologia Bucal: Desenvolvimento, Estrutura e Função*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001.

Torneck CD. Complexo Dentina-polpa. In: Ten Cate AR. *Histologia Bucal: Desenvolvimento, Estrutura e Função*. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A.; 2001. p. 143-185.

Van Meerbeek B, Willems G, Celis JP, Roos JR, Braem M, Lambrechts P et al. Assessment by nano-indentation of the hardness and elasticity of the resin-dentin bonding area. *J Dent Res*. 1993;72:1434-1442.

Vidal BC & Mello MLS. *Biologia Celular*. Rio de Janeiro: Livraria Atheneu; 1987.

Yamada RS, Armas A, Goldman M, Lin Ps. A scanning electron microscopic comparison of a high volume final flush with several irrigating solutions. *J Endod* 1983; 9: 137-142.

Wegehaupt F, Gries D, Wiegand A, Attin T. Is bovine dentine an appropriate substitute for human dentine in erosion/abrasion tests? *J Oral Rehabil* 2008;35:390-4.

Wegehaupt FJ, Widmer R, Attin T. Is bovine dentine an appropriate substitute in abrasion studies? *Clin Oral Investig* 2010;14:201-5.

Zehnder M. Root canal irrigants. *J Endod* 2006;32:389-98.

ANEXOS

Anexo 1: Parecer da comissão científica e de ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS



Comissão Científica e de Ética Faculdade da Odontologia da PUCRS

Porto Alegre 11 de Janeiro de 2012

O Projeto de: Tese

Protocolado sob nº: 0003/12
Intitulado: Efeito do hipoclorito de sódio, EDTA e Sterilox®, associados ou não à terapia fotodinâmica com laser, na microdureza da dentina e na estrutura dentinária do canal radicular.
Pesquisador Responsável: Profa. Dra. Fabiana Vieira Vier Pelisser
Pesquisadores Associados: Alexandre Corrêa Ghisi
Nível: Tese / Doutorado

Foi *aprovado* pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS em 11 de Janeiro de 2012.

Profa. Dra. Ana Maria Spohr
Presidente da Comissão Científica e de Ética da
Faculdade de Odontologia da PUCRS

Anexo 2: Relatório da Fundação de Ciência e Tecnologia (CIENTEC) – Porto Alegre/RS



Documento **RELATÓRIO DE ENSAIO** Número **34727/147295**
Os resultados contidos neste documento têm significação restrita e aplicam-se exclusivamente ao(s) item(ns) ensaiado(s) ou calibrado(s).
Este documento somente poderá ser publicado na íntegra.

ENSAIOS QUÍMICOS

Cliente: FLAVIA E. R. BALDASSO
Rua Portugal, 855 – Bairro: Higienópolis
90520-310 – Porto Alegre, RS

Itens ensaiados: (03) três amostras entregues à CIENTEC e identificadas pelo Cliente como informadas nos respectivos rótulos: "n.º 0005878.0712 p/Caroline Sturmer; solução Quelante de EDTA a 17%; uso: externo, em consultório dentário; fab.: 07/2012; val: 07/2012; 1L", "n.º.0005837.0712 p/Caroline Sturmer; solução de Hipoclorito de Sódio (5,25% de cloro livre); uso: externo, em consultório dentário; fab.: 07/2012; val: 10/2012; 1L" e "n.º.0005836.0712 p/Caroline Sturmer; solução de Hipoclorito de Sódio (2% de cloro livre), uso: externo, em consultório dentário; fab.: 07/2012; val: 10/2012; 1L".

Data de recebimento dos itens: 01 de agosto de 2012.

Período de realização dos ensaios: 03 a 06 de agosto de 2012.

Métodos: as determinações de hipoclorito de sódio e cloro ativo forma realizadas segundo norma NBR 9425/2005 e a concentração de EDTA foi feita de acordo com o método da Farmacopéia Brasileira, 5ª. Edição – Brasília, 2010(volumetria de complexação).

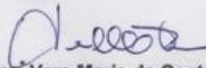
RESULTADOS:

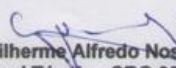
Amostras:	5,25% (cloro livre)	2% (cloro livre)
Cloro Ativo(Cl), % m/m	4,9	2,0
Hipoclorito de Sódio(NaClO),% m/m	5,1	2,1

Amostra:	Solução Quelante(17%)
Concentração de Solução de EDTA, % m/v	17,0

Observação: % m/m=g/100g e %m/v=g/100mL.

Porto Alegre, 06 de agosto de 2012.


Quím. Vera Maria da Costa Dias
Gerente do Departamento de Química


Quím. Guilherme Alfredo Noschang
Responsável Técnico CRQ 05200689 – 5.ªRegião
Coordenador do Laboratório de Análises
Inorgânicas

1/1