



UNIVERSIDADE DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

VICTORIA GABRIELA LOUZADA

**INFLUÊNCIA DE DIFERENTES POTÊNCIAS ULTRASSÔNICAS ASSOCIADAS
OU NÃO À SOLUÇÃO ANTIMICROBIANA EM BIOFILME DE
*Enterococcus faecalis***

Ribeirão Preto
2022

Victoria Gabriela Louzada

INFLUÊNCIA DE DIFERENTES POTÊNCIAS ULTRASSÔNICAS ASSOCIADAS
OU NÃO À SOLUÇÃO ANTIMICROBIANA EM BIOFILME DE
Enterococcus faecalis

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade de Ribeirão Preto, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Odontologia, área de concentração Endodontia.

Orientadora: *Profa. Dra. Graziela Bianchi Leoni*

Ribeirão Preto
2022

Ficha catalográfica preparada pelo Centro de Processamento Técnico
da Biblioteca Central da UNAERP

- Universidade de Ribeirão Preto -

L895i Louzada, Victoria Gabriela, 1995-
Influência de diferentes potências ultrassônicas associadas ou não
à solução antimicrobiana em biofilme de *Enterococcus faecalis* /
Victoria Gabriela Louzada. - - Ribeirão Preto, 2022.
70 f.: il. color.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Graziela Bianchi Leoni.

Dissertação (mestrado) – Universidade de Ribeirão Preto,
UNAERP, Odontologia, área de concentração: Endodontia. Ribeirão
Preto, 2022.

1. Ultrassom. 2. Descontaminação. 3. Irrigação. 4. Biofilme.
5. Enterococcus faecalis. I. Título.

CDD 617.6342

VICTORIA GABRIELA LOUZADA

**“INFLUÊNCIA DE DIFERENTES POTÊNCIAS ULTRASSÔNICAS
ASSOCIADAS OU NÃO À SOLUÇÃO ANTIMICROBIANA EM BIOFILME DE
Enterococcus faecalis”**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade de Ribeirão Preto para obtenção de título de Mestre em Odontologia.

Orientadora: Profa. Dra. Graziela Bianchi Leoni.

Área de concentração: Endodontia

Data de defesa: 26 de janeiro de 2022

Resultado: _____ Aprovada _____

BANCA EXAMINADORA

Graziela Bianchi Leoni

Assinado de forma digital por Graziela Bianchi Leoni
Dados: 2022.02.03 00:22:11 -03'00'

Profa. Dra. Graziela Bianchi Leoni

Professora Assistente Doutora do Curso de Odontologia da Universidade de Ribeirão preto (UNAERP) – Presidente

André Pitondo da Silva

Assinado de forma digital por André Pitondo da Silva
Dados: 2022.01.27 14:02:07 -03'00'

Prof. Dr. André Pitondo da Silva

Professor Assistente Doutor do Curso de Odontologia da Universidade de Ribeirão preto (UNAERP)

Flaviana Bombarda de Andrade

Assinado de forma digital por Flaviana Bombarda de Andrade
Dados: 2022.02.02 15:17:15 -03'00'

Profa. Dra. Flaviana Bombarda de Andrade

Professora Associada da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo (FOB-USP)



Este trabalho foi realizado no Laboratório de Pesquisas em Odontologia da Universidade de Ribeirão Preto e no Laboratório de Bacteriologia e Biologia Molecular (LABAC) da Universidade de Ribeirão Preto, com apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- CAPES.

DEDICATÓRIA

Definitivamente, ensinar é um dom dado a pessoas especiais. Afinal, transmitir conhecimento e sabedoria é uma tarefa de absoluta responsabilidade. Além disso, trata-se de uma empreitada nada fácil, sobretudo no mundo em que vivemos hoje. De fato, o simples ato de ensinar já é, por si só, dotado de grande nobreza. Porém, existe um ser ainda mais iluminado que – mais do que transmitir conhecimento – nos ensina a pensar, a expor ideias, a compreender as mais diversas situações, a enfrentar e superar limitações e a aproveitar todas as oportunidades. A esta figura damos o nome de mestre. Um verdadeiro mestre é a bússola que aponta a melhor direção, a luz que guia em meio a escuridão, o mapa que aponta os melhores caminhos e o conselheiro sábio que avisa sobre os percalços que surgirão nesta longa estrada rumo ao conhecimento.

Sendo assim, agradeço a todos os meus amados mestres, que sempre fizeram todo o possível para que eu crescesse pessoal e academicamente. Vocês me incentivaram a amadurecer as minhas ideias, a buscar cada vez mais o saber, a pensar de forma crítica e analítica, enfim, a ser sempre uma pessoa melhor. Podem ter certeza de que vocês serão sempre a minha grande inspiração. Tenho em mim o pedacinho de cada um que tive o prazer de conhecer, marcas indestrutíveis de sabedoria e amor ao conhecimento que cresce e evolui a cada dia.

A todas as maravilhosas pessoas e profissionais que pude conhecer ao longo da minha jornada, ao carisma, carinho e infinita paciência de todos eles, dedico esse trabalho. Muito obrigada a todos por terem me tornado quem hoje eu sou! Em especial ao professor **Humberto Maria Gonçalves**, meu primeiro orientador, primeira pessoa a reconhecer meu potencial, responsável por meus primeiros passos na vida acadêmica. Obrigado por todos os estímulos, apoio incondicional e disposição para me auxiliar a enfrentar todas as adversidades.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço imensamente a **Deus**, por toda a sua misericórdia e amor. Por ter colocado pessoas tão maravilhosas em meu caminho, pois sem elas a realização e conclusão desse sonho jamais seria possível.

Aos meus pais, **Marcos Rogério Louzada** e **Flavia Helena Patricio Louzada**, por toda educação, incentivo e amor. Por todos os ensinamentos e estímulos. Por eles, tive forças para conquistar meus sonhos e para alcançar meus objetivos. Amo-os incondicionalmente. Assim como meus irmãos, **Victor Hugo Louzada**, **Nicolas Rafael Louzada** e **Bianca Manuela Louzada**. E a toda minha família, por todo apoio que me deram e por sentirem sempre tanto orgulho de mim!

Ao meu companheiro de todos os dias, **Luis Victor Rozante de Freitas Pereira**, por ter me apoiado em todos os momentos, por ter me permitido crescer e me incentivado a evoluir cada vez mais, por ter me ajudado de formas inimagináveis e por ter me aguentado todos esses anos. Como também à sua família, por terem me acolhido e apoiado com tanto carinho.

À **Profa. Dra. Graziela Bianchi Leoni**, por ser a minha orientadora e cumprir seu papel com tanta paciência e perseverança. Por sempre acreditar em mim e em minhas capacidades, por me permitir participar e contribuir de diversos projetos, por todas as oportunidades, por sempre me apoiar academicamente, profissionalmente e emocionalmente. Por todo carinho, cuidado e dedicação. Por ser uma pessoa incrível e um ser humano iluminado, por quem tenho enorme admiração. Pelo Theo. E por fim, por me permitir ter sua amizade.

AGRADECIMENTOS

À Universidade de Ribeirão Preto, na pessoa da Magnífica Reitora **Profa. Elmara Lúcia de Oliveira Bonini**, por toda estrutura, pelo ensino e pelas oportunidades que a Universidade me ofereceu.

À coordenadora do Curso de Pós-graduação em Odontologia da Universidade de Ribeirão Preto, **Profa. Dra. Yara Teresinha Corrêa Silva Sousa**, por quem tenho imenso carinho e admiração e que tive a honra de ter como minha orientadora na graduação. Serei eternamente grata por todas as oportunidades, pela atenção, dedicação, incentivo, carinho, acolhimento, paciência e cuidado.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES-PROSUP)** pelo auxílio financeiro concedido para o desenvolvimento deste projeto.

Aos professores do programa de pós-graduação da Universidade de Ribeirão Preto **Prof. Dr. Carlos Eduardo Saraiva Miranda, Profa. Dra. Danielle Cristine Furtado Messias, Prof. Dr. Edílson Carlos Caritá, Prof. Dr. Edson Alfredo, Profa. Dra. Érica Alves Gomes, Profa. Dra. Fernanda Gonçalves Basso, Prof. Dr. Fuad Jacob Abi Rached Júnior, Profa. Dra. Izabela Cristina Maurício Moris Rivera, Profa. Dra. Larissa Moreira Spinola de Castro Raucci e Profa. Dra. Marcelle Danelon**, pelos ensinamentos transmitidos, pela paciência e por todo suporte acadêmico e emocional.

Aos professores **Profa. Dra. Ana Beatriz Silva Sousa, Profa. Dra. Andrea Marcaccini, Prof. Dr. Silvio Rocha Corrêa da Silva, Prof. Tabajara Sabbag Fonseca, Prof. Dr. Vlamir Oliveira da Silva e Prof. Dr. Walter Martins Júnior**, que além da graduação, continuaram me apoiando e torcendo pelo meu sucesso.

Ao **Prof. Dr. Walter Raucci Neto**, por todo apoio além da dissertação, pelas monitorias, conversas sobre o futuro e dicas profissionais, por todo amparo nos momentos de desespero, pela amizade e carinho.

Ao professor e amigo **Prof. Dr. Paulo Esteves Pinto Faria**, por todo apoio profissional, acadêmico e pessoal. Por ser meu maior apoiador com relação a carreira clínica e por me incentivar a crescer e melhorar cada dia mais.

Ao **Prof. Dr. André Pitondo da Silva**, por todo apoio técnico, teórico e emocional necessários para o desenvolvimento desse projeto. E aos alunos do LABAC **Mariana Oliveira Silva, Miguel Augusto de Moraes, Rafael Nakamura da Silva e Rafael Silva Goulart** que me acompanharam por toda fase experimental e mais que meus colegas de laboratório, se tornaram meus amigos!

Aos amigos e colaboradores da Helse Ultrasonic **Prof. Dr. Alexandre Capelli**, à **Daniela Fabris Capelli** e ao **Lóris Vinicius O. Fabris**, pela paciente colaboração, pelo inestimável suporte ao projeto, pela doação dos incertos ultrassônicos e empréstimo do aparelho de ultrassom, imprescindíveis para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos técnicos e especialistas do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, **Roberta R Costa Rosales** do laboratório de Microscopia Multifoton pela paciência, carisma, amizade e orientação no manuseio e aquisição de imagens no microscópio confocal e **José Augusto Maulin** do laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura, pela paciência, orientação e pelo auxílio técnico na obtenção das fotomicrografias das análises da MEV.

A DVI radiologia, por intermédio de **Bruna Neves de Freiras e Amanda Talarico**, pela paciência, atenção e por todo suporte ao projeto, desde suas etapas iniciais.

A todos os **funcionários da Universidade de Ribeirão Preto**, por todo o cuidado, motivação, confiança, apoio e atenção que tiveram por mim durante toda essa caminhada. Foram tantos anjos que não citarei nomes com receio de esquecer algum, mas saibam que serei eternamente grata!

Às técnicas **Claudinéia de Araújo Souza, Divaneide Dantas de Oliveira e Tassiana Ap. Trevisan Bernardo**, por todo auxílio técnico e emocional. Por todas as conversas, companheirismo e por todo o carinho. E à **Maria Helena Silva Alves**, por toda doçura, preocupação e apoio emocional dedicados a todos os meus dias de experimentação no LABAC.

Aos amigos **Waldir Mamed, Antônio Carlos Adriano e Vicente de Paulo Silva**, por tornar minhas chegadas e saídas mais alegres, principalmente aos domingos e feriados. Por todo carinho e apoio.

Aos **alunos de graduação** que tive o prazer de trocar conhecimento durante o estágio docente nos laboratórios e nas clínicas de endodontia, que me permitiram de alguma forma aprender e aperfeiçoar meus conhecimentos.

Às minhas amigas e companhias diárias de laboratório, **Nathalia Mancioppi Cerqueira, Ana Flávia Simões Barbosa, Nathalia Cristina Tavella e Silva, Elisabeth Helena Brazão e Paula Bonafim Borges Lemos**, por todo companheirismo, carinho e amizade de todos esses dias, por todo apoio, força, compreensão, carinho e cookies.

Ao meu amigo **Orestes Pereira Olivato**, não só pela amizade que cultivamos, carinho e cuidado, como também pelo empréstimo do compressor portátil. Sem você esse trabalho não teria sido desenvolvido da mesma forma.

Às minhas tias **Maria Teresa Patricio, Luciana Patricio, Luciana Ligia Louzada, Gláucia Juliana Louzada**, ao meu primo **Afonso Augusto Louzada** e primas **Ana Carolina Patricio, Isabela Cristina Patricio, Mariângela Louzada Sampaio, Barbara Vitória Louzada e Pietra Marcela Louzada**, por todo apoio e amor incondicional, por cada palavra, por cada incentivo e por cada elogio. Vocês fazem e

sempre fizeram com que eu acreditasse estar no caminho certo, que sou boa no que faço e que consigo com pequenos atos, mudar o mundo. Muito obrigada!

Aos meus amigos **Caique Felício Julio Garcia, Carolina Martins Hennrich, Daniel Gomes Calado, Fabiola dos Santos, Helena Zanetti Moschiar, Marcos Manheze Beraldo, Nadyne Saab Messias e Tarcísio Quaranta**, que estiveram presentes em todo processo, física e psicologicamente, desde a graduação até o fim desta etapa.

Aos meus amigos de infância **Leticia Del Bianco Bacha e Caio César Carmo dos Santos**, por se fazerem presentes mesmo com a distância, por nunca deixarem de transmitir sentimentos de amor e incentivo em todos os momentos difíceis e de muita felicidade.

A minha amiga **Cassia Helena Schiavone Feitreiro** e sua família, não só por todo apoio, mas por nunca me deixarem desanimar e nem desistir. Por se fazerem presentes em todos os momentos de desespero, trazendo calma e alegria para os meus dias. A vocês agradeço profundamente todo o carinho e amizade!

Tudo o que temos de decidir

É o que fazer com o tempo que nos é dado.

J.R.R. Tolkien

RESUMO

Os microrganismos e seus produtos exercem papel fundamental nas patologias pulpares e perirradiculares e conseqüentemente no fracasso do tratamento endodôntico. Devido à dificuldade da completa limpeza e desinfecção durante o preparo biomecânico, protocolos de agitação na irrigação complementar devem ser considerados. Logo, o objetivo do presente estudo foi avaliar diferentes protocolos de irrigação complementar com ou sem agitação, associados ou não à solução antimicrobiana, na redução de biofilme de *E. faecalis*. Para isso, 116 dentes unirradiculares humanos foram instrumentados pela técnica reciprocante (#50.05) e submetidos a tomografia computadorizada de feixe cônico (TCFC). Após selamento apical, as amostras foram incluídas em microtubos e esterilizadas em autoclave. Os canais radiculares foram contaminados com inóculo de *E. faecalis* equivalente à escala 1 de McFarland, sendo realizada nova inoculação a cada 24h por um período de 21 dias. Em seguida, as amostras foram então distribuídas por amostragem estratificada baseado em aspectos morfológicos (comprimento e volume), de acordo com a solução irrigante: PBS (n=48) e NaOCl 2,5% (n=48) e posteriormente de acordo com o protocolo de agitação: convencional por pressão apical positiva (PAP) (n=12); agitação com instrumento XP-Clean (XPC) (n=12); e agitação ultrassônica com potência de 10 (PUI 10%) (n=12), e 30% (PUI 30%) (n=12). Foram realizados dois grupos controle, sendo um controle positivo (n=12) para verificação do crescimento bacteriano e outro controle negativo (n=8) para verificar a esterilização. A análise quantitativa da redução microbiana foi realizada por meio da contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) (n=8). As análises qualitativas de adesão do biofilme às paredes do canal radicular e a viabilidade bacteriana, foram realizadas por meio de microscopia eletrônica de varredura (n=2) e microscopia confocal a laser associado a kit live/dead (n=2), respectivamente. Considerando-se a distribuição normal dos resultados, foi aplicado o teste ANOVA two-way com nível de significância de 5%. Os resultados demonstram que independente da solução utilizada, o grupo PAP apresentou os menores valores na redução microbiana, quando comparada aos grupos PUI 10% e 30% ($p < 0,005$). O grupo XPC apresentou semelhança estatística ao grupo PUI 10% quando associada a solução PBS ($p > 0,005$) e ao grupo PAP quando associada à solução de NaOCl 2,5% ($p > 0,005$). O grupo PUI 30% apresentou os maiores valores na redução microbiana, independente da solução empregada, quando comparado a todos os outros grupos ($p < 0,005$). Diante disso, podemos concluir que todos os protocolos de irrigação complementar apresentam redução microbiana significativa comparado ao grupo controle positivo e o aumento da potência ultrassônica apresentou os maiores resultados de descontaminação.

Palavras-chave: Endodontia; irrigação; irrigação ultrassônica; biofilme; *Enterococcus faecalis*.

ABSTRACT

Microorganisms and their products make a fundamental role in pulp and periradicular pathologies and, consequently, in the failure of endodontic treatment. Because of the difficulty of complete cleaning and disinfection during biomechanical preparation, agitation protocols in complementary irrigation should be considered. Therefore, the objective of the present study was to evaluate different protocols of complementary irrigation with or without agitation, associated or not to the antimicrobial solution, in the reduction of *E. faecalis* biofilm. For this, 116 single-rooted human teeth were instrumented by the reciprocal technique (# 50.05) and submitted to cone beam computed tomography (CBCT). After apical sealing, the samples were included in microtubes and sterilized in an autoclave. The root canals were contaminated with inoculum of *E. faecalis* equivalent to McFarland scale 1, with a new inoculation performed every 24 hours for a period of 21 days. Then, the samples were then distributed by stratified sampling based on morphological aspects (length and volume), according to the irrigating solution: PBS (n = 48) and 2.5% NaOCl (n = 48) and then according to the agitation protocol: conventional positive apical pressure (PAP) (n = 12); agitation with the XP-Clean instrument (XPC) (n = 12); and ultrasonic agitation with power of 10 (PUI 10%) (n = 12) and 30% (PUI 30%) (n = 12). Two control groups were performed, a positive control (n=12) to verify bacterial growth and another negative control (n=8) to verify sterilization. Quantitative analysis of microbial reduction was performed by counting colony forming units (CFU) (n = 8). Qualitative analyzes of biofilm adhesion to root canal walls and bacterial viability were performed using scanning electron microscopy (n = 2) and confocal laser microscopy associated with a live/dead kit (n = 2), respectively. Considering the normal distribution of the results, the two-way ANOVA test was applied with a significance level of 5%. The results demonstrate that, regardless of the solution used, the PAP group had the lowest microbial reduction values when compared to the 10% and 30% PUI groups ($p < 0.005$). The XPC group was statistically similar to the PUI 10% group when associated with PBS solution ($p > 0.005$) and to the PAP group when associated with 2.5% NaOCl solution ($p > 0.005$). The PUI 30% group had the highest microbial reduction values, regardless of the solution used, when compared to all other groups ($p < 0.005$). Therefore, we can conclude that all complementary irrigation protocols present a significant microbial reduction compared to the positive control group and the increase in ultrasonic power presented the highest decontamination results.

Keywords: Endodontics; irrigation; ultrasonic irrigation; biofilm; *Enterococcus faecalis*.

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| RESUMO | |
| 1 INTRODUÇÃO | 15 |
| 2 PROPOSIÇÃO | 20 |
| 2.1 Objetivos Gerais | 20 |
| 2.2 Objetivos Específicos | 20 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS | 21 |
| 3.1 Delineamento experimental | 21 |
| 3.2 Seleção e preparo da amostra | 23 |
| 3.2.1 Seleção inicial das amostras | 23 |
| 3.2.2 Secção das amostras | 23 |
| 3.2.3 Preparo biomecânico | 24 |
| 3.2.4 Avaliação tomográfica e distribuição amostral | 26 |
| 3.2.5 Preparo dos corpos de prova | 28 |
| 3.3 Formação do biofilme | 29 |
| 3.4 Distribuição estratificada das amostras | 29 |
| 3.5 Calibração da potência | 31 |
| 3.6 Protocolos de agitação complementar | 32 |
| 3.7 Avaliação quantitativa e qualitativa da atividade antimicrobiana ... | 34 |
| 3.7.1 Avaliação da contagem de UFC | 34 |
| 3.7.1.1 Coleta do biofilme remanescente | 34 |
| 3.5.1.2 Diluição Seriada e Espalhamento em Placas | 35 |
| 3.5.1.3 Contagem de UFC | 36 |
| 3.7.2 Verificação do biofilme por MEV | 37 |
| 3.7.3 Verificação por CLSM associado a Kit de viabilidade bacteriana Black Light Live/Dead | 38 |
| 3.8 Análise dos resultados | 40 |
| 4 RESULTADOS | 41 |
| 4.1 Análise microbiológica | 40 |
| 4.2 Análise do Biofilme por MEV | 44 |
| 4.3 Análise da viabilidade bacteriana por Microscopia Confocal a Laser associado a Kit Live/Dead | 47 |
| 5 DISCUSSÃO | 51 |
| 6 CONCLUSÕES | 57 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 58 |
| ANEXO | |
| APÊNDICE | |

1 INTRODUÇÃO

Na clínica endodôntica, os microrganismos e seus produtos exercem papel fundamental nas patologias pulpares e perirradiculares (SIQUEIRA et al., 2007; PRADA et al., 2019; PÉREZ et al., 2021), agudizações (ZEHNDER; BELIBASAKIS, 2015), sintomatologia (RICUCCI et al., 2009), exsudação persistente (MOLANDER et al., 2003; GOMES et al., 2004; RÔÇAS et al., 2004) e, conseqüentemente, no fracasso do tratamento endodôntico (SCHILDER, 1974, LOPES; SIQUEIRA Jr., 2015, SIQUEIRA et al., 2007; TABASSUM; KHAN, 2016). Nesse sentido, torna-se importante a redução e/ou eliminação dos microrganismos e seus subprodutos presentes nos canais radiculares, removendo todo tecido pulpar vivo ou necrosado que pode vir a servir de substrato para o crescimento e desenvolvimento microbiano, a fim de evitar a permanência ou sua recolonização após o selamento/preenchimento dos espaços endodônticos (SIQUEIRA et al., 2018; PÉREZ et al., 2021).

Os microrganismos atingem o sistema de canais radiculares através da penetração e proliferação nos tecidos pulpares, devido a lesões cariosas ou traumas. Inicialmente, a invasão ocorre por meio bactérias na forma planctônica, que não possuem proteção ou aderência e são facilmente eliminadas do interior dos canais radiculares (SVENSÄTER; BERGENHOLTZ, 2004; MOHAMMADI et al., 2014). No processo de colonização microbiana, as bactérias planctônicas são capazes de organizar-se justapostas em diferentes superfícies, resultando na formação de biofilme. O biofilme é definido como comunidade microbiana sésil (NARAYANAN; VAISHNAVI, 2010; PRADA et al., 2019a), caracterizada por células aderidas tanto a um substrato quanto umas às outras, e envolvidas em uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares, contendo canais de água que possibilitam a circulação dos nutrientes (COSTERTON et al., 1994; SIQUEIRA e RÔÇAS, 2008). A estrutura do biofilme tem como principal função a proteção das bactérias que o compõe, de forma que sua resistência e aderência a superfície dificulte a ação dos agentes antimicrobianos, a resposta do hospedeiro e conseqüentemente sua remoção, podendo ser até 1500 vezes mais resistentes comparadas às bactérias planctônicas (SVENSÄTER; BERGENHOLTZ, 2004; MOHAMMADI et al., 2014).

A microbiota endodôntica é tipicamente polimicrobiana (NAIR 1987, SIQUEIRA; ROÇAS, 2008; RICUCCI; SIQUEIRA, 2016), entretanto entre as diversas espécies responsáveis pelo desenvolvimento de infecções endodônticas, destaca-se o *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*). Este microrganismo possui a capacidade de se manter viável em condições de estresse ambiental como variação de pH, temperatura, tensão de O₂ e escassez de nutrientes (COSTERTON et al., 1987; LLEÒ et al., 2001; FIGDOR et al., 2003; GOMES et al., 2008; RICUCCI et al., 2009; SIQUEIRA et al., 2011). Assim como a capacidade de adentrar nos túbulos dentinários e produzir biofilmes densos (DISTEL et al., 2002; STUART et al., 2006; PRADA et al., 2019a), que lhe proporciona resistência a fagocitose, anticorpos e agentes antimicrobianos (STUART et al., 2006; SHRESTHA et al., 2010), como soluções irrigantes e medicação intracanal (SIQUEIRA et al., 1996; STUART et al., 2006; PRADA et al., 2019b).

Além disso, essa espécie é capaz de trocar material genético entre diferentes microrganismos, favorecendo sua capacidade patogênica (STUART et al., 2006; PRADA et al., 2019a). Dessa forma, o *E. faecalis* é capaz de produzir fatores de virulência (NACIF et al., 2010) de grande poder destrutivo e de difícil eliminação durante o tratamento endodôntico, sendo assim relacionado a casos de infecções persistentes que levam ao insucesso do tratamento endodôntico (EVANS et al., 2002; GABARDO et al., 2009; NACIF et al., 2010; RICUCCI et al., 2016).

Durante o tratamento endodôntico, a etapa responsável pela limpeza e desinfecção dos canais radiculares é o preparo biomecânico, fundamentado em princípios mecânicos, químicos e físicos (SIQUEIRA JR et al., 1997; SOUZA et al., 2010; SIQUEIRA JR et al., 2013). O princípio mecânico consiste na ação dos instrumentos em relação ao corte da dentina radicular contaminada, o químico corresponde à ação das soluções irrigantes, como ação antimicrobiana, dissolução de tecidos orgânicos e inorgânicos e o físico compreende o emprego de energia mecânica para movimentação hidráulica da solução irrigante (BARBIZAM et al., 2002; ALBRECHT et al., 2004; ALVES et al., 2012; SOUSA-NETO et al., 2018; PEREIRA et al., 2021). Sendo assim, os princípios químicos e físicos são auxiliares do mecânico nos protocolos de limpeza dos canais

radiculares (HÜBSCHER et al., 2003; DESAI; HIMEL, 2009; MACEDO et al., 2014; LEONI et al., 2017; ZUOLO, et al., 2018; MORAGO et al., 2019).

Em relação ao princípio mecânico, a completa limpeza e desinfecção dos canais radiculares tem se mostrado como um grande desafio a ser alcançado durante o tratamento endodôntico. Apesar dos avanços na manufatura dos instrumentos endodônticos com novos tratamentos térmicos da liga metálica, diferentes cinemáticas e novos desenhos da parte ativa, a literatura relata que 2,6% a 80% da superfície dos canais radiculares permanecem intocadas (GAGLIARDI et al., 2015; LOPES et al., 2017; SOUSANETO et al., 2018; STRINGHETA et al., 2019), sendo que essa dificuldade de desempenho dos instrumentos é ainda maior quando o dente apresenta desafios anatômicos, como canais achatados (AZIM et al., 2017; VERSIANI et al., 2017; SOUSANETO et al., 2018). Dessa forma, essas áreas não tocadas nos canais radiculares, favorece a permanência de microrganismos no interior dos canais, resultando no insucesso do tratamento endodôntico (SIQUEIRA et al., 2008; RICUCCI et al., 2009; SIQUEIRA-JUNIOR et al., 2018; SOUSA-NETO et al., 2018).

Desse modo, o importante papel dos mecanismos químicos e físicos durante a irrigação dos canais radiculares tem sido evidenciado (VAN DER SLUIS et al., 2007; HAAPASALO et al., 2010; HAAPALASO et al., 2014; LEONI et al., 2017). O agente químico comumente empregado durante a irrigação é o hipoclorito de sódio (NaOCl), considerado padrão-ouro em relação as soluções irrigantes, principalmente na eficácia antimicrobiana imediata e na dissolução tecidual (ZEHNDER, 2006; BOUTSIUKIS et al., 2014; MOHAMMAD et al., 2014; MOREIRA et al., 2019).

Tradicionalmente, a irrigação é realizada por meio de agulha adaptada à seringa na qual é empregada pressão apical positiva (GU et al., 2009; BOUTSIUKIS; VAN DER SLUIS, 2015). Este método permite fácil controle da profundidade de penetração da agulha e frequente renovação da solução irrigante com grandes volumes a fim de favorecer a movimentação hidráulica da solução irrigante no interior do canal radicular (VAN DER SLUIS, 2006; GU et al., 2009; LOPES et al., 2015; LEONI et al., 2017).

A literatura tem evidenciado que a eficiência da irrigação pode ser melhorada quando empregada energia mecânica por meio da utilização de instrumentos, da ativação sônica e ultrassônica (VAN DER SLUIS et al., 2007;

PARAGLIOLA et al., 2010; SIQUEIRA, RÔÇAS, 2011; HAPAAASO et al., 2014; BASRANI; MALKHASSIAN, 2015; DUARTE et al., 2015; LEONI et al., 2017; ARIAS et al., 2018; BENNETTI et al., 2018; SILVA, et al., 2018; VAZ-GARCIA et al., 2018; CARVALHO et al., 2019; DE-DEUS et al., 2019; SUSILA; MINU, 2019; ALASKSHAR et al., 2020; EGGMANN et al., 2020; NANGIA et al., 2020; OROZCO et al., 2020; TAVELLA E SILVA et al., 2020).

Nesse sentido, instrumentos rotatórios com mecanismo de ação de agitação do líquido irrigante e contato mecânico com as paredes do canal sem capacidade de desgaste da dentina radicular têm sido desenvolvidos com a finalidade de aprimorar a eficácia dos protocolos de limpeza e desinfecção dos canais radiculares durante irrigação complementar pós-preparo biomecânico (CARVALHO et al., 2019; DE-DEUS et al., 2019). Estudos têm demonstrado que esses instrumentos são capazes de alcançar desafios anatômicos como curvaturas e achatamentos, desalojar biofilme e debris dentinários, remover medicação intracanal e evitar extrusão apical da solução irrigante (AZIM et al., 2017; BAO et al., 2017; ELNAGHY et al., 2017; GOKTURK et al., 2017; KESKIN et al., 2017; LEONI et al., 2017; TURKAYDIN et al., 2017; CARVALHO et al., 2019; DE-DEUS et al., 2019b). Um desses instrumentos é a XP Clean (MK Life), que até o momento, não apresenta estudos que avaliem sua efetividade nos protocolos de descontaminação.

A utilização da irrigação ultrassônica passiva, da sigla em inglês *passive ultrasonic irrigation* (PUI), como método de irrigação complementar pós-preparo biomecânico, têm evidenciado resultados positivos na remoção de debris, especialmente no terço apical e em desafios anatômicos (WELLER; BRADY; BARNIER, 1980; LEE et al., 2004; GU et al., 2009; GRÜNDLING et al., 2011; PAQUÉ et al., 2011; HAAPASALO et al., 2014; LEONI et al., 2017; PLOTINO et al., 2019; VARELA et al., 2018) assim como na redução de biofilme intracanal (HUQUE et al., 1998; LEE et al., 2004; TOWNSEND; MAKI, 2009; HARRISON et al., 2010; JIANG et al., 2011; CACHOVAN et al., 2013; ORDINOLA - ZAPATA et al., 2014; MOHMMED et al., 2016).

A PUI baseia-se no uso de um inserto com haste lisa e de pequeno diâmetro, onde a energia ultrassônica é transmitida da haste do inserto para solução irrigante no canal radicular por meio de ondas ultrassônicas que promovem um turbilhonamento causando efeito de cavitação e fluxo acústico

(VANSAN et al., 1990; AHMAD; ROY; KAMARUDIN, 1992; VAN DER SLUIS; WU; WESSELINK 2005a; VAN DER SLUIS et al., 2007; LOPES et al., 2015).

Segundo o fabricante, para que cada inserto possa atingir o potencial máximo de sua eficiência com segurança é necessária a calibração da potência do aparelho de ultrassom por meio do controle de fluxo de água que resulte em uma microvaporização ao longo do comprimento do inserto associada ao gotejamento na sua ponta, definindo-se assim a potência ideal de trabalho. Apesar da literatura comparar protocolos de PUI com diferentes tempos de agitação, quantidade de ciclos de agitação e diferentes soluções irrigantes (VAN DER SLUIS et al., 2007; GU et al., 2009; PAQUÉ et al., 2011; WANG et al., 2013; CAPELLI, 2016), não há registros de estudos que avaliem se a calibração do aparelho em diferentes potências de agitação ultrassônica pode influenciar na limpeza dos canais radiculares. Assim, considerando a importância das técnicas complementares de irrigação na limpeza do sistema de canais radiculares, torna-se relevante avaliar a influência de protocolos com diferentes potências ultrassônicas durante a PUI.

2 PROPOSIÇÃO

2.1 Objetivos gerais

O objetivo do presente estudo foi avaliar diferentes protocolos de irrigação complementar com ou sem agitação, associados ou não à solução antimicrobiana, na redução de biofilme de *E. faecalis*.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar e comparar quantitativamente por meio de contagem de unidades formadoras de colônias (UFC), os protocolos de irrigação complementar por pressão apical positiva (sem agitação), agitação por meio do instrumento rotatório XPClean, agitação por irrigação ultrassônica passiva na potência de 10% e 30%, associados ou não à solução antimicrobiana de hipoclorito de sódio 2,5%, na redução de biofilme de *E. faecalis*.
- Avaliar e comparar qualitativamente por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e microscopia confocal a laser associado a kit de viabilidade celular Live/Dead, os protocolos de irrigação complementar por pressão apical positiva (sem agitação), agitação por meio do instrumento rotatório XPClean, agitação por irrigação ultrassônica passiva na potência de 10% e 30%, associados ou não à solução antimicrobiana de hipoclorito de sódio 2,5%, na redução de biofilme de *E. faecalis*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

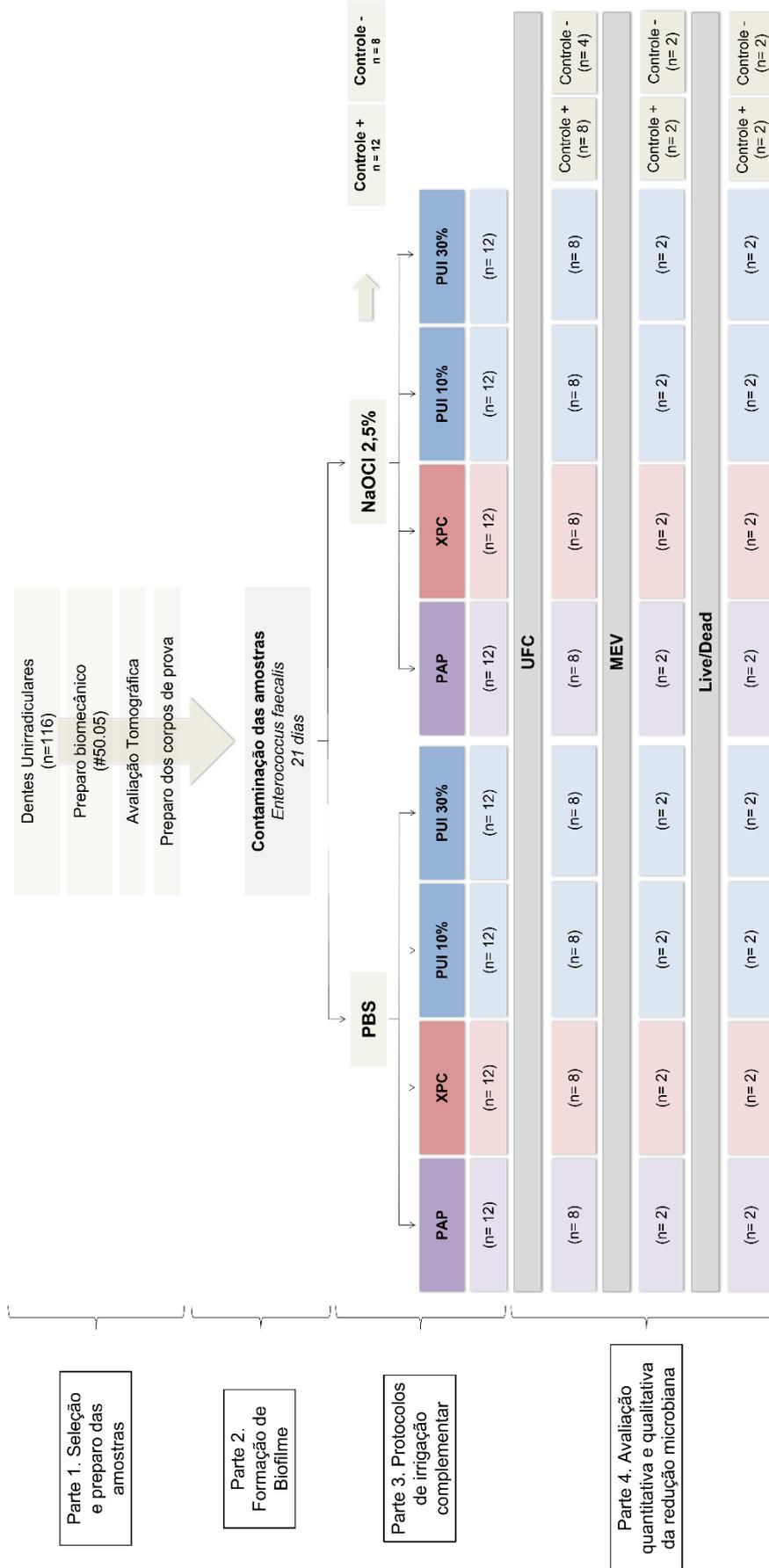
3.1 Delineamento experimental

Os fatores de estudo envolvidos neste trabalho foram o tipo de solução irrigante em dois níveis (solução PBS e solução NaOCl 2,5%) e os protocolos de agitação na irrigação complementar em quatro subníveis (pressão apical positiva, agitação com XPC, agitação ultrassônica na potência 10% e agitação ultrassônica na potência 30%).

A amostra desse experimento foi composta por 116 dentes unirradiculares com canal único divididos em dois grupos de acordo com a solução irrigante e quatro subgrupos de acordo com os protocolos de agitação além de grupo controle positivo e negativo. Para a análise quantitativa da redução microbiana por meio de contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) foram realizadas oito repetições de cada subgrupo experimental e grupo controle positivo, e quatro repetições para o grupo controle negativo. A variável de resposta foi o número de unidades formadoras de colônias (UFC) encontradas após plaqueamento bacteriano. Para a análise qualitativa da redução microbiana foram realizadas duas repetições para análise por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e duas repetições para análise por Microscopia Confocal de Varredura a Laser associada a corante *Live and Dead*. As variáveis de respostas foram a presença de biofilme nos túbulos dentinários por terço radicular e a viabilidade bacteriana, respectivamente.

Deste modo, para facilitar a compreensão do presente estudo, os procedimentos experimentais foram organizados em quatro partes, como ilustra a Figura 1.

Figura 1. Fluxograma do delineamento experimental



3.2 Seleção e preparo das amostras

3.2.1 Seleção inicial das amostras

Após aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Ribeirão Preto (CAAE: 33327020.7.0000), foram selecionados 250 dentes unirradiculares humanos com rizogênese completa e estrutura radicular hígida, extraídos por razões periodontais ou ortodônticas, provenientes de uma coleção de dentes do Laboratório de Pesquisa em Odontologia da Universidade de Ribeirão Preto, obtidos previamente à resolução 466/12. Esses dentes foram mantidos em solução timol até momento do uso. Posteriormente foram lavados com água corrente por 24 h e, em seguida, sua superfície radicular externa foi limpa por meio de raspagem com ultrassom (Profi II Ceramic, Dabi Atlante Ltda, Ribeirão Preto, SP, Brasil).

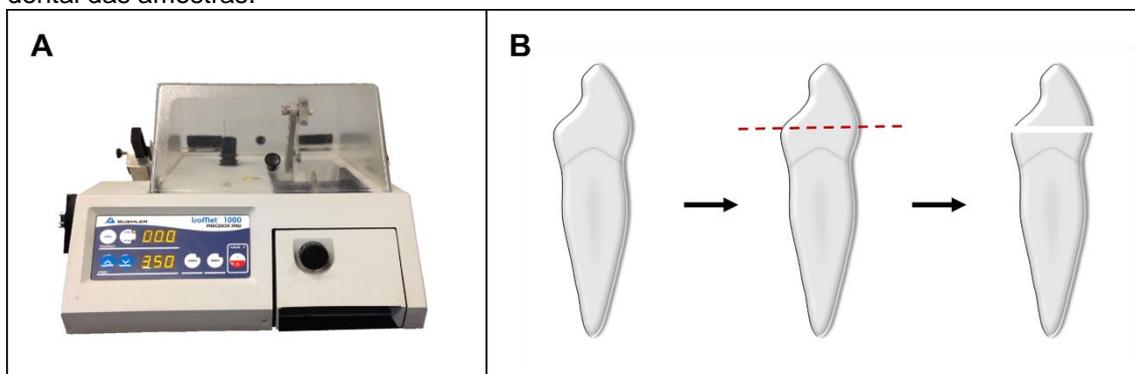
Tomadas radiográficas nos sentidos orto-radial e méso-radial foram realizadas com filmes Ektaspeed EP (Kodak Brasileira Comércio e Indústria Ltda, São José dos Campos, SP, Brasil), tempo de exposição de 0,5 s e distância objeto-filme de 10 cm, 70 kVp (Spectro 70X Eletronic, Dabi Atlante, Ribeirão Preto, São Paulo). As radiografias foram avaliadas com auxílio de negatoscópio (Konex, Konex Ind. e Com. de Metais LTDA, São Paulo, SP, Brasil) e de aparato visualizador magnificador (X-Produkter, Malmö, Suécia). Foram selecionados da amostra inicial, os dentes que se apresentaram canal único, livre de nódulos pulpares, reabsorção interna, tratamento endodôntico prévio ou fratura radicular, totalizando 116 dentes. Os dentes selecionados foram então identificados numericamente e inseridos, individualmente, em recipiente plástico contendo 1 mL de soro fisiológico, e armazenados em estufa a 37 °C, por 72 h, visando a sua reidratação.

3.2.2 Secção das amostras

A fim de padronizar o acesso aos canais radiculares, os dentes tiveram suas coroas seccionadas aproximadamente 3 mm para incisal da junção cimento-esmalte (JCE). Para isso, cada dente foi acoplado a um dispositivo na máquina Isomet 1000 (Buehler, Lake Forest, IL, EUA) (Figura 2), na qual um disco diamantado (South Bay Technology, San Clement, CA, EUA), peso de 250 g, refrigeração constante, e velocidade de 275 rpm realizou o corte da porção

coronária, perpendicularmente ao longo eixo da raiz. Após isso, os dentes foram novamente colocados em seus respectivos recipientes plásticos e armazenados.

Figura 2. (A) Máquina de corte Isomet 1000. (B) Representação esquemática da secção da coroa dental das amostras.

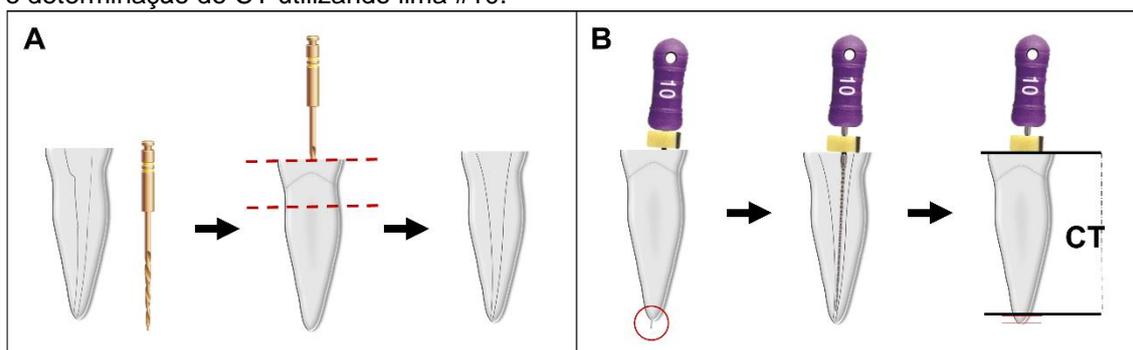


Fonte: Autor.

3.2.3 Preparo biomecânico

Após a secção das coroas, o acesso aos canais foi realizado com auxílio de broca esférica e broca Endo Z acionadas por motor em alta rotação (Dabi Atlante, Ribeirão Preto, SP, Brasil) e o preparo cervical foi realizado com instrumento LA Axxess (SybronEndo, Orange, CA, EUA), no comprimento do primeiro terço dos canais, acionadas por motor em baixa rotação (Dabi Atlante, Ribeirão Preto, SP, Brasil). Em seguida, cada canal foi irrigado com 0,5 mL de NaOCl 2,5% usando-se agulha NaviTip calibre 30 (Ultradent Products Inc., South Jordan, UT, EUA) adaptada a seringa plástica (Ultradent Products Inc., South Jordan, UT, EUA). A exploração dos canais foi realizada com lima #10 tipo K de aço inóx (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça) introduzida cuidadosamente no interior do canal até que sua ponta coincidisse com o forame apical, confirmando a patência dos canais. Dessa medida, foi subtraído 1 mm para o estabelecimento do comprimento de trabalho (CT) (Figura 3).

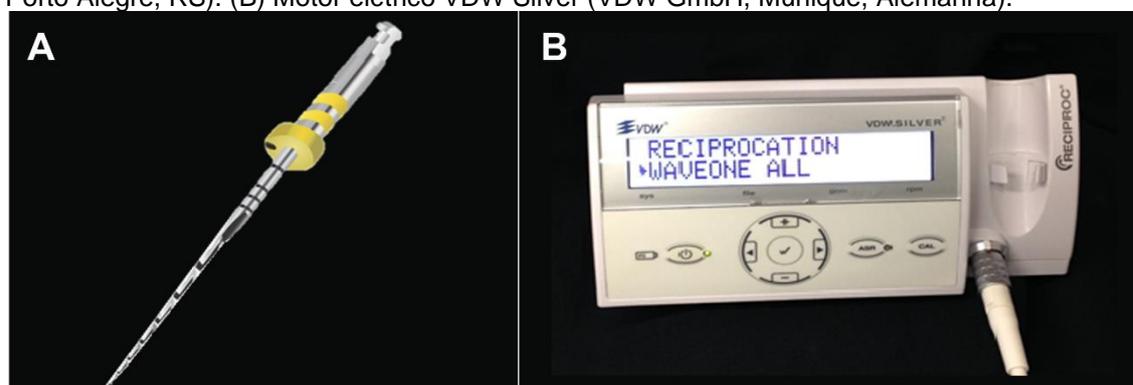
Figura 3. (A) Preparo cervical com instrumento La Axxess. (B) Confirmação da patência apical e determinação do CT utilizando lima #10.



Fonte: Autor.

O preparo biomecânico dos canais foi realizado pela técnica recíproca com uso de lima única Pro-R #50.05 25 mm (MK LIFE, Porto Alegre, RS, Brasil) (Figura 4A) acionada por contra ângulo redutor 6:1 Sirona (SN 25185; VDW GmbH, Munique, Alemanha) acoplado ao micromotor SMR 114058 (VDW GmbH, Munique, Alemanha) que, por sua vez foi conectado ao motor elétrico VDW Silver (VDW GmbH, Munique, Alemanha) (Figura 4B). O instrumento foi usado de forma passiva, com suaves movimentos de bicada na direção apical e após alcançar o CT, foi realizado movimentos de pincelamento contra as paredes do canal. A cada três movimentos, o instrumento foi limpo e os canais irrigados da mesma forma descrita anteriormente, totalizando 5 mL de NaOCl 2,5% por dente. Cada instrumento foi utilizado em 5 dentes a fim de evitar possíveis fraturas. Vale destacar que os dentes que não apresentaram resistência durante o preparo, foram descartados.

Figura 4. Preparo biomecânico. (A) Instrumento recíproco Pro-R #50.05 25 mm (MK LIFE, Porto Alegre, RS). (B) Motor elétrico VDW Silver (VDW GmbH, Munique, Alemanha).



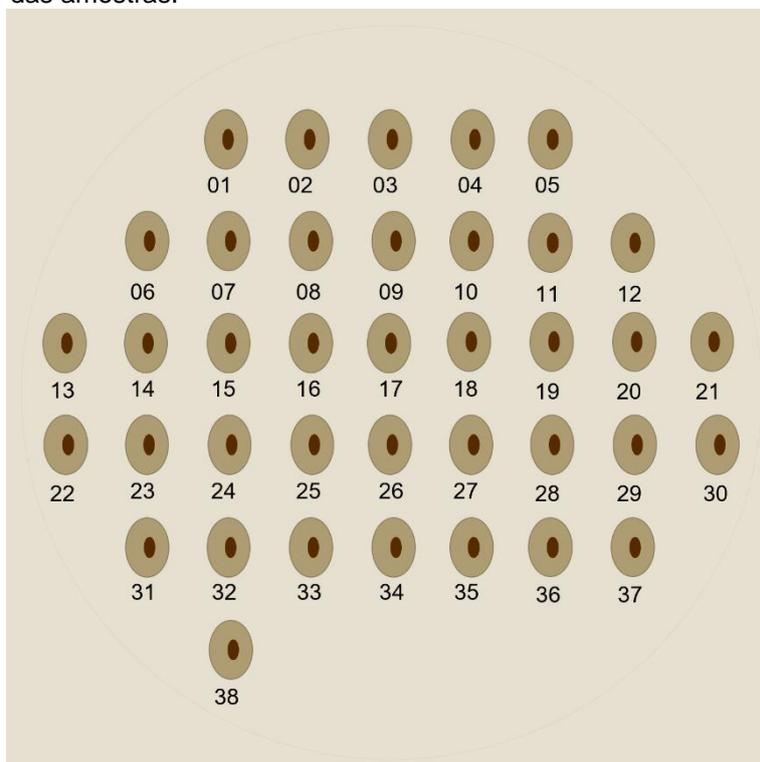
Fonte: (A) Cortesia Prof. Murilo Alcade - Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB-USP). (B) Autor.

Finalizado o preparo, cada canal foi irrigado com 1 mL de EDTA 17% por 5 min, seguido de 1 mL de NaOCl 2,5% e, por fim, 1 mL de água destilada para remover as demais soluções utilizadas.

3.2.4 Avaliação tomográfica e distribuição amostral

No intuito de fixar os elementos dentais para escaneamento tomográfico, foi confeccionada uma placa de isopor em formato quadrangular (12x12 cm), com auxílio de um cortador de isopor elétrico. A partir do centro da placa, foi traçado um círculo com diâmetro correspondente ao campo de visão (*Field of view* - FOV) do aparelho tomográfico (6 cm), delimitando a área de inserção dos dentes. Para isso, ainda com auxílio de um cortador de isopor, pequenas depressões foram realizadas de forma a posicionar e fixar os dentes em linhas dispostas no interior do círculo correspondente ao campo de visão, com seus eixos vestibulo-lingual e méso-distal em um mesmo sentido. Na última linha foi realizada apenas uma depressão no canto inferior esquerdo, a fim de identificar a posição da placa após a aquisição das imagens (Figura 5).

Figura 5. Representação esquemática da placa de isopor quadrangular confeccionada para escaneamento tomográfico das amostras.

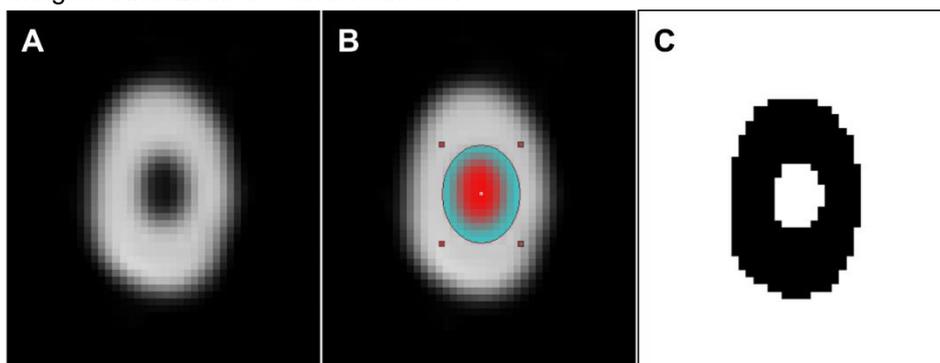


Fonte: Autor.

O conjunto dentes/placa de isopor foi adaptado à mesa do tomógrafo computadorizado de feixe cônico (i-CAT® Cone Beam 3D, Imaging Sciences International, Hartfield, PA, EUA) da Clínica de Radiologia Odontológica DVI – Ribeirão Preto, e em seguida foi realizada a aquisição das imagens com protocolo de aquisição com *voxel* isométrico de 0,25 mm, tempo de exposição de 40 s, KVP de 120 kV, corrente de 36 mAs e campo de visão (*Field of view - FOV*) de 6 cm. As imagens foram salvas em formato DICOM (*Digital Imaging and Communication in Medicine*).

A etapa seguinte consistiu na análise das imagens obtidas com auxílio do programa CTAn v.1.18.8.0 (Bruker-microCT, Kontich, Bélgica). Inicialmente selecionou-se o volume de interesse para identificação de cada amostra que foi salvo um novo diretório de imagens. Em seguida, para cada amostra foi realizada a segmentação da imagem por meio da técnica de binarização ou *threshold* interativo, na qual é realizada a segmentação dos valores de tons de cinza da reconstrução tridimensional obtendo-se, assim, uma imagem binária, na qual os pixels pretos representaram o fundo e os pixels brancos, o objeto da análise (Figura 6). Esse processo foi realizado para o volume de interesse do sistema de canais radiculares da estendendo-se desde o nível da junção cemento-esmalte até o ápice radicular por meio de operações matemáticas com a ferramenta *Custom Processing*. A partir desta mesma ferramenta, uma sequência de operações matemáticas (*task list*) foi novamente aplicada e obtiveram-se os dados tridimensionais de volume (mm^3) e área de superfície (mm^2), que foram posteriormente utilizados para distribuição dos grupos experimentais.

Figura 6. (A) Imagem obtida após escaneamento tomográfico previamente à binarização. (B) Delimitação da região de interesse do canal (vermelho). (C) Imagem binarizada do canal radicular.

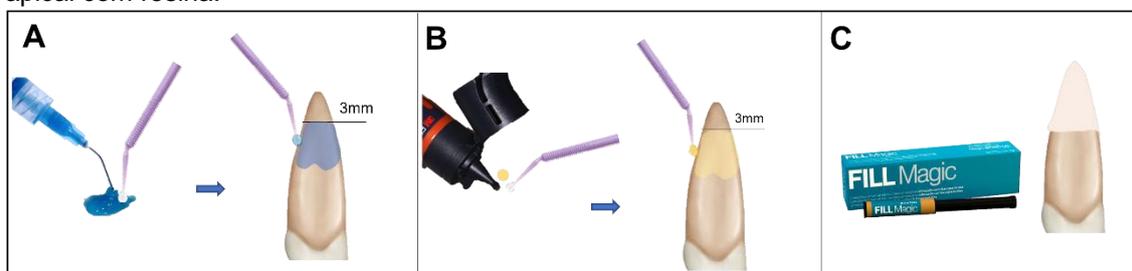


Fonte: Autor.

3.2.5 Preparo dos corpos de prova

Com intuito de evitar extravasamento do inóculo bacteriano durante análise microbiológica, os ápices das raízes foram selados com resina composta. Para isso, na superfície radicular à uma distância de aproximadamente 3 mm do ápice em direção cervical, foi realizado inicialmente o condicionamento com ácido fosfórico 37% (Dentsply, York, Pensilvânia, EUA) por 20 s (Figura 7A), seguido de lavagem com jatos de água. Após controle de umidade com leves jatos de ar foi aplicado o sistema adesivo Adper single bond (3M, Maplewood, Minnesota, EUA) (Figura 7B), seguido de evaporação do solvente com leve jato de ar por 10 s e fotoativação com unidade LED (RadiiCal Plus - SDI Limited, Bayswater, Victoria, Austrália) por 20 s. Dessa forma, evitou-se que o material adesivo escoasse para o interior do conduto radicular através do forame apical. Repetida a aplicação do adesivo, foi realizado a aplicação de pequenos incrementos de resina composta Fill Magic (Coltene, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil) (Figura 7C), seguido da sua fotopolimerização por 40 s.

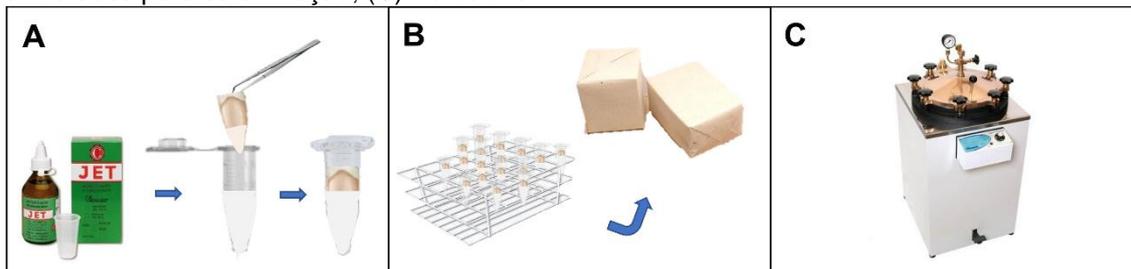
Figura 7. Representação esquemática do preparo dos corpos de prova. (A) Condicionamento ácido. (B) Aplicação sistema adesivo. (C) Aspecto final da superfície radicular após selamento apical com resina.



Fonte: Autor.

Após selamento apical, as amostras foram incluídas em microtubos Eppendorf de 1,5 mL (Quaxxo, Jaboticabal, SP, Brasil), usando resina acrílica autopolimerizável incolor (pó/líquido) (Figura 8A) com objetivo de facilitar os procedimentos de inoculação bacteriana e agitação da solução irrigante. Em seguida, os tubos foram devidamente fechados e colocados em estantes (Figura 8B), as quais foram embaladas e submetidas ao processo de esterilização em autoclave vertical (Modelo AV137 - Phoenix Lufenco, Araraquara, SP, Brasil), com temperatura de 121 °C, sob pressão de 2 bars, por 40 min (Figura 8C).

Figura 8. Representação esquemática da inclusão e esterilização dos corpos de prova. (A) Inclusão das amostras em tubos Eppendorf utilizando resina acrílica. (B) Tubos Eppendorfs embalados para esterilização; (C) Autoclave.



Fonte: Autor.

3.3 Formação do biofilme

Neste estudo, foi utilizada a linhagem de *E. faecalis* (NCTC 775), a qual foi inoculada em placa de Petri contendo Ágar Müeller Hinton em capela de fluxo laminar e incubada a 37 °C por 24 h em estufa. Após esse intervalo de tempo, utilizando-se um *swab* (ABSORVE - Cral, Cotia, SP, Brasil), foi coletada uma quantidade de colônias bacterianas da placa para se obter uma suspensão equivalente à escala 2 de McFarland em 4 mL de PBS (Figura 9A). Em seguida, 2 mL da suspensão foi transferida para um segundo tubo de ensaio, no qual foram acrescentados 2 mL de BHI (*Brain heart infusion*) para se obter uma concentração final de cerca de 3×10^8 células/mL, equivalente à escala 1 de McFarland (Figura 9B e 10). Volumes de 10 μ L desta suspensão bacteriana, foram inoculados nos canais radiculares com auxílio de micropipeta Monocanal Labmate Pro 0,5 – 10 μ L HTL ETQ (HTL, Daniszewska, Warskawa, Polônia) até que os canais fossem preenchidos com 30 μ L, sem que ocorresse extravasamento do inóculo a fim de evitar a contaminação externa da raiz (Figura 9C). As amostras foram mantidas em estufa sob temperatura de 37 °C por um intervalo de tempo de 24 h após a incubação.

Figura 9. Representação esquemática da inoculação bacteriana de *E. faecalis*. (A) Placa de Petri com incubação da linhagem de *E. faecalis* seguida de coleta de colônias com auxílio de *swab*. (B) Diluição da suspensão equivalente à escala 2 de McFarland, para escala 1 após acréscimo de BHI. (C) Introdução do inóculo bacteriano no canal radicular com micropipeta de 10 μ L.



Fonte: Autor.

Figura 10. Suspensão equivalente à escala 2 e a escala 1 de McFarland.



Fonte: Autor.

Após esse período o inóculo foi removido com o auxílio de seringa de insulina 1 mL, acoplada uma ponta *Capillary tips* (Ultradent Products Inc., South Jordan, UT, EUA) esterilizada, com o intuito de remover as bactérias planctônicas e inviáveis. Em seguida, um novo inóculo de 30 μ L foi inserido no conduto radicular. Esta etapa foi repetida a cada 24 h, para assegurar a disponibilidade de nutrientes e garantir a viabilidade da cultura para a formação de um biofilme denso e maduro ao longo do conduto radicular, durante 21 dias sob condições aeróbicas.

3.4 Distribuição estratificada das amostras

Decorridos 21 dias para a formação do biofilme, em capela de fluxo laminar, foi realizado o protocolo de agitação na irrigação complementar de acordo com o tipo de solução irrigante e o tipo de energia empregada durante agitação da solução. A fim de melhorar a validade interna do experimento, a composição dos grupos e subgrupos experimentais foi realizada por meio da técnica de amostragem estratificada. Para tanto, os 116 dentes unirradiculares já escaneados e analisados foram combinados em oito grupos de oito amostras com base nos aspectos morfológicos quantitativos (comprimento e volume) do sistema de canais radiculares obtidos previamente no exame tomográfico. Assim, baseado nesses aspectos, foram distribuídos aleatoriamente a cada um dos oito subgrupos experimentais de acordo com a solução química irrigante (n=12): PBS ou NaOCl 2,5% e o tipo de agitação empregada no protocolo de irrigação complementar utilizado após o preparo biomecânico (n=12): pressão

apical positiva por meio de irrigação convencional seringa/agulha sem agitação; agitação por meio do instrumento rotatório XPClean; e agitação por meio da irrigação ultrassônica passiva com potência de 10% ou 30% (Tabela 1). A fim de demonstrar a efetividade da contaminação e a esterilização das amostras foi realizado um grupo de controle positivo (n=12) e um grupo negativo (n=8), respectivamente (Tabela 1). Esta distribuição possibilitou a formação de grupos experimentais homogêneos e representativos da variabilidade anatômica, verificada pelo teste ANOVA realizado com auxílio do programa SigmaPlot 12.0 (Systat Software, San Jose, CA, EUA).

Tabela 1. Distribuição dos grupos experimentais.

| Grupos | Protocolos | UFC | MEV | Live/ Dead |
|-----------------------|--|-----|-----|---------------|
| | | (n) | (n) | (n) |
| PBS + PAP | PBS + Pressão Apical Positiva | 8 | 2 | 2 |
| PBS + XPC | PBS + Agitação com instrumento XPClean | 8 | 2 | 2 |
| PBS + PUI10% | PBS + Agitação com Irrigação Ultrassônica Passiva 10% | 8 | 2 | 2 |
| PBS + PUI30% | PBS + Agitação com Irrigação Ultrassônica Passiva 30% | 8 | 2 | 2 |
| NaOCl + PAP | NaOCl 2,5% + Pressão Apical Positiva | 8 | 2 | 2 |
| NaOCl + XPC | NaOCl 2,5% + Agitação com instrumento XPClean | 8 | 2 | 2 |
| NaOCl + PUI10% | NaOCl 2,5% + Agitação com Irrigação Ultrassônica Passiva 10% | 8 | 2 | 2 |
| NaOCl + PUI30% | NaOCl 2,5% + Agitação com Irrigação Ultrassônica Passiva 30% | 8 | 2 | 2 |
| C+ | Com contaminação | 8 | 2 | 2 |
| C- | Sem contaminação | 4 | 2 | 2 |

3.5 Calibração da potência

As potências utilizadas neste estudo foram baseadas na indicação mínima do fabricante (grupo PUI 10%) e na potência máxima ideal de trabalho obtida pela calibração da potência (grupo PUI 30%). Segundo fabricante, o método de controle de potência é feito a partir do controle de água na ponta do inserto ultrassônico. Inicialmente é aberto a saída de água e gradativamente a potência é aumentada de forma a alterar o fluxo da água. A potência máxima ideal de trabalho é determinada quando é observado a microvaporização ao longo do comprimento do inserto associada ao gotejamento na sua ponta. É

contraindicado o aumento da potência a partir da ruptura do fluxo de água, onde não ocorre mais o gotejamento na ponta do inserto.

3.6 Protocolos de agitação na irrigação complementar

Os protocolos de agitação e grupos controle foram realizados conforme descrição a seguir:

Grupo PAP - Sem agitação com irrigação por pressão apical positiva (n=12): Inicialmente 0,5 mL de solução foi dispensada no interior do canal por 20 s por meio da técnica de irrigação convencional utilizando ponta NaviTip (Ultradent Products Inc., South Jordan, UT, EUA) acoplada à uma seringa descartável esterilizada. Em seguida, a irrigação foi realizada com 3 mL de solução dispensada em fluxo contínuo a aproximadamente 2 mm aquém do CT em movimentos de vai-e-vem durante 2 min, totalizando 3,5 mL de solução por um tempo de 2 min e 20 s.

Grupo XPC - Agitação por meio de instrumento XPClean (n=12): Inicialmente 0,5 mL de solução foi dispensada no interior do canal por 20 s e em seguida um instrumento XP-Clean #25.02 (MK LIFE, Porto Alegre, RS, Brasil), adaptado a um contra ângulo redutor 6:1 Sirona (SN 25185; VDW GmbH, Munique, Alemanha) acoplado ao micromotor SMR 114058 (VDW GmbH, Munique, Alemanha) que, por sua vez, é conectado ao motor elétrico VDW Silver (VDW GmbH, Munique, Alemanha) foi introduzido no interior do canal radicular e foi acionado em rotação contínua no sentido horário com velocidade de 800 rpm e torque de 1 N.cm. O instrumento foi usado por 3 ciclos de 20 s em movimentos longitudinais suaves e de pequena amplitude até aproximadamente 2 mm aquém do CT do canal. Após isso, o instrumento foi removido do interior do canal radicular ainda em rotação e a após cada agitação foi realizada irrigação com 1 mL de solução durante 20 s, totalizando 3,5 mL de solução por um tempo de 2 min e 20 s. Cada instrumento foi utilizado em 3 dentes e, em seguida, foram descartados. A irrigação dos canais foi realizada usando a técnica de irrigação convencional seringa/agulha seguindo mesmo protocolo descrito no grupo PAP.

Grupo PUI 10% e Grupo PUI 30% - Agitação por irrigação ultrassônica passiva na potência de 10% (n=12) ou 30% (n=12): Inicialmente, 0,5 mL de solução foi dispensada no interior do canal por 20 s e em seguida foi realizada agitação da solução com inserto ultrassônico não cortante (#20, taper 0.01) de aço inoxidável (E1-Irrisonic, Helse Dental Technology, Santa Rosa de Viterbo, SP, Brasil), acionado por 3 ciclos de 20 s por uma unidade ultrassônica piezoelétrica (PS5 Newton Satelec, ACTeon, Merignac, France) na potência designada a cada grupo, em movimentos suaves e de pequena amplitude no sentido cérvico-apical, evitando tocar as paredes do canal. O inserto foi introduzido no canal à 2 mm do CT e o comprimento foi marcado com marcador permanente 1.0 (Pilot Pen do Brasil S.A. – São Paulo, SP, Brasil). Após cada agitação foi realizada irrigação com 1 mL de solução durante 20 s, totalizando 3,5 mL de solução por um tempo de 2 min e 20 s. A irrigação dos canais foi realizada usando a técnica de irrigação convencional seringa/agulha seguindo mesmo protocolo descrito no grupo PAP.

Controle Positivo (n=12): Amostras contaminadas com *E. faecalis* que não sofreram nenhum tipo de protocolo de descontaminação.

Controle Negativo (n=8): As amostras não foram contaminadas a fim de demonstrar a efetividade da esterilização realizada das amostras previamente a contaminação.

Para os grupos com solução de PBS, ao término dos protocolos de agitação foi realizado irrigação com 2 mL por 40 s. Para os grupos associados à solução de NaOCl 2,5%, ao término dos protocolos de agitação foi realizado irrigação com 1 mL de solução de tiosulfato 5% em fluxo contínuo por 20 s, permanecendo no canal 5 min, a fim de inativar a solução de NaOCl. Após isso, foi realizado irrigação final com 1 mL de PBS por 20 s.

Vale ressaltar que a fim de padronizar o fluxo de irrigação foi utilizado o volume total de 5,5 mL de solução em um tempo total de 3 min, em todos os grupos. Além disso, todos os protocolos de agitação foram realizados com auxílio sugador (WhiteMac, Ultradent, Indaiatuba, São Paulo, Brasil) adaptado a equipo

odontológico (Odontocase, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) associado e compressor portátil (Air Plus CSI 8,5/25, Schulz, Joinville, Santa Catarina, Brasil) para simular condições clínicas.

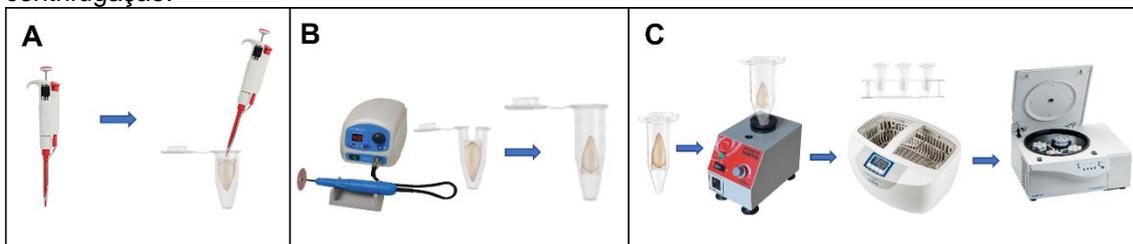
3.7 Avaliação quantitativa e qualitativa da atividade antimicrobiana

3.7.1 Avaliação da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC)

3.7.1.1 Coleta do biofilme remanescente

Após os procedimentos experimentais de descontaminação dos canais radiculares por meio dos protocolos de agitação na irrigação complementar, ainda dentro de capela de fluxo laminar cada canal foi preenchido com 30 μ L de PBS esterilizado (Figura 11A) e os tubos de Eppendorf de 1,5 mL contendo as amostras foram clivados longitudinalmente com o auxílio de um disco de Carburundum (KG Sorensen, Barueri, SP, Brasil), montado em peça reta e motor de baixa rotação (Beltec, Araraquara, SP, Brasil). Em seguida, com auxílio de uma pinça Dietrich esterelizada (Quinelato, Rio Claro, SP, Brasil), as amostras foram transferidas para Eppendorf de 5 mL esterilizado de maneira que o orifício de entrada dos canais ficasse voltada para o fundo do tubo que foram devidamente fechados (Figura 11B). Essas amostras foram então submetidas a agitação em Vortex (Gehaka, São Paulo, SP, Brasil), sob velocidade máxima de 3000 rpm, por 1 min. Em seguida, os tubos Eppendorf de 5 mL foram dispostos em uma estante, a qual foi imersa em cuba ultrassônica com água (Digital Ultrasonic Cleaner, Kondortech, São Carlos, SP, Brasil) por 480 s para que o biofilme formado fosse desprendido das paredes radiculares. A seguir, os tubos de Eppendorf 5 mL foram inseridos no interior de uma centrífuga (Centrífuga 5804R, Eppendorf AG, Hamburgo, Alemanha) e centrifugados a 2000 giros por 60 s (Figura 11C).

Figura 11. Representação esquemática do preparo das amostras para a coleta do biofilme. (A) Preenchimento dos canais radiculares com 30 μL de PBS esterilizado. (B) Clivagem dos Eppendorfs com auxílio de disco carburundum. (C) Amostras inseridas em tubos Eppendorf de 5 mL agitados em Vortex (Gehaka, São Paulo, SP, Brasil) seguido de agitação em cuba ultrassônica (Digital Ultrasonic Cleaner, Kondortech, São Carlos, SP, Brasil) e posterior centrifugação.

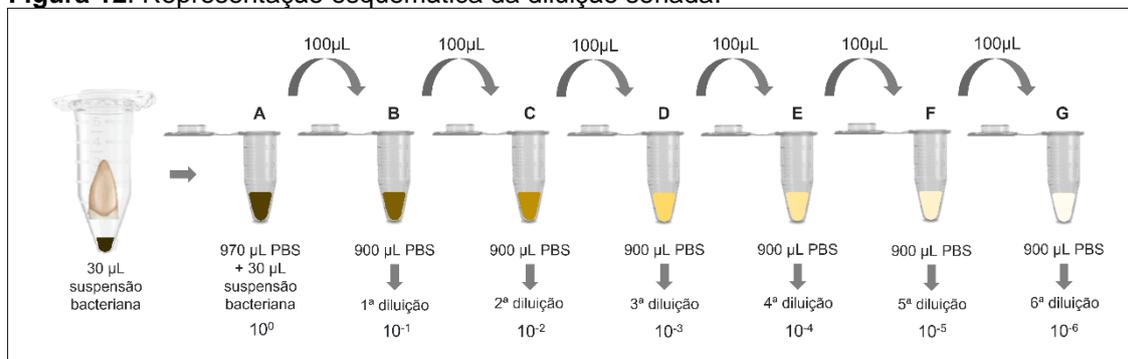


Fonte: Autor.

3.5.1.2 Diluição Seriada e Espalhamento em Placas

O material do canal radicular com volume aproximado de 30 μL foi coletado do microtubo Eppendorf esterilizado com auxílio de micropipeta e transferido para um tubo de ensaio contendo volume de PBS esterilizado para completar 1 mL de solução, obtendo-se a diluição 10^0 sendo que este mesmo procedimento foi realizado até alcançar a diluição 10^{-6} , identificadas com letras de A à G. Esse processo é chamado de diluição seriada (Figura 12).

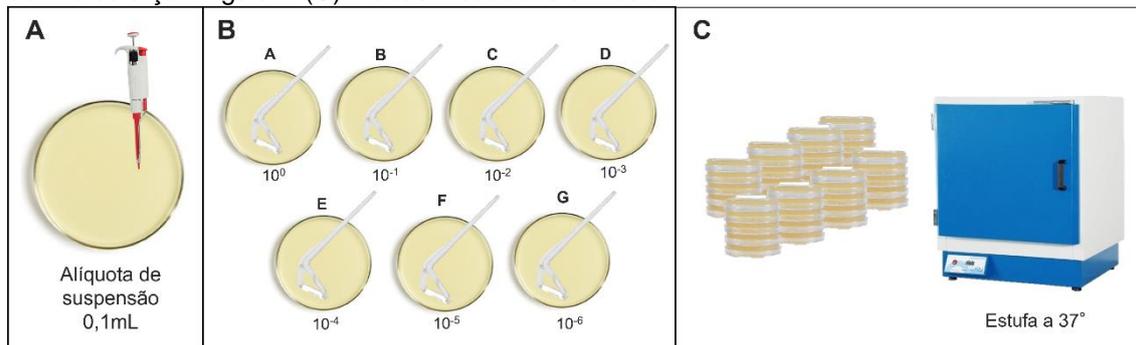
Figura 12. Representação esquemática da diluição seriada.



Fonte: Autor.

Alíquotas de suspensões 0,1 mL foram coletadas a cada diluição com auxílio de micropipeta Monocanal Labmate HTL ETQ (HTL, Daniszewska, Warskawa, Polônia) do microtubo Eppendorf esterilizado (Figura 13A) e semeadas em placas de Petri contendo meio Ágar Müeller Hinton pelo método de espalhamento em placa, com auxílio de alça Drigalski (Figura 13B) e então incubadas em estufa a 37 °C por 24 horas (Figura 13C).

Figura 13. Representação esquemática do espalhamento em placas. (A) Deposição da alíquota de cada suspensão em placa de Petri. (B) Semeadura das diluições em placa de Petri, com auxílio da alça Drigalski. (C) Placas incubadas em estufa.



Fonte: Autor.

3.5.1.3 Contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC)

Decorrido esse tempo, foi selecionada da placa de diluição correspondente a placa com a maior quantidade de colônias contáveis sem crescimento confluyente (placa D) (Figura 14A) e por meio de câmera fotográfica (Canon PowerShot SX520 HS, São Paulo, SP, Brasil) estabilizada em tripé, foi capturado uma fotografia da placa selecionada em fundo preto (Figura 14B), que foi importada para o programa ImageJ e realizado a contagem das unidades formadoras de colônia (UFC) (Figura 14C).

Figura 14. Representação esquemática do processo da avaliação de UFC. (A) Seleção da placa para contagem de UFC. (B) Aquisição de imagens para avaliação de UFC. (B) Contagem de UFC pelo programa Image J.



Fonte: Autor.

3.7.2 Verificação do biofilme por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Após os procedimentos de descontaminação, as amostras foram preparadas para microscopia eletrônica de varredura (E-1010, Hitachi, Ibaraki, Japão). Duas amostras de cada grupo foram clivadas com o auxílio de um cinzel cirúrgico esterilizado (Quinelato – Schobell Industrial Ltda, Rio Claro, SP, Brasil), após ranhuras feitas com disco de Carburundum (KG Sorensen, Barueri, SP, Brasil), montado em peça reta e motor de baixa rotação (Beltec, Araraquara, SP, Brasil). As duas metades obtidas foram então transferidas para um Eppendorf de 5 mL esterilizado contendo solução de glutaraldeído 2,5%, onde permaneceram por 24 h para fixação do biofilme remanescente (Figura 15A). Em seguida, foram desidratadas em graduações ascendentes de etanol (30%, 50%, 70%, 80%, 85 e 100%) por 5 min cada (Figura 15B). Posteriormente, as amostras foram transferidas para Eppendorfs de 5 mL esterilizados, dispostas em uma estante e colocados em um dissecador contendo sílica, por sete dias (LI et al., 2014; HUANG et al., 2017) (Figura 15C).

Figura 15. Representação esquemática do processo pré-metalização. (A) Fixação do biofilme remanescente pela solução de glutaraldeído 2,5%, durante 24 h. (B) Desidratação em graduação ascendente de etanol, 5 min em cada solução. (C) Secagem das amostras em um dissecador contendo sílica pelo período de 7 dias.

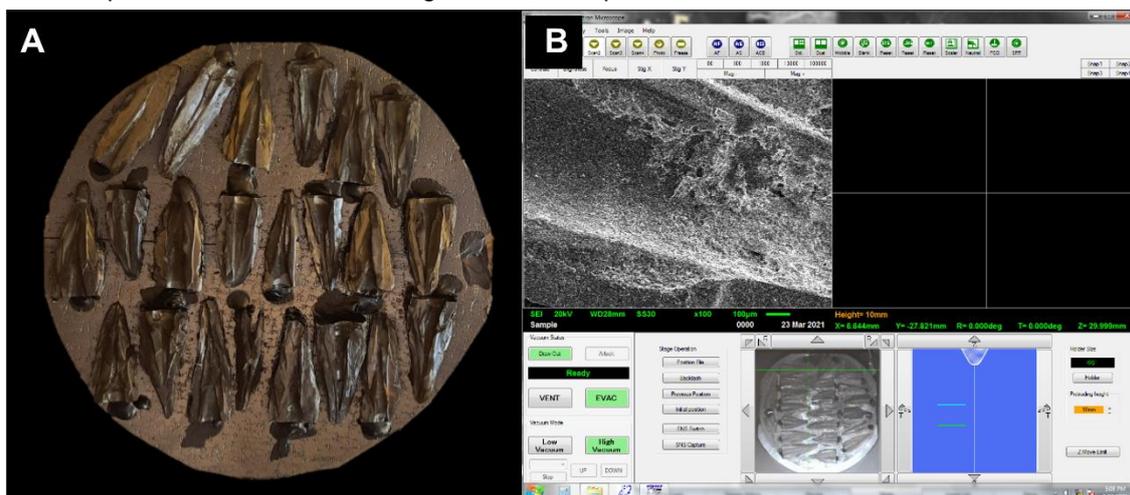


Fonte: Autor.

Após o processo de desidratação e secagem, as metades foram dispostos em *stubs* metálicos de formato cilíndrico com 8 cm de diâmetro e aderidos a superfície com fita adesiva dupla face de carbono (Electron Microscopy Sciences, Washington, Estados Unidos). As amostras foram levadas então para o equipamento de metalização a vácuo (SDC 050, Bal-Tec, Fürstentum, Liechtenstein), no qual receberam uma fina camada de uma liga de ouro e

paládio, sob os parâmetros: pressão de 0,1 mbar de vácuo, corrente de 40 mA, distância de 50 mm, tempo de cobertura de 120 s e espessura média de deposição de 20 a 30 nm (Figura 16A). Em seguida, as amostras foram levadas ao microscópio eletrônico de varredura (JSM 5410 – JEOL Ltda, Tóquio, Japão) e em aumento de 18x foram selecionadas aleatoriamente áreas de biofilme na dentina do canal radicular, nos terços cervical, médio e apical com aumento de 5000 x para obtenção das fotomicrografias (Figura 16B). As imagens obtidas foram salvas em formato TIF e posteriormente analisadas a fim de avaliar qualitativamente a adesão bacteriana a dentina peri e intra tubular e conseqüentemente a remoção do biofilme pelos protocolos de agitação na irrigação complementar.

Figura 16. (A) Amostras metalizadas para análise por MEV. (B) Programa JEOL Scanning utilizado para análise das fotomicrografias obtidas por MEV.



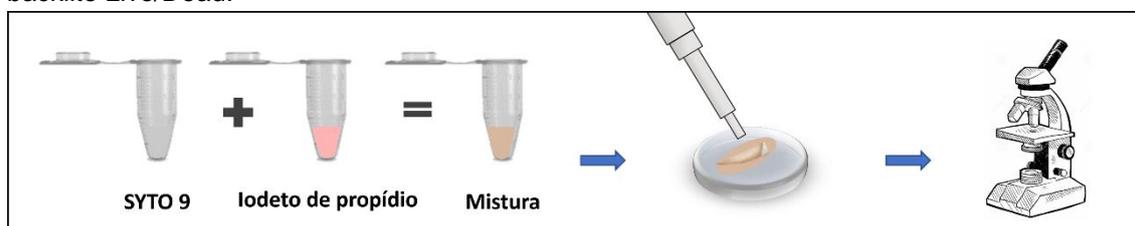
Fonte: Autor.

3.7.3 Verificação por Microscopia Confocal de Varredura a Laser (CLSM) associado a Kit de viabilidade bacteriana Light Live/Dead

A fim de avaliar proporção de bactérias viáveis e não viáveis no biofilme remanescente de *E. faecalis* após os protocolos de agitação na irrigação complementar, foi realizada microscopia confocal de varredura a laser (Microscópio Confocal Leica SP5, Wetzlar, Alemanha). Para isso, 2 amostras de cada grupo foram clivadas com o auxílio de um cinzel cirúrgico esterilizado (Quinelato – Schobell Industrial Ltda, Rio Claro, SP, Brasil), após ranhuras feitas com disco de Carburundum (KG Sorensen, Barueri, SP, Brasil) (Figura 12B),

montado em peça reta e motor de baixa rotação (Beltec, Araraquara, SP, Brasil). As duas metades obtidas foram então lavadas com 1 mL de PBS para remoção das células não aderidas. Os biofilmes foram corados com kit de viabilidade bacteriana (Live/Dead Bac Light Bacterial Viability and Counting 7012 Kit, Molecular Probes, Eugene, OR, EUA). O kit contém dois marcadores fluorescentes, SYTO 9 na cor verde, que penetra nas células com membranas intactas corando as células viáveis e iodeto de isopropídio vermelho, que penetra nas células com membranas lesadas corando as células mortas. Em capela de fluxo laminar protegido de luz e em temperatura ambiente, 50 µL da mistura dos corantes SYTO 9 e iodeto de propídio foram gotejados sobre as amostras com auxílio de micropipeta (Monocanal Labmate Pro 10 – 100 µL HTL HTL, Daniszewska, Warskawa, Polônia) e incubadas por 15 min. Após esse período, as amostras foram transferidas para uma placa confocal 35x10 mm (SPL COD 200350 - SPS Life Sciences, Pocheon-si, Coreia do Sul) e levados individualmente ao microscópio (Figura 17).

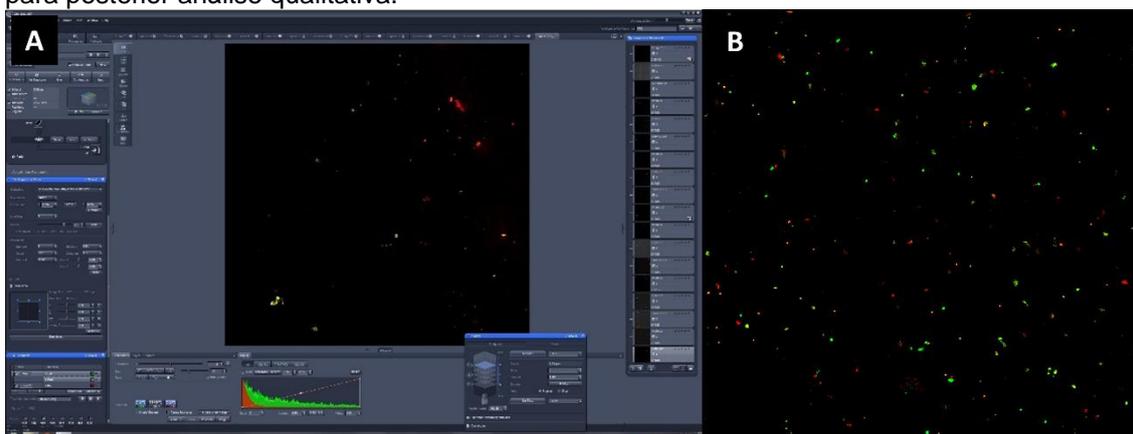
Figura 17. Representação esquemática da mistura dos corantes do Kit de viabilidade bacteriana backlite Live/Dead.



Fonte: Autor.

Em seguida, foi selecionada aleatoriamente uma área em cada terço do canal radicular (cervical, médio e apical), e as imagens foram capturadas com uma lente com objetiva de 40×, uma camada a cada intervalo de 3µm de profundidade, totalizando 10 camadas em 30µm, no formato 512 x 512 pixels com o programa ZEN 2011 SP7 (ZEISS – Seeing beyond, Jena, Alemanha) (Figura 18A), representando uma área de 275 x 275µm² (Figura 18B). A análise qualitativa das imagens foi realizada posteriormente pelo programa ImageJ.

Figura 18. (A) Programa ZEN 2011 SP7 utilizado para aquisição das imagens da Microscopia Confocal a Laser; (B) Imagem adquirida evidenciando proporção de bactérias viáveis e inviáveis para posterior análise qualitativa.



Fonte: Autor.

3.8 Análise dos resultados

Os dados quantitativos obtidos foram submetidos aos testes de Shapiro-Wilk para aderência à curva normal e Levene para homogeneidade de variância. Os dados obtidos da contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) encontrados nos canais radiculares após os protocolos experimentais, foram tabulados e expressos em valores médios e desvios-padrão. A redução da carga microbiana foi realizada em comparação ao grupo controle positivo por meio do teste T. Os dados obtidos na contagem de UFC foram analisados pelo teste de Análise de Variância (ANOVA) a dois fatores, seguido pelo pós-teste de Tukey para a comparação entre grupos em relação a solução irrigante e protocolo de agitação na irrigação complementar. A análise estatística foi realizada com valores transformados em log10 com auxílio do programa SigmaPlot 12.0 (Systat Software, San Jose, CA, EUA) com nível de significância de 5%.

4 RESULTADOS

4.1 Análise Microbiológica

A análise de variância a dois critérios dos valores de UFC após os protocolos de agitação na irrigação complementar, demonstrou diferença estatisticamente significativa entre as soluções ($p < 0,001$) e entre os métodos de agitação ($p < 0,001$), como também da interação entre os fatores (solução e agitação) ($p < 0,001$). Assim, o método de agitação pode interferir nos resultados de descontaminação, dependendo da solução utilizada (Tabela 2).

Tabela 2. Resultados da análise de variância dos valores de UFC após os protocolos de agitação na irrigação complementar.

| Fonte de Variação | Soma Quadrados | DF | Quadrado Médios | F | p |
|-------------------|----------------|----|-----------------|---------|--------|
| Solução | 5,356 | 1 | 5,356 | 360,676 | <0,001 |
| Agitação | 6,332 | 3 | 2,111 | 142,136 | <0,001 |
| Interação | 0,543 | 3 | 0,181 | 12,187 | <0,001 |
| Resíduo | 0,832 | 56 | 0,0148 | | |
| Total | 13,062 | 63 | | | |

Todos os métodos de agitação associados à NaOCl 2,5% apresentaram maiores reduções de UFC quando comparados aos grupos associados à solução de PBS ($p < 0,05$). Considerando a solução de PBS, o teste de Tukey demonstrou que os menores e maiores valores de UFC foi observado após irrigação por PUI 30% e PAP, respectivamente ($p < 0,001$) (Tabela 3).

Já para a solução de NaOCl 2,5%, os menores valores de UFC foram observados após PUI 30%, quando comparado aos demais grupos ($p < 0,001$), enquanto que os maiores valores de UFC foram observados nos grupos PAP e XPC, que não apresentaram diferença estatística entre si ($p > 0,05$) (Tabela 3).

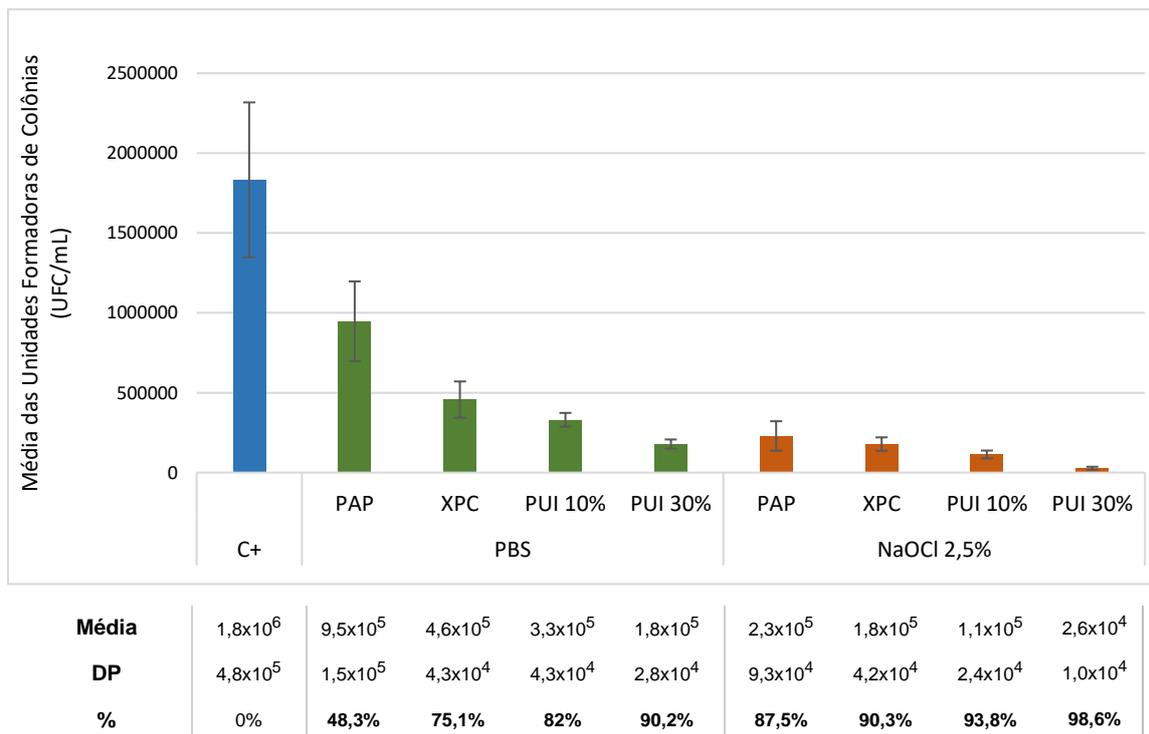
Tabela 3. Média±DP em log₁₀ CFU / mL para análise entre os protocolos de agitação na irrigação complementar.

| Protocolos de agitação | Solução irrigante | |
|------------------------|-------------------|----------------|
| | PBS | NaOCl 2,5% |
| | Média±DP | Média±DP |
| PAP | 5,97 ± 0,11 Aa | 5,36 ± 0,16 Ba |
| XPC | 5,66 ± 0,12 Ab | 5,25 ± 0,10 Ba |
| PUI 10% | 5,52 ± 0,06 Ab | 5,05 ± 0,09 Bb |
| PUI 30% | 5,25 ± 0,07 Ac | 4,41 ± 0,19 Bc |

Diferentes letras maiúsculas na mesma linha significam diferença estatística entre colunas e diferentes letras minúsculas na mesma coluna significam diferença estatística entre linhas (teste de Tukey, $p < 0,05$).

O grupo controle positivo apresentou em média $1.833.000 \pm 484.605,3$ de UFC, sendo considerado como referência para o cálculo do percentual de descontaminação microbiana (0%). O teste T demonstrou que todos os grupos experimentais, independente da solução irrigante e método de agitação, reduziu significativamente a contaminação microbiana em relação ao grupo controle positivo ($p < 0,05$). O maior percentual de descontaminação microbiana foi observada após PUI 30% associado à solução de NaOCl 2,5% (98,6%), enquanto o menor foi observado após irrigação convencional por PAP com solução PBS (48,3%) (Figura 19).

Figura 19. Média e desvio-padrão das unidades formadoras de colônia (UFC/mL) C+ e percentual (%) de descontaminação do conduto radicular dos grupos experimentais em relação ao grupo C+.



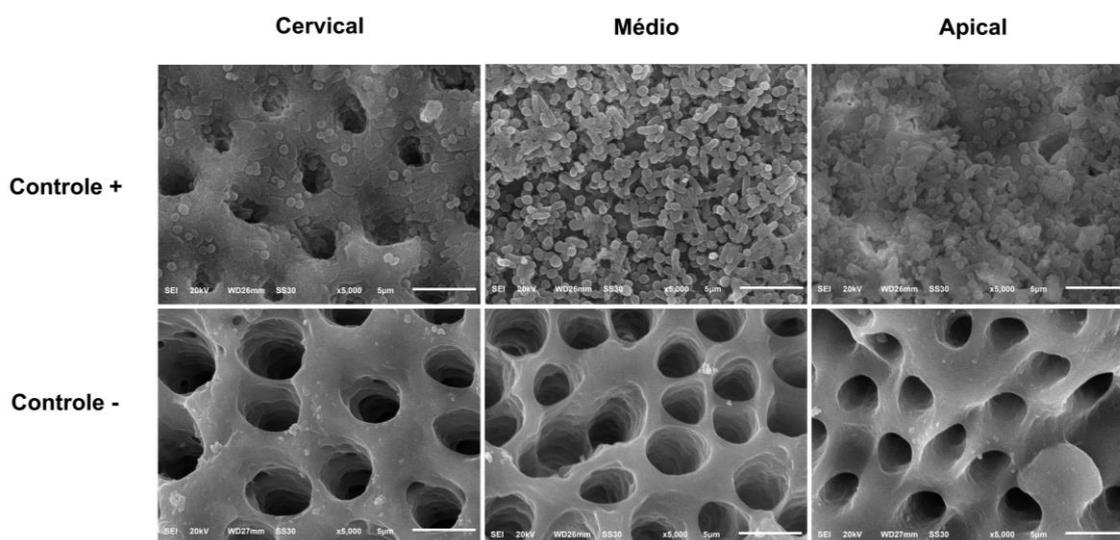
Valores em negrito indicam diferença estatística do método de agitação ou solução irrigante em relação ao C+ (Teste T, $p < 0,05$). Nenhuma bactéria foi observada no grupo controle negativo (gráfico de barras não apresentado).

* O gráfico não foi apresentado em escala logarítmica para melhor visualização da escala.

4.2 Análise do Biofilme por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

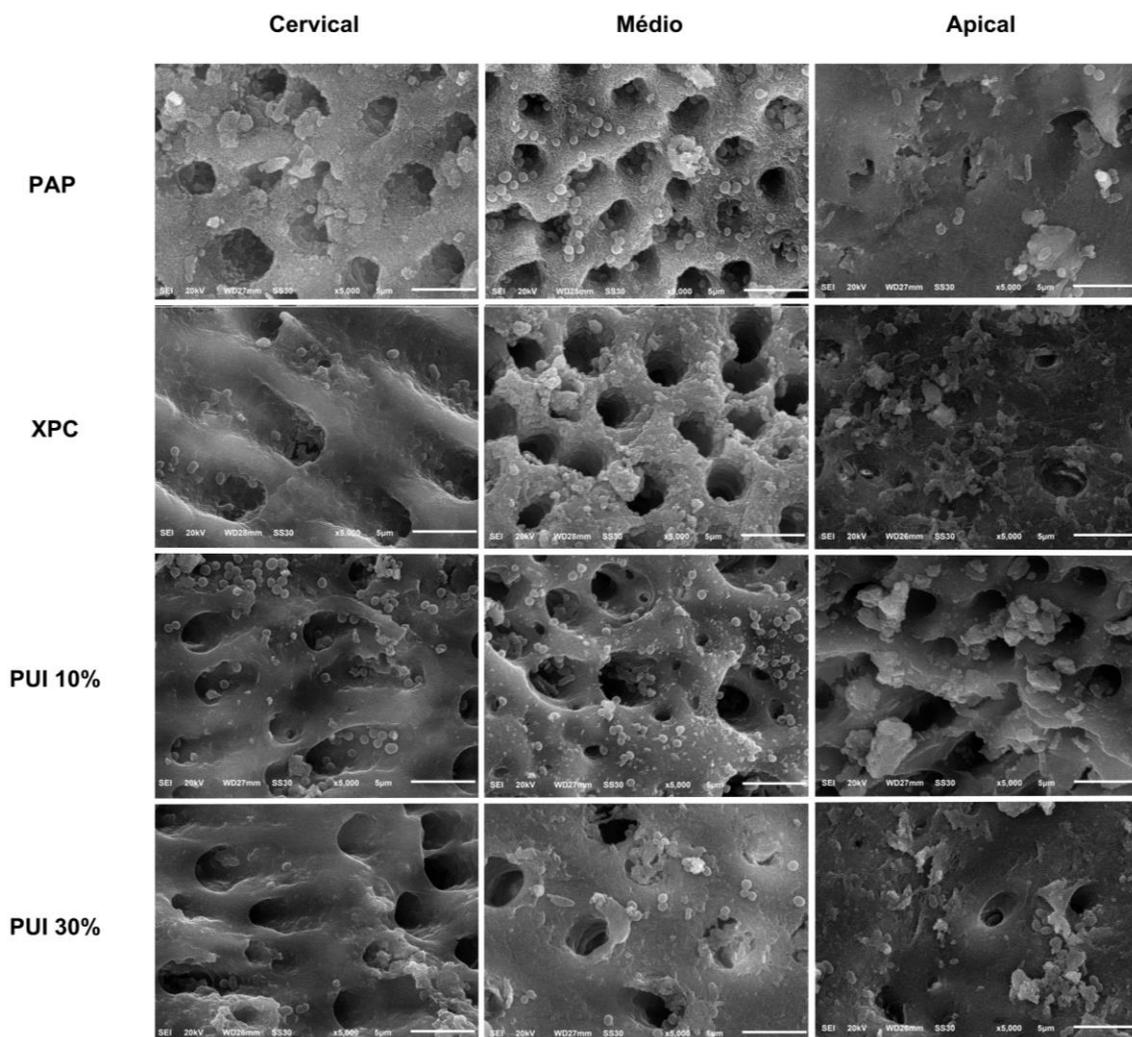
As amostras do grupo controle positivo, demonstraram biofilmes densos de *E. faecalis* desenvolvidos na superfície do canal radicular, podendo observar aglomerados bacterianos especialmente nos terços cervical e apical (Figura 20). O controle negativo mostrou canal radicular com túbulos dentinários livres de bactérias (Figura 20).

Figura 20. Imagens obtidas através de microscopia eletrônica de varredura em 5000x dos três terços cervical, médio e apical da superfície radicular referentes aos grupos controle positivo e controle negativo.



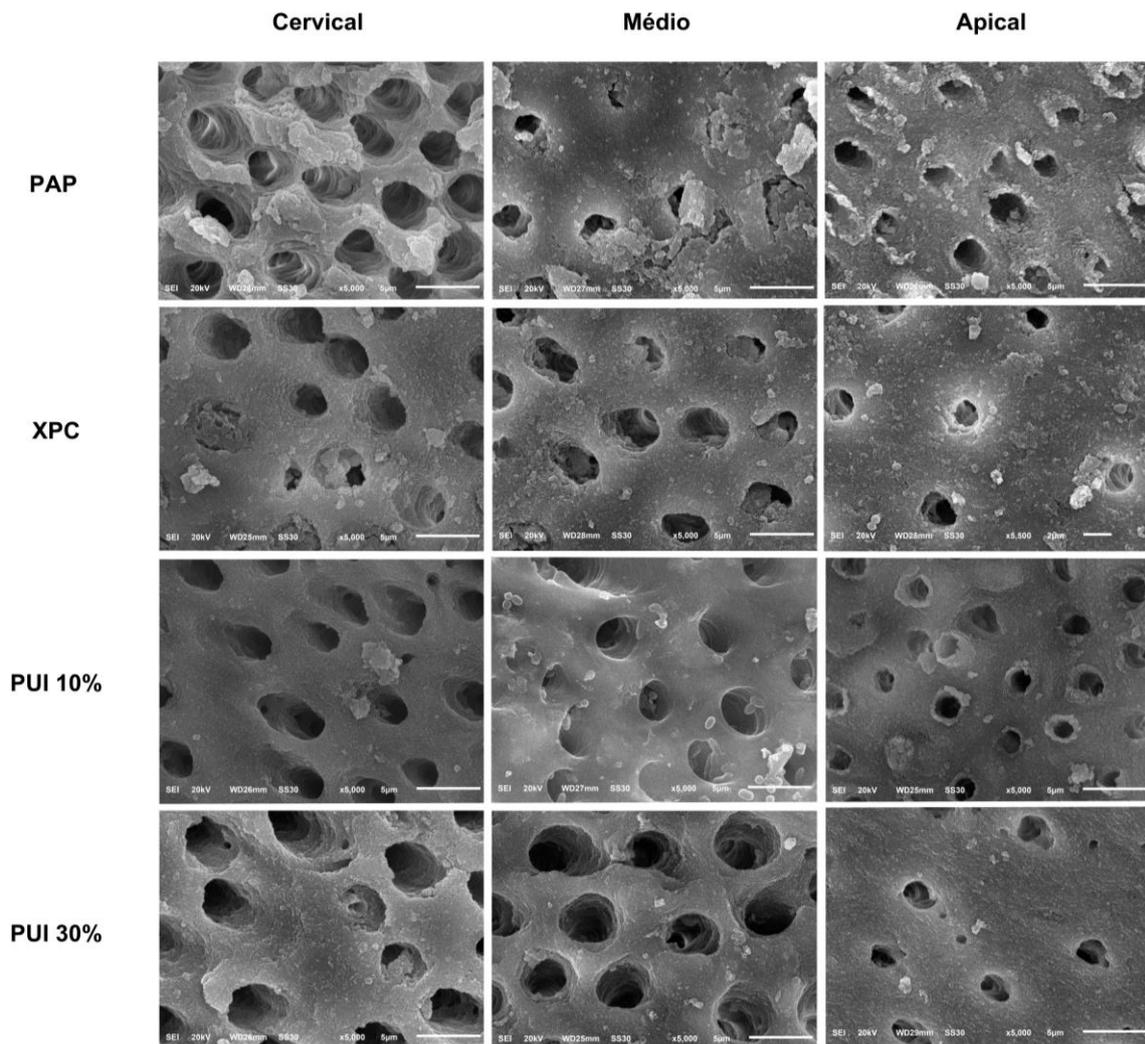
Na avaliação qualitativa dos diferentes grupos experimentais, foi possível observar imagens sugestivas de maior redução microbiana após irrigação complementar associada à solução NaOCl 2,5% comparado ao PBS, em todos os terços. Para a solução de PBS, foi observado que o grupo PUI 30%, sugeriu maior redução microbiana comparado aos demais grupos. Os grupos com protocolo de agitação XPC e PUI 10% sugerem menores quantidades de bactérias aderidas as paredes dos canais radiculares quando comparado ao grupo PAP, principalmente nos terços cervical e apical, sendo observado redução microbiana semelhante entre eles (Figura 21).

Figura 21. Imagens obtidas através de microscopia eletrônica de varredura em 5000x dos três terços da superfície radicular, após aplicação de diferentes protocolos de agitação na irrigação complementar associado a solução de PBS.



Para a solução de NaOCl 2,5%, de maneira geral sugere-se maior redução de volume de bactérias aderidas, principalmente nos terços cervical e médio, com redução mais expressiva para os grupos PUI 10% e 30%. Semelhantemente, para o terço apical, também sugere-se maior redução de volume de bactérias aderidas para os grupos PUI 10% e 30%, porém, o aumento da potência evidenciou maior redução nas bactérias dentro dos túbulos dentinários (Figura 22).

Figura 22. Imagens obtidas através de microscopia eletrônica de varredura em 5000x dos três terços da superfície radicular, após aplicação de diferentes protocolos de agitação na irrigação complementar associado à solução de NaOCl 2,5%.



4.3 Análise da viabilidade bacteriana por Microscopia Confocal a Laser associado a Kit Live/Dead

Analisando qualitativamente a viabilidade de *E. faecalis* aderidos sobre a superfície do canal radicular após os diferentes protocolos de agitação na irrigação complementar por meio de microscopia confocal a laser, verificou-se maior adesão de bactérias mortas/inviáveis (coloração vermelha) em relação as bactérias vivas/viáveis (coloração verde) nos grupos com irrigação associada à solução de NaOCl 2,5% comparado aos grupos com solução de PBS.

Em relação a todos os grupos experimentais, as proporções de bactérias viáveis (verdes) / não viáveis (vermelhas) foram significativamente menores do que os do grupo controle positivo (Figura 23, 24 e 25).

De forma geral, os protocolos com agitação ultrassônica reduziram as proporções de bactérias viáveis (verdes) / não viáveis (vermelhas) independente da solução irrigante (Figura 24 e 25) comparado aos demais grupos experimentais. O aumento da potência da agitação ultrassônica resultou em redução ainda maior da proporção de bactérias viáveis (verdes) / não viáveis (vermelhas) especialmente nos terços médio e apical quando associado à solução de PBS, e no terço apical quando associado à solução de NaOCl 2,5% (Figuras 24 e 25).

Já o grupo XPC apresentou resultados intermediários, sendo que apresentou maior redução da proporção de bactérias viáveis (verdes) / não viáveis (vermelhas) em relação ao grupo PAP, mais evidente no terço cervical quando utilizada solução de PBS e nos terços médio e apical quando utilizada a solução de NaOCl 2,5% (Figuras 24 e 25).

Figura 23. Imagens obtidas através de microscopia confocal a laser com lente de aumento 40x e profundidades de 30 μ m, dos três terços da superfície radicular, dos grupos controle positivo e controle negativo.

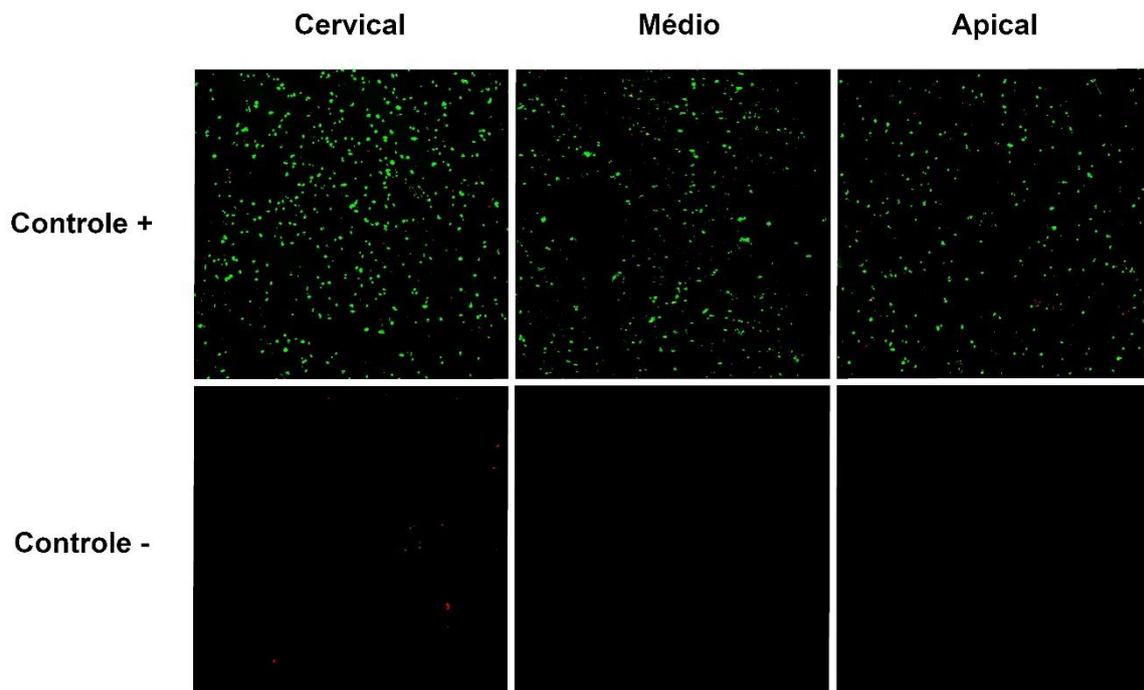


Figura 24. Imagens obtidas através de microscopia confocal a laser com lente de aumento 40x e profundidades de 30 μ m, dos três terços da superfície radicular, após aplicação de diferentes protocolos de agitação associado a solução de PBS.

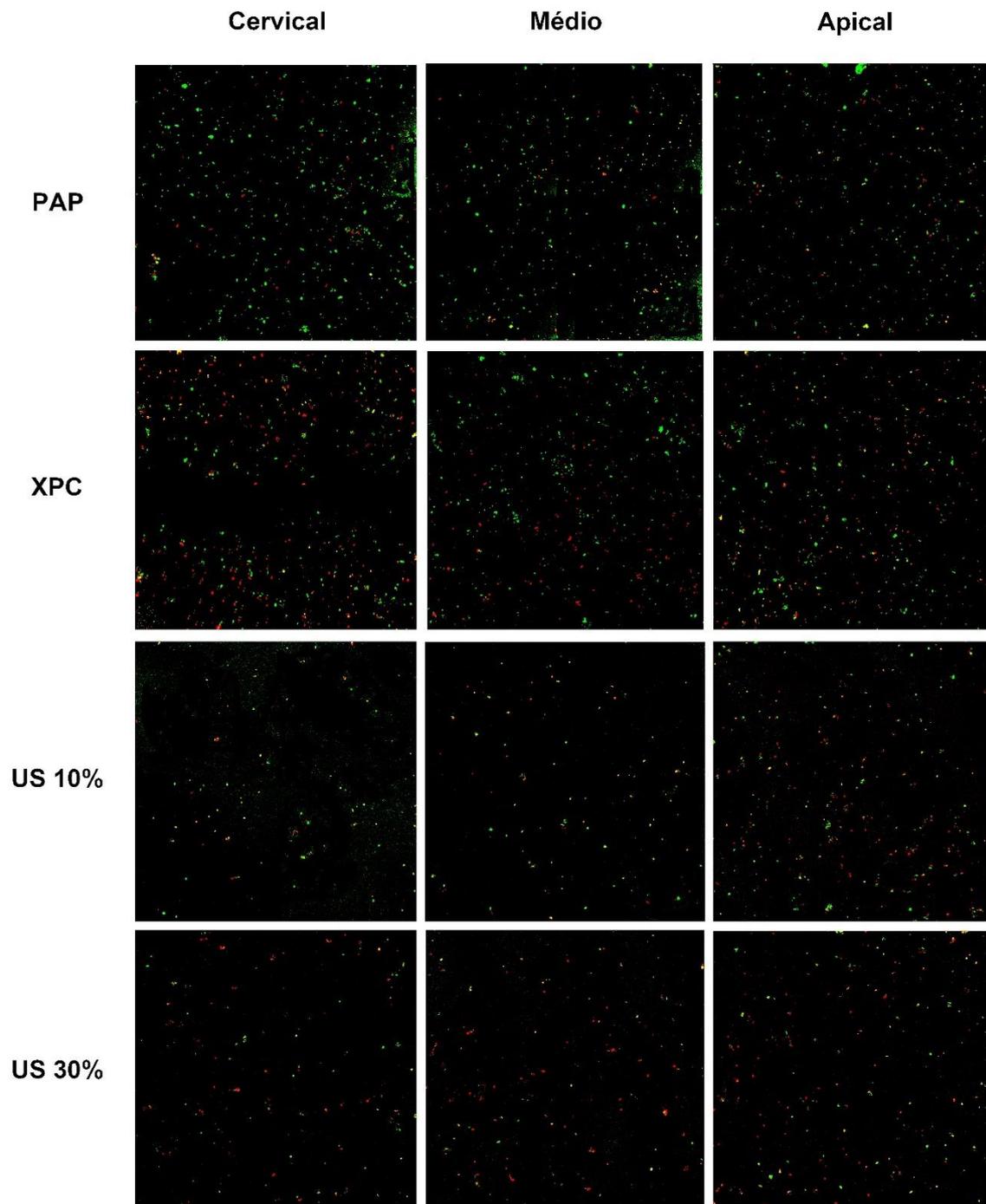
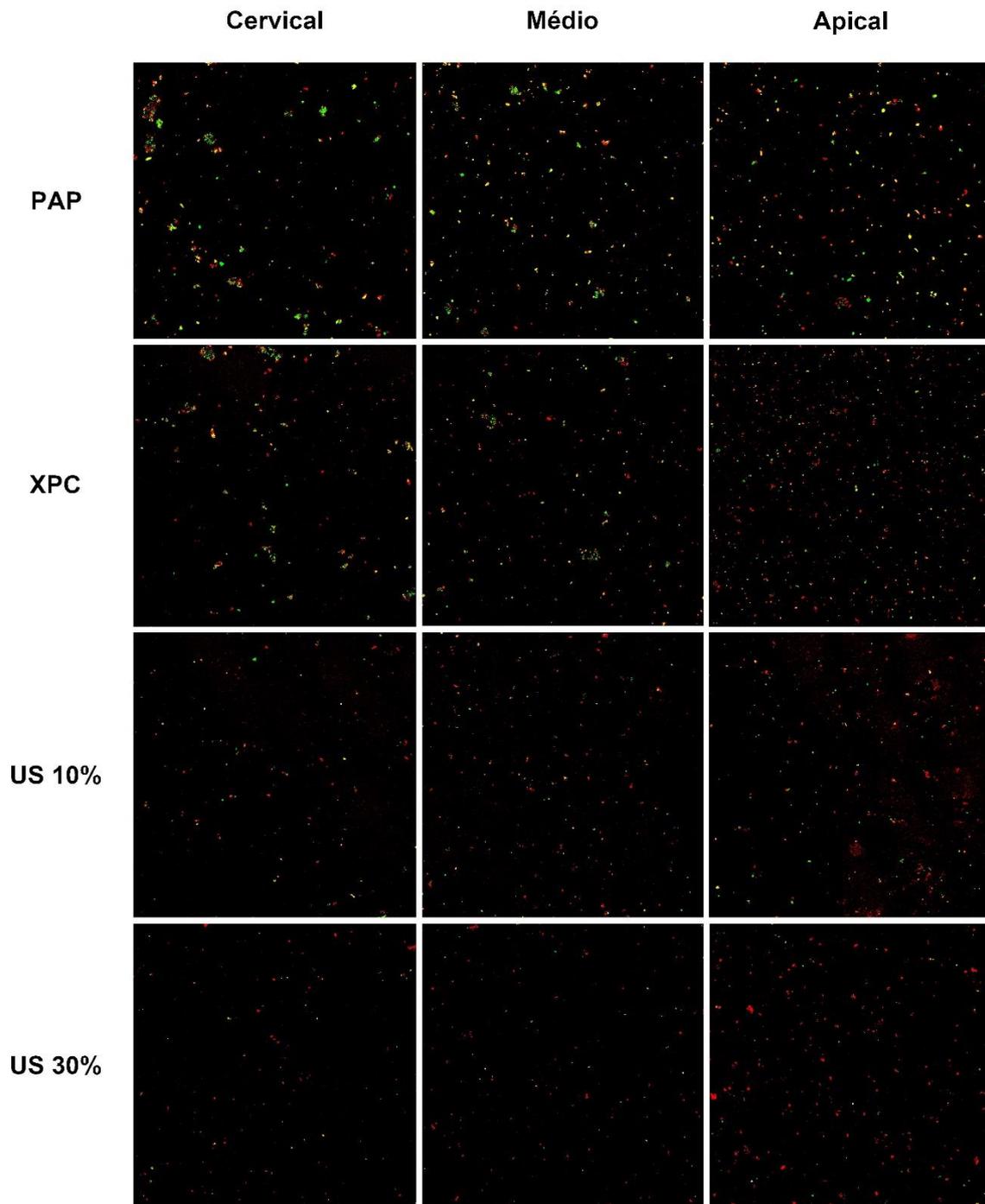


Figura 25. Imagens obtidas através de microscopia confocal a laser com lente de aumento 40x e profundidades de 30 μ m, dos três terços da superfície radicular, após aplicação de diferentes protocolos de agitação associado à solução de NaOCl 2,5%.



5 DISCUSSÃO

Visto que a microbiota tem importante papel no desenvolvimento de infecções endodônticas e que os desafios anatômicos dificultam a ação dos instrumentos durante o preparo biomecânico novas estratégias complementares ao preparo biomecânico devem ser investigadas a fim de melhorar a limpeza e desinfecção do sistema de canais radiculares.

Para isso, neste estudo foram utilizados dentes humanos com intuito de buscar maior similaridade com a realidade clínica. A contaminação microbiana está relacionada a dentina radicular, substrato utilizado para o estabelecimento de um biofilme complexo que simule o existente no sistema de canais radiculares (MURAD et al., 2012). Nesse sentido, apesar da literatura mostrar semelhança na penetração de bactérias (BRITTAN et al., 2016) e no diâmetro dos túbulos na dentina humana e bovina (CAMARGO et al., 2008; CASTANHO et al., 2011), estudos evidenciam diferença significativa em relação ao número de túbulos dentinários, sendo mais numerosos nos dentes bovinos comparados aos dentes humanos (CAMARGO et al., 2007). Além disso, o maior volume do canal do incisivo bovino em relação ao dente humano pode comprometer a similaridade da aplicação do ultrassom, pois para PUI, estudos mostram que quanto mais livre o inserto estiver dentro do canal, maior será a frequência e a amplitude do seu deslocamento (VAN DER SLUIS; WU; WESSELINK, 2005; VAN DER SLUIS; WU; WESSELINK, 2007; RODIG et al., 2010; BUTCHER; MANSOUR; IBRAHIM, 2019). O espaço livre no conduto radicular influencia diretamente no fluxo acústico e conseqüentemente na energia transmitida para a solução irrigante e na sua efetividade de limpeza. Ou seja, quanto maior o alargamento no preparo do canal radicular, maior a efetividade de limpeza (VAN DER SLUIS; WU; WESSELINK, 2005; VAN DER SLUIS; WU; WESSELINK, 2007; RODIG et al., 2010; ALMEIDA et al., 2015; BUTCHER; MANSOUR; IBRAHIM, 2019).

Ainda em relação as amostras, as análises qualitativa e quantitativa da morfologia interna do sistema de canais radiculares dos dentes humanos utilizados nesse estudo, foram realizadas por meio de tomografia computadorizada de feixe cônico (TCFC), permitindo a formação de grupos

experimentais equilibrados em relação a anatomia interna pós-preparo biomecânico assim como em relação ao espaço livre para a ação do inserto ultrassônico. Assim, a distribuição estratificada dos grupos experimentais de acordo com a anatomia interna do sistema de canais radiculares, contribui para a obtenção de resultados mais confiáveis (SOUSA-NETO et al., 2018; DE DEUS et al., 2020).

Outro fator metodológico importante deste estudo foi a escolha do *E. faecalis* na sua forma de organização em biofilme. O *E. faecalis* é um marcador bacteriológico prevalente em infecções endodônticas persistentes (STUART et al., 2006; PRADA et al., 2019a) e a literatura evidencia que a formação do seu biofilme ocorre em 24 h (ALMEIDA et al., 2015; SWIMBERGHE et al., 2019) e começa a se maturar após 36 h, se distribuindo uniformemente em toda a superfície e consolidando sua formação 72 h depois (BHUVA et al., 2010; JHAIHARIA et al., 2015; SAKKO; TIADERHANE; RAUTEMAA-RICHARDSON 2016; SWIMBERGHE et al., 2019; PEREIRA et al., 2021). Corroborando com outros estudos, o presente estudo realizou o processo de inoculação em um intervalo de 21 dias, com o intuito de conferir maior resistência ao biofilme ao considerar que neste período se torna mais denso e aparente (WILLIAMSON et al., 2009; SHEN et al., 2011; TIANFENG et al., 2014; BULACIO et al., 2015; SWIMBERGHE et al., 2019), como pode ser observado nas imagens de MEV do grupo controle positivo.

Em relação a ação antimicrobiana avaliada neste estudo, os resultados mostraram que independentemente da solução irrigante empregada, todos os protocolos com ou sem agitação na irrigação complementar, apresentaram redução microbiana significativa. Esse resultado se deve a força de cisalhamento, que consiste nas forças de atrito entre a solução e a parede do canal radicular que ocorrem durante o fluxo do irrigante, que ocorre independente do sistema de agitação e solução irrigante (MOORER; WESSELINK, 1982; STOJICIC et al., 2010; VAN DER SLUIS, 2015; TAVELLA E SILVA et al., 2020).

Durante os protocolos de irrigação complementar, as soluções irrigantes utilizadas foram divididas em inerte com utilização da solução de PBS e em quimicamente ativo com utilização NaOCl 2,5% (PRADA et al., 2019b; ZEHNDER, 2006). A solução de PBS foi utilizada neste estudo a fim de permitir

a avaliação da ação antimicrobiana dos métodos de agitação em relação a sua ação física e mecânica, isolada da ação química das soluções irrigantes. A solução tampão fosfato-salina, comumente chamada de PBS (phosphate buffered saline), é uma solução salina que possui como principal função manter o pH e a pressão osmótica semelhante a encontrada no ambiente biológico natural, garantindo a conservação de células *in vitro*, a fim de mantê-las estáveis, impedindo assim a lise de células bacterianas, além de manter saudável as estruturas dentinárias (REYES-CARMONA et al., 2010; DE ALMEIDA, 2014).

Já a solução NaOCl 2,5%, foi selecionada para este estudo por ser considerada padrão ouro na eficácia contra microrganismos, erradicação de biofilme e inativação de endotoxinas (ZEHNDER, 2006; MOHAMMAD et al., 2014), sendo a única solução irrigante com capacidade de desorganizar biofilmes (DEL CARPIO-PEROCHENA et al., 2011; GOMES et al., 2013), corroborando com os resultados deste estudo que mostraram que todos os métodos de agitação quando associados à solução NaOCl 2,5%, apresentaram aumento significativo na descontaminação microbiana, quando comparado a sua ação isolada pela associação à solução de PBS.

Vale ressaltar que para a solução de NaOCl, se faz importante o adequado controle do tempo e volume durante a irrigação, pois estes fatores podem alterar a eficiência da solução e conseqüentemente dos resultados de limpeza (STOJICIC et al., 2010; PETRIDIS et al., 2019). Dessa forma, neste estudo foram padronizados tempo e volume de dispersão das soluções empregadas.

No que se refere aos protocolos de agitação na irrigação complementar, a ausência de agitação por pressão apical positiva apresentou os maiores valores de UFC em relação a todos os outros grupos com agitação da solução independentemente do tipo de solução irrigante. Apesar de ser considerada eficiente e possuir rotineira aplicação clínica, a irrigação com pressão apical positiva por seringa e agulha apresenta limitações, sendo identificadas regiões inacessíveis e irregularidades com presença de detritos e bactérias após o seu uso (WU; WESSELINK, 2001; NAIR et al., 2005; WU, DUMMER; WESSELINK, 2006; GU et al., 2009; LEONI et al., 2017; SIQUEIRA et al., 2018). Isso se deve entre outros fatores, ao difícil controle do fluxo da solução no interior dos canais (VAN DER SLUIS et al., 2006; KAHN et al., 2007; GU et al., 2009), pois prevalece

um fluxo laminar constante sem que haja variação de velocidade, mantendo as partículas em movimentos ordenados, não tendo energia suficiente para a remoção de detritos e microrganismos por apresentar uma lavagem mecânica consideravelmente fraca (BOUSIOUKIS; VAN DER SLUIS; BASRANI; 2015; CAPELLI, CAMARGO 2016).

A agitação mecânica com XPC proporcionou descontaminação semelhante ao PUI 10% quando considerada sua ação isolada e semelhante ao PAP quando associada à solução de NaOCl 2,5%, este resultado foi evidenciado tanto pela contagem de UFC, assim como sugerido pela análise por MEV e confocal que mostram semelhança no biofilme aderido e na proporção de bactérias viáveis/ não viáveis (vermelhas) nos três terços. Segundo o fabricante, a agitação mecânica com o uso do instrumento XP Clean possui dois mecanismos de ação, sendo eles o contato mecânico com as paredes internas do canal radicular, com o intuito de remover resíduos e microrganismos que não foram removidos no preparo biomecânico e a agitação do líquido irrigante, aumentando seu poder de limpeza (VAZ-GARCIA et al., 2018). O efeito mecânico da lima XPC, ao possibilitar o efeito de turbilhonamento da solução irrigante, unido ao contato com as paredes do canal radicular, pode melhorar efetivamente o efeito de desinfecção, contudo, não possui mesma capacidade de arraste da PUI quando associado à solução de NaOCl 2,5%.

A vibração do instrumento ultrassônico dentro do canal radicular provoca o efeito de cavitação no qual há a formação de bolhas com quantidades variáveis de vapor, que implodem ao alcançar diâmetro crítico alterando as condições de pressão hidrostática e temperatura da solução (AHMAD et al., 1992; FERRARI; BOMBANA, 2010; ROMUALDO et al., 2013; WANG et al., 2013; LOPES et al., 2015). Além da cavitação, a vibração também provoca outro mecanismo físico denominado efeito acústico, que consiste no movimento rápido da solução irrigante, de forma circular em torno das ondas vibratórias, descrita como microfluxo acústico, possibilitando assim a limpeza e desinfecção em espaços diminutos no interior dos canais (AHMAD et al., 1987; VAN DER SLUIS et al., 2007; HUFFAKER et al., 2010; PAQUÉ et al., 2011; CAPELLI, 2016).

Diferentemente da associação com solução de PBS, a agitação por PUI 10% associado à NaOCl 2,5% apresentou maior inibição bacteriana em profundidade nos três terços avaliados, quando comparado os grupos XPC e

PAP. Este resultado sugere que a transmissão de energia durante a PUI pode ser mais efetiva para a solução de NaOCl melhorando a ação química do irrigante. A agitação provocada pela PUI pode aumentar a temperatura da solução de NaOCl, favorecendo as colisões moleculares, contribuindo para a velocidade da reação, intensificando a liberação de cloro ativo (STOJICIC et al., 2010; LOPES et al., 2015). Por meio disso, o vapor de cloreto gerado a partir do NaOCl, pode se difundir na bolha e a concentração de vapor dissolvido no líquido e sua temperatura contribuem para sua expansão (BRENNER et al., 2002; LOPES et al., 2015), o que pode influenciar positivamente nos efeitos de cavitação e fluxo acústico (DE GREGORIO et al., 2010; LI et al., 2020), além de aumentar a eficácia das soluções de hipoclorito, melhorando sua capacidade de dissolução de tecido e aumentando a eficácia contra células de *E. faecalis* (ABOU-RASS; OGLESBY, 1981; SIRTES et al., 2005; ROSSI-FEDELE; DE FIGUEIREDO, 2008; STOJICIC et al., 2010).

Na literatura atual não há registros de estudos que avaliem diferentes potências durante a irrigação ultrassônica na efetividade de limpeza do sistema de canais radiculares. Entretanto, neste estudo o aumento da potência ultrassônica se mostrou relacionado com uma maior eficiência da redução microbiana. Esse resultado pode estar relacionado a maior amplitude de oscilação na potência de 30%, visto que quanto maior a potência empregada, maior a influência da frequência e da intensidade na transmissão de energia do inserto para a solução irrigante, resultando em um fluxo acústico mais poderoso e uma maior capacidade de cavitação (VAN DER SLUIS et al., 2007). A energia dissipada pela PUI atinge as paredes do canal radicular, que a absorve e devolve em sentido oposto para o meio, na mesma direção de seu movimento e com a mesma intensidade (LEIGHTON 1994) e a oscilação proporcionada resulta em melhor ressonância mecânica pelo inserto, favorecendo seu efeito de nodo e anti-nodo, sendo assim capaz de alterar estruturalmente e funcionalmente células biológicas ou macromoléculas, tornando-as inviáveis em sua maior quantidade (VANSAN et al., 1990; VAN DER SLUIS et al., 2007; MESKITA; KURNET, 2008; JIANG et al., 2011).

Assim, a maior ação antimicrobiana resultante da energia dissipada pela utilização da potência ultrassônica ideal após calibração foi evidenciada neste estudo, não apenas pela inviabilização bacteriana observada na microscopia

confocal, como também pelo melhor arraste do biofilme observado na MEV, especialmente quando o método de agitação foi avaliado de forma isolada da ação química pela utilização da solução PBS.

Vale destacar que as potências escolhidas para este estudo foram baseadas na potência mínima indicada pelo fabricante e no controle de potência ideal do aparelho. O aumento demasiado da potência ultrassônica não é recomendado, ao considerar que a combinação entre a configuração da energia com o tempo de ativação está intimamente relacionado com o aumento da temperatura no interior dos canais radiculares, o que pode ultrapassar os níveis suportados biologicamente pelos tecidos periodontais e superfície radicular, podendo gerar injúrias imediatas ou futuras aos tecidos de sustentação e suporte (SAUNDERS et al., 1989; MICHELIOTO et al., 2004; MADARATI et al., 2008; ROLDI et al., 2010). Ademais, o aumento excessivo da temperatura pode gerar fratura do inserto ultrassônico, semelhante ao que ocorre quando instrumentos endodônticos de NiTi são submetidos à múltiplos processos de esterilização, visto que o calor afeta as propriedades de dureza e microestrutura do instrumento (YARED et al., 2000; CHEUG et al., 2009).

Assim, a partir dos resultados apresentados em relação ao impacto do aumento da potência ultrassônica baseado na calibração na efetividade de limpeza promovida por esta agitação, torna-se importante novos estudos para desenvolvimento de protocolos mais efetivos e seguros a fim de melhorar a limpeza e redução microbiana no sistema de canais radiculares, além de verificar o impacto desse aumento em todas as fases do tratamento endodôntico, suas consequências na dentina radicular e na adesividade dos materiais obturadores.

6 CONCLUSÕES

- Todos os protocolos de irrigação complementar com ou sem agitação, apresentaram redução microbiana, independente da solução química.
- Quando associada à solução de PBS, os protocolos de agitação, por instrumento rotatório ou ultrassom, apresentam melhor ação antimicrobiana comparado a irrigação convencional.
- Quando associada à solução de NaOCl, a agitação ultrassônica apresenta a melhor ação antimicrobiana quando comparada a agitação por instrumento rotatório e irrigação convencional.
- O aumento da potência ultrassônica apresenta os melhores resultados de ação antimicrobiana dentre os protocolos de agitação na irrigação complementar, independente da solução química.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOU-RASS, M.; OGLESBY, S. W. The effects of temperature, concentration, and tissue type on the solvent ability of sodium hypochlorite. **J Endod.** v. 7, n.376-377, 1981.

AHMAD, M.; PITT FORD, T. J.; CRUM, L. A. Ultrasonic debridement of root canals: acoustic streaming and its possible role. **J Endod.**, v.13, n.1, p.490–499, 1987.

AHMAD, M.; ROY, R. A.; KAMARUDIN, A. G. Observations of acoustic streaming fields around an oscillating ultrasonic file. **Endod Dent Traumatol.**, v.8, p.189–194, 1992.

ALASKSHAR, A.; SALEH, A. R. M.; GORDUYSUS, M. O. Debris and Smear layer removal from oval root canals comparing XP-Endo Finisher, EndoActivator and Manual Irrigation: A SEM evaluation. **Eur. J. Dent.**, v.14, n.4, p.626-633, 2020.

ALBRECHT, L.; BAUMGARTNER, J. C.; MARSHALL, J. G. Evaluation of Apical Debris Removal Using Various Sizes and Tapers of ProFile GT Files. **J Endod.**, v.30, n.6, p.425-428, 2004.

ALMEIDA, B. C.; ORMIGA, F.; ARAÚJO, M. C. P.; LOPES, R. T.; LIMA, I. C. B.; SANTOS, B. C.; GUSMAN, H. Influence of heat treatment of nickel-titanium rotary endodontic instruments on apical preparation: a micro-computed tomographic study. **J Endod.** v.41, n.12, p.2031-2035, 2015.

ALVES, F. R. F.; ROÇAS, I. N.; ALMEIDA, B. M.; NEVES, M. A. S.; ZOFFOLI, J.; SIQUEIRA, F. J. Quantitative molecular and culture analyses of bacterial elimination in oval-shaped root canals by a single-file instrumentation technique. **Int. Endod. J.** V.45, P.871–877, 2012.

ARIAS, A.; PAQUÉ, F.; SHYN, S.; MURPHY, S.; PETERS, O. A. Effect of canal preparation with TRUShape and Vortex rotary instruments on three-dimensional geometry of oval root canals. **Aust Endod J.** v.44, n.1, p.32-39, 2018.

AZIM, A. A.; PIASECKI, L.; SILVA-NETO, U. X.; CRUZ, A. T.; AZIM, K. A. XP shaper, a novel adaptive core rotary instrument: micro-computed tomographic analysis of its shaping abilities. **J Endod.**, v.43, n.9, p.1532-1538, 2017.

BAO, P.; SHEN, Y.; LIN, J.; HAAPASALO, M. In vitro efficacy of XP-endo Finisher with 2 different protocols on biofilm removal from apical root canals. **J End.**, v.43, n2, p.321-325, 2017.

BARBIZAM, J. V. B.; FARINIUK, L. F.; MARCHESAN, M. A.; PECORA, J. D.; SOUSA-NETO, M. D. 2002; Effectiveness of manual and rotary instrumentation

techniques for cleaning flattened root canals. **J Endod.**, v.28, n.5, p.356-366, 2002.

BASRANI, B.; MALKHASSIAN, G. Update of endodontic irrigating solutions. In: Basrani B (ed) Endodontic irrigation: chemical disinfection of the root canal system. **Spr Int Pub.**, v.12, p 98–115, 2015.

BENETTI, C.V.; PANHO, N.; RAFAGNIN, G.D.; Strategies to optimize the removal of smear layer from the root canal system. **Braz. Dent. J.** v.75, n.13, p.1-7, 2018.

BHUVA, B.; PATEL, S.; WILSON, R.; NIAZI, S.; BEIGHTON, D.; MANNOCCI, F. The effectiveness of passive ultrasonic irrigation on intraradicular *Enterococcus faecalis* biofilms in extracted single-rooted human teeth. **J Endod.** v. 43, n. 3, p. 241-50, 2010.

BOUSSIUKIS, C.; PSIMMA, Z. E.; KASTRINAKIS, E. The effect of flow rate and agitation technique on irrigant extrusion ex vivo. **Int. Endod. J.**, v.47, n.5, p.487–496, 2014.

BOUSKIOUKIS, C.; VAN DER SLUIS, I.W.M. Syringe irrigation: Blending endodontics and fluid dynamics. In: BASRANI, B. **Endodontic irrigation**. Toronto: Springer International Publishing, 2015. p. 45-64.

BRENNER, M. P.; HILGENFELDT, S.; LOHSE, D. Single bubble sonoluminescence. **Modern Physics**, v.74, p.425 – 484, 2002.

BRITTAN, J. L.; SPRAGUE, S. V.; MACDONALD, E. L.; LOVE, R. M.; JENKINSON, H. F.; WEST, N. X.; In vivo model for microbial invasion of tooth root dentinal tubules. **J Appl Oral Sci.**, v. 24, n. 2, p. 126 – 35, 2016.

BULACIO, M. L. Á.; GALVÁN, L. R.; GAUDIOSO, C.; CANGEMI, R.; ERIMBAUE, M. I. *Enterococcus faecalis* biofilm. Formation And development in vitro observed by scanning electron microscopy. **Acta Odontol Latinoam.**, v.28, n.3, p.210-214, 2015.

BUTCHER, S.; MANSOUR, A.; IBRAHIM, M. Influence of apical penetration size on edective conventional irrigation in the apical third: A scanning electron microscopic study. **Eur Endod J.**, v.4, n.1, p.9-14, 2019.

CACHOVAN, G.; SCHIFFNER, U.; ALTENHOF, S.; GUENTSCH, A.; PFISTER, W.; EICK, S. Comparative Antibacterial Efficacies of Hydrodynamic and Ultrasonic Irrigation Systems In Vitro. **J. Endod.** v.39, n.9, p. 1171-1175, 2013.

CAMARGO, C. H.; SIVIERO, M.; CAMARGO, S.E.; DE OLIVEIRA, S.H.; CARVALHO, C.A.; VALERA, M.C. Topographical, diametral, and quantitative analysis of dentin tubules in the root canals of human and bovine teeth. **J Endod.**.33, n. 4, p. 422-6, 2007.

CAMARGO, M. A.; MARQUES, M. M.; CARA, A. A. Morphological analysis of human and bovine dentine by scanning electron microscope investigation. **Rev Archives of oral biology.**, v.53, n.1, p.105–108, 2008.

CAMERON, J. A. The synergistic relationship between ultrasound and sodium hypochlorite: a scanning electron microscope evaluation. **J Endod.**, v.13, n.11, p.541-545, 1987.

CAPELLI, A.; CAMARGO, J. M. P. Microsonics. In: Endodontia clínica: à luz da microscopia operatória. Nova Odessa: **Napoleão**, 2016. p. 396-424.

CARPIO-PEROCHENA, A. E.; BRAMANTE, C. M.; DUARTE, M. A. H.; GRAEFF, M. S.; BERNARDINELLI, N.; ANDRADE, F. B.; ORDINOLA-ZAPATA, R. Biofilm Dissolution and Cleaning Ability of Different Irrigant Solutions on Intraorally Infected Dentin. **J Endod.**, v.37, n.8, p. 1134-1138, 2011.

CARVALHO, M. C.; ZUOLO, M. L.; ARRUDA-VASCONCELOS, R.; MARINHO, A. C. S.; LOUZADA, L. M.; FRANCISCO, P. A.; PECORARI, V. G. A.; GOMES, B. P. F. A. Effectiveness of XP-Endo Finisher in the reduction of bacterial load in oval-shaped root canals. **Braz Oral Res.**, v.31, n.21, p.1-8, 2019.

CASTANHO, G. M.; MARQUES, M. M.; MARQUES, J. B.; CAMARGO, A. A.; DE-CARA, A. A. Micromorphological and hardness analyses of human and bovine sclerotic dentin: a comparative study. **Braz Oral Res.** v.25, n.3, p.274-279, 2011.

CHEUNG, G. Instrument fracture: mechanisms, removal of fragments, and clinical outcomes. **Endod Top.** v. 16, p- 1-26.

COSTERTON, J. W.; CHENG, K. J.; GEESEY, G. G.; LADD, T. I.; NICKEL, J. C.; DASGUPTA, M. Bacterial biofilms in nature and disease. **Annu Rev Microbiol.**, v. 41, p. 435-464, 1987.

COSTERTON, J. W.; LEWANDOWSKI, Z.; DE BEER, D.; CALDWELL, D.; KORBER, D.; JAMES, G. Biofilms, the customized microniche. **J Bacteriol.**, v. 176, n. 8, p. 2137- 2142, 1994.

DE ALMEIDA, A. P.; SOUZA, M. A.; MIYAGAKI, D. C.; DAL BELLO, Y.; CECCHIN, D.; FARINA, A. P. Comparativa evaluation of calcium hypochlorite and sodium hypochlorite associated with passive ultrasonic irrigation on antimicrobial activity of a root canal system infected with *Enterococcus faecalis*: an in vitro study. **J Endod.**, v.40, n.12, p.1953-1957, 2014.

DE GREGORIO, C.; ESTEVEZ, R.; CISNEROS, R.; PARANJPE, A.; COHENCA, N. Efficacy of different irrigation and activation systems on the penetration of sodium hypochlorite into simulated lateral canals and up to working length: an in vitro study. **J Endod.**, v.36, n.1, p.1216–1221, 2010.

DE-DEUS, G.; BELLADONA, F. G.; ZUOLO, A. S.; CARVALHAL, J. C. A.; SIMÕES-CARVALHO, M.; SOUZA, E. M.; LOPES, R. T.; SILVA, E. J. N. L. XP-

endo Finisher R instrument optimizes the removal of root filling remnants in oval-shaped canals. **Int Endod J.**, v.52, n.6, p.899-907, 2019a.

DE-DEUS, G.; BELLADONA, F. G.; ZUOLO, A. S.; PEREZ, R.; CARVALHO, M. S.; SOUZA, E. M.; LOPES, R. T.; SILVA, E. J. N. L. Micro-CT comparison of XP-endo Finisher and passive ultrasonic irrigation as final irrigation protocols on the removal of accumulated hard-tissue debris from oval shaped-canals. *Clin Oral Investig.*, v.23, n.7, v.3087-3093, 2019b

DE-DEUS, G.; SIMÕES-CARVALHO, M.; BELLADONA, F. G.; VERSIANI, M. A.; SILVA, E. J. N. L.; CAVALCANTE, D. M.; SOUZA, E. M.; JOHNSEN, G. F.; HAUGEN, H. J.; PACIORNIK, S. Creation of well-balanced experimental groups for comparative endodontic laboratory studies: a new proposal based on micro-CT and silicio methodes. **Int Endod J.**, v.53, n.7, p.974-985, 2020.

DEL CARPIO-PEROCHENA, A. E.; BRAMANTE, C. M.; DUARTE, M. A. H.; CAVENAGO, B. C.; VILLAS-BOAS, M. H.; GRAEFF, M. S.; BERNARDINELI, N.; ANDRADE, G. B.; ORDINOLA-ZAPATA, R. Biofilm dissolution and cleaning ability of different irrigant solutions on intraorally infected dentin. **J Endod.**, v.37, n.8, v.1134-1138, 2011.

DESAI, P.; HIMEL, V. Comparative safety of various intracanal irrigation systems. **J Endod.**, v.35, n.1, p.545-549, 2009.

DISTEL, J.W.; HATTON, J. F.; GILLESPIE, M. J. Biofilm formation in medicated rootcanals. **J. Endod.** v.28, n.10, p.689-693, 2002.

DUARTE, A.S.R. **Técnicas e soluções para remoção da Smear Layer**. 2015. 71p. Dissertação (Mestrado em Medicina Dentária). Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto.

EGGMANN, F.; VOKAC, Y.; EICK, S.; NEUHAUS, K. W. Sonic irrigant activation for root canal disinfection: power modes matter. **BMC Oral Health.**, v.20, n.1, p.102, 2020.

ELNAGHY, A. M.; MANDORAH, A.; ELSAKA, S. E. Effectiveness of XP-endo Finisher, EndoActivator, and file agitation on debris and smear layer removal in curved root canals: a comparative study. *Odontology*. V.105, n.2, p.178-183, 2017.

EVANS, M.; DAVIES, J. K.; SUNDQVIST, G.; e FIGDOR, D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. **Int. Endod. J.** v.35, p.221-228, 2002.

FERRARI, P.H.P; BOMBANA, A.C. A infecção endodôntica e sua resolução. 1. Ed. São Paulo: **Santos**, 2010, 384p.

FIGDOR, D.; DAVIES, J. K.; SUNDQVIST, G. Starvation survival, growth and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum. **Oral Microbiol Immunol.**, v.18, n.4, p.234-9, 2003.

GABARDO, M.C.L.; DUFLOTH, F.; SARTORETTO, J.; HIRAI, V.; OLIVEIRA, D.C.; ROSA, E.A.R. Microbiologia do insucesso do tratamento endodôntico. **Rev. G&S.** v.1, n.1, p. 11-17, 2009.

GAGLIARDI, J.; VERSIANI, M. A.; DE SOUSA-NETO, M. D.; PLAZAS-GARZON, A.; BASRANI, B. Evaluation of the shaping characteristics of ProTaper Gold, ProTaper NEXT, and ProTaper Universal in curved canals. **J Endod.** v.41; n.10, p.1718-1724, 2015.

GOKTURK, H.; OZKOCAK, I.; BUYUKGEBIZ, F.; DEMIR, O. Effectiveness of various irrigation protocols for the removal of calcium hydroxide from artificial standardized grooves. **J Appl Oral Sci.**, v.25, n.3, p.290-298, 2017.

GOMES, B. P. F. A.; VIANNA, M. E.; ZAIA, A. A.; ALMEIDA, J. F. A.; SOUZA-FILHO, F. J.; FERRAZ, C. C. R. Chlorhexidine in Endodontics. **Braz. Dent. J.** v.24, n.2, p.89-102, 2013.

GOMES, B. P.; PINHEIRO, E. T.; GADÊ-NETO, C. R.; SOUSA, E. L.; FERRAZ, C. C.; ZAIA, A. A.; TEIXEIRA, F. B.; SOUZA-FILHO, F. J. Exame microbiológico de canais radiculares dentários infectados. **Oral Microbiol Immunol.** v.19 n.2, p.71-76, 2004.

GOMES, B. P.; PINHEIRO, E.T.; JACINTO, R. C.; ZAIA, A. A.; FERRAZ, C. C.; SOUZA-FILHO, F. J. Microbial analysis of canals of root-filled teeth with periapical lesions using polymerase chain reaction. **J Endod.** v.34, n.5, p.537-540, 2008.

GRÜNDLING, G. L.; ZECHIN, J. G.; JARDIM, W. M.; DE OLIVEIRA, S. D.; DE FIGUEIREDO, J. A. Effect of ultrasonics on *Enterococcus faecalis* biofilm in a bovine tooth model. **J Endod.** v.37, n.8, p.1128-1233, 2011.

GU, L. S.; KIM, J.R.; LING, J.; CHOI, K. K. PASHLEY, D. H.; TAY, F. R. Review of contemporary irrigant agitation techniques and devices. **J Endod.** v.35, p.791–804, 2009.

HAAPASALO, M.; SHEN, Y.; WANG, Z; GAO, Y. Irrigation in endodontics. **Br Dent J.** v.216, n.6, p.299-303, 2014.

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

HARRISON, A. J.; CHIVATXARANUKUL, P.; PARASHOS, P.; MESSER, H. H. The effect of ultrasonically activated irrigation on reduction of *Enterococcus faecalis* in experimentally infected root canals. **Int Endod J.** v.43, p.968–977, 2010.

HIDALGO, E.; BARTOLOME, R.; DOMINGUEZ, C. Cytotoxicity mechanisms of sodium hypochlorite in cultured human dermal fibroblasts and its bactericidal effectiveness. **Chem-Bio Int.**, v.139, n.3, p.265–282, 2002.

HÜBSCHER, W.; BARBAKOW, F.; PETERS, O. A. Root-canal preparation with FlexMaster: canal shapes analysed by micro-computed tomography. **Int Endod J.** v.36, n.11, p.740-747, 2003.

HUFFAKER, S. K.; SAFAVI, K.; SPANGBERG, L. S.; KAUFMAN, B. Influence of a passive sonic irrigation system on the elimination of bacteria from root canal systems: a clinical study. **J Endod.**, v.36, p.1315–1318, 2010.

HUQUE, J.; KOTA, K.; YAMAGA, M.; IWAKU, M.; HOSHINO, E. Bacterial eradication from root dentine by ultrasonic irrigation with sodium hypochlorite. **Int Endod J.** v.31, n.4, p. 242-250, 1998.

JHAIHARIA, K.; PAROLIA, A.; SHETTY, K. V.; MEHTA, L. K. Biofilm in endodontics: A review. **J Int Soc Prev Community Dent.**, v.5, n.1, p.1-12, 2015.

JIANG, L. M.; VERHAAGEN, B.; VERSLUIS, M.; LANGEDIK, J.; WESSELINK, P.; VAN DER SLUIS, L. The influence of the ultrasonic intensity on the cleaning efficacy of passive ultrasonic irrigation. **J. Endod.**, v.37, p.688–692, 2011.

KESKIN, C.; SARIYILMAZ, E.; SARIYILMAZ, E. O. Efficacy of XP-Endo Finisher file in removing calcium hydroxide from simulated internal resorption cavity. **J Endod.**, v.43, n.1, p. 126-130, 2017.

LEE, S.; WU, M.; WESSELINK, P. The effectiveness of syringe irrigation and ultrasonics to remove debris from simulated irregularities within prepared root canal walls. **Int Endod J.** v.37, n.10, p. 672-678, 2004.

LEIGHTON, T. G. The Acoustic Bubble. **Academic Press.** v.272, p.407-409, 1994.

LEONI, G. B.; VERSIANI, M. A.; SILVA-SOUSA, Y. T.; BRUNIERA, J. F. B.; PÉCORA, J.D.; SOUSA-NETO, M. D. Ex vivo evaluation of four final irrigation protocols on the removal of hard-tissue debris from the mesial root canal system of mandibular first molars. **Int. Endod. J.**, v.50, n.4, p.398-406, 2017.

LI, Q.; ZHANG, Q.; ZOU, X.; YUE, L. Evaluation of four final irrigation protocols for cleaning root canal walls. **Int J Oral Sci.**, v.12, n.29, p.1-6, 2020.

LLEÒ, M. M.; BONATO, B.; TAFI, M. C.; SIGNORETTO, C.; BOARETTI, M.; CANEPARI, P. Resuscitation rate in different enterococcal species in the viable but non-culturable state. **J Appl Microbiol.** v.91, n.6, p.1095-1102, 2001.

LOPES, H.P.; SIQUEIRA JUNIOR, J.F. **Endodontia- Biologia e técnica.** 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015. 848p.

LOPES, R. M.; MARINS, F. C.; BELLADONNA, F. G.; SOUZA, E. M.; DE-DEUS, G.; LOPES, R. T.; LEAL-SILVA, E. J. N. Untouched canal areas and

debris accumulation after root canal preparation with rotary and adaptive systems. **Aust Endod J.** 2017.

MACEDO, R.; VERHAAGEN, B.; RIVAS, D. F.; VERSLUIS, M.; WESSELINK, P.; VAN DER SLUIS, L. Cavitation measurement during sonic and ultrasonic activated irrigation. **J. Endod.**, v.40, n.1, p.580–583, 2014.

MADARATI, A. A.; QUALTROUGH, A.J.; WATTS, D. C. Factors affecting temperature rise on the external root surface during ultrasonic retrieval of intracanal separated files. **J Endod.**, v.34, n.9, p.1980-1092, 2008.

MICHELLOTO, A. D.; BLIZKOW, G. S.; BATISTA, A.; SILVA-JUNIOR, J. A. Avaliação da temperatura na superfície externa radicular quando da utilização de três sistemas obturadores com guta-percha termoplastificada. **J. B. E.** v. 5, n. 17, p.99-107, 2004.

MOHAMMAD, Z.; SOLTANI, M. K.; SHALAV, S. An update on the management of endodontic biofilms using root canal irrigants and medicaments. **Iran Endod J.** v.9, n.1, p.89–97, 2014.

MOHMMED, S.A.; VIANNA, M.E.; PENNY, M.R.; HILTON, S.T.; MORDAN, N.; KNOWLES, J.C. A novel experimental approach to investigate the effect of different agitation methods using sodium hypochlorite as an irrigant on the rate of bacterial biofilm removal from the wall of a simulated root canal model. **Dent. Mater.**, v.32, n.10, p.1289-1300, 2016.

MOLANDER, A., DAHLÉN, G. Evaluation of the antibacterial potencial of tetracycline or erythromycin mixed with calcium hydroxide as intracanal dressing against *Enterococcus faecalis* in vivo. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v.96, n.6, p.744-50, 2003.

MOORER, W. R.; WESSELINK, P. R. Factors promoting the tissue dissolving capability of sodium hypochlorite. **Int Endod J.** v.15, p.187–196, 1982.

MORAGO, A.; RUIZ-LINARES, M.; FERRER-LUQUE, C. M.; BACA, P.; RODRÍGUEZ-ARCHILLA, A.; ARIAS-MOLIZ, M. T. Dentine tubule disinfection by different irrigation protocols. **Micr Res Tech.**, v.82, p.558-563, 2019.

MOREIRA, R. N.; PINTOB, E. B.; GALOA, R.; FALCIA, S. G. M.; MESQUITA, A. T. Passive ultrasonic irrigation in root canal: systematic review and meta-analysis. **Acta Odont Scand.** v.77, n.1, p.55-60, 2019.

MURAD, C. F.; SASSONE, L. M.; SOUZA, M. C.; FIDEL, R. A. S.; FIDEL, S. R.; HIRATA-JUNIOR, R. Antimicrobial activity of sodium hypochlorite, chlorhexidine and MTAD® against *Enterococcus faecalis* biofilm on human dentin matrix in vitro. **RSBO.**, v.9, n.2, p.143-150, 2012.

MUWAQUET-RODRÍGUEZ, S.; ALBERTO-MONTEAGUDO, A. Update of the therapeutic planning of irrigation and intracanal medication in root canal treatment. A literature review. **J Clin Exp Dent.** v.11, n.2, p.185-193, 2019b.

NACIF, M.C.A.M.; ALVES, F.R.F.; Enterococcus faecalis na Endodontia: um desafio ao sucesso. **Rev. Bras. Odontol.**, v.67, n.2, p.209-14, 2010.

NAIR, P. N.; HENRY, S.; CANO, V.; VERA, J. Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after “onevisit” endodontic treatment. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** v.99, n.2, p.231-52, 2005.

NANGIA, D.; NAWAL, R. R.; YADAV, S.; TALWAR, S. Influence of final apical width on Smear Layer removal efficacy of XP Endo Finisher and Endodontic Needle: An *Ex Vivo* study. **Eur Endod J.**, v.5, n.1, p.18-22, 2020.

NARAYANAN, L. L.; VAISHNAVI, C. Endodontic microbiology. **J Conserv Dent.** v.13, n.1, p.233-239, 2010.

ORDINOLA-ZAPATA, R.; BRAMANTE, C. M.; APRECIO, R. M.; HANDYSIDES, R.; JARAMILLO, D. E. Biofilm removal by 6% sodium hypochlorite activated by different irrigation techniques. **Int Endod J.** v.47, n.7, p.659-666, 2014.

OZOZCO, E.; TOIA, C.; CAVALLI, D.; KHOURY, R.; CARDOSO, F.; BRESCIANI, E.; VALERA, M. Effect of passive ultrasonic activation on microorganisms in primary root canal infection: A randomized clinical trial. **J Appl Oral Sci.**, v.28, 2020.

PACHECO-YANES, J.; PROVENZANO, J. C.; MARCELIANO-ALVES, M. F.; GAZZANEO, I.; PÉREZ, A. R.; GONÇALVES, L. S.; SIQUEIRA, J. F. Distribution of sodium hypochlorite throughout the mesial root canal system of mandibular molars after adjunctive irrigant activation procedures: a micro-computed tomographic study. **Clin Oral Investig.**, v. 24, n.2, p.907-914, 2020.

PAQUÉ, F.; BOESSLER, C.; ZEHNDER, M. Accumulated hard tissue debris levels in mesial roots of mandibular molars after sequential irrigation steps. **Int Endod J.**, v.44, n.2, p.148 – 153, 2011.

PARAGLIOLA, R.; FRANCO, V.; FABIANI, C.; MAZZONI, A.; NATO, F.; TAY, F. R. Final rinse optimization: influence of different agitation protocols. **J Endod.** ;36, p.282–285, 2010.

PÉCORA, J. D.; ESTRELA, C.; BUENO, M. R.; PORTO, O. C.; ALENCAR, A. H.; SOUSA-NETO, M. D.; ESTRELA, C. R. Detection of root canal isthmus in molars by map-reading dynamic using CBCT images. **Braz Dent J.**, v.24, n.6, p.569-574, 2013.

PEREIRA, T. C.; DIJKSTRA, R. J. B.; PETRIDIS, X.; SHARMA, P.; VAN DE MEER, W. J.; VAN DER SLUIS, L. W. M.; DE ANDRADE, F. B. Chemical and mechanical influence of root canal irrigation on biofilm removal from lateral morphological features of simulated root canals, dentine disks and dentinal tubules. **Int. Endod. J.**, v.54, n.1, p.112-119, 2021.

PÉREZ, A. R.; RICUCCI, D.; VIEIRA, G. C. S.; PROVENZANO, J. C.; ALVES, F. R. F.; MARCELIANO-ALVES, M. F.; ROÇAS, I. N.; SIQUEIRA, JR. J. F. Cleaning, Shaping, and Disinfecting Abilities of 2 Instrument Systems as Evaluated by a Correlative Micro-computed Tomographic and Histobacteriologic Approach. **J Endod**, v.46, n.6, p.846-857, 2021.

PETRIDIS, X.; BUSANELLO, F. H.; SO, M. V. R.; DIJKSTRA, R. J. B.; SHARMA, P. K.; VAN DER SLUIS, L. W. M. Factors affecting the chemical efficacy of 2% sodium hypochlorite against oral steady-state dual-species biofilms: Exposure time and volume application. **Int. Endod. J.** v.52, n.8, p.1182-1195, 2019.

PLOTINO, G.; GRANDE, N. M.; MERCADE, M.; CORTESE, T.; STAFFOLI, S.; GAMBARINI, G.; TESTARELLI, L. Efficacy os sonic and ultrasonic irrigation devices in the removal of debris from canal irregularities in artificial root canals. **J Appl Oral Sci.**, 2019.

PRADA, I.; MICÓ-MUÑOZ, P.; GINER-LLUESMA, T.; MICÓ-MARTÍNEZ, P.; COLLADO-CASTELLANO, N.; MANZANO-SAIZ, A. Influence of microbiology on endodontic failure. Literature review. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal.** v.24, n.3, p.364-372, 2019a.

PRADA, I.; MICÓ-MUÑOZ, P.; GINER-LLUESMA, T.; MICÓ-MARTÍNEZ, P.; MUWAQUET-RODRÍGUEZ, S.; ALBERTO-MONTEAGUDO, A. Update of the therapeutic planning of irrigation and intracanal medication in root canal treatment. A literature review. **J Clin Exp Dent.** v.11, n.2, p.185-193, 2019b.

REYES-CARMONA, J. F.; FELIPPE, M. S.; FELIPPE, W. T. A phosphate-buffered saline intracanal dressing improves the biomineralization ability of mineral trioxide aggregate apical plugs. **J Endod.**, v.36, n.10, p.1648-1652, 2010.

RICUCCI, D.; CANDEIRO, G. T.; BUGEIA, C.; SIQUEIRA JUNIOR, J. F. Complex apical intraradicular infection and extraradicular mineralized biofilms as the cause of wet canals and treatment failure: Report 2 cases. **J. Endod.**, v. 42, n. 3, p. 509-515, 2016.

RICUCCI, D.; SIQUEIRA, J. F. JR. BATE, A. L.; PITT-FORD, T. R. Histologic investigation of root canal-treated teeth with apical periodontitis: a retrospective study from twenty-four patients. **J Endod.** v.35, n.4, p.493-502, 2009.

RÔÇAS, I. N.; SIQUEIRA JR., J. F.; SANTOS, K. F. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. **J Endod.** v. 30, p. 315-20, 2004.

RODIG, T.; SEDGHI, M.; KONIETSCHKE, F.; LANGE, K.; ZIEBOLZ, D.; HULSMANN, M. Efficacy os syringe irrigation, RinsEndo and passive ultrasonic irrigation in removing debris from irregularities in root canals with different apical sizes. **Int Endod J.**, v.43, n.7, p.581-589, 2010.

ROLDI, A.; INTRA, J. B. G.; BARROSO, J. M.; INTRA, T. J. S. A.; MARTINS, L. O. Avaliação da variação da temperatura na superfície radicular externa durante a obturação pela técnica McSpadden. **Rev. Odontol. Bras.** V. 18, n. 48, p. 34-37, 2010.

ROMUALDO, P.C. Sistemas de irrigação de canais radiculares: Avaliação radiográfica, histopatológica, histomicrobiológica e histo enzimológica em dentes de cães com lesão periapical. 2013. 97p. (Mestrado em odontopediatria). Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

ROSSI-FEDELE, G.; DE-FIGUEIREDO, J. A. Use of a bottle warmer to increase 4% sodium hypochlorite tissue dissolution ability on bovine pulp. **Aust Endod J.**, v.34, p.39-42, 2008.

SAKKO, M.; TIADERHANE, L.; RAUTEMAA-RICHARDSON, R. Microbiology on root canal infections. **Prim Dent J.**, v.5, n.2, p.85-89, 2016.

SAUNDERS, E. M.; SAUNDERS, W. The heat generated on the external root surface during post space preparation. **Int. Endod. J.** v. 22, n. 14, p. 169-173, 1989.

SCHILDER, H. Cleaning and shaping the root canal. **Dent Clin North Am.** v.18, n.2, p.269-96, 1974.

SHEN, Y.; STOJICIC, S.; HAAPALASO, M. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine against bacteria in biofilms at different stages of development. **J. Endod.** v. 37, n. 5, p. 657-661, 2011.

SHRESTHA, A.; MESSER, H. H.; ASUNDI, A. KISHEN, A. Effect of hydration on the strain gradients in dental hard tissues after heat and cold application. **J Endod.**, v.36, n.10, p.1643-1647, 2010.

SILVA, E. J. N. L.; BELLADONNA, F. G.; ZUOLO, A. S.; RODRIGUES, E.; EHRHARDT, I. C.; SOUZA, E. M.; DE-DEUS, G. Effectiveness of XP-endo Finisher and XP-Endo Finisher R in removing root filling remnants: a micro-CT study. **Int Endod J.**; v.51, n.1, p.86-91, 2018.

SIQUEIRA JF JR., DE UZEDA M. Intracanal medicaments: Evaluation of the antibacterial effects of chlorhexidine, metronidazole, and calcium hydroxide associated with three vehicles. **J Endod.** v.23, p.167-9, 1997.

SIQUEIRA JR J. F.; ROÇAS, I. N. Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. **J Endod.** n. 34, p. 1291–301, 2008.

SIQUEIRA JUNIOR, J. F.; ALVES, F. R. R.; VERSIANI, M. A.; RÔÇAS, I. N.; ALMEIDA, B. M. A.; NEVES, M. A. S.; SOUSA-NETO, M. D. Correlative Bacteriologic and Micro-Computed Tomographic Analysis of Mandibular Molar Mesial Canals Prepared by Self-Adjusting File, Reciproc, and File Systems. **J. Endod.**, v. 39, n. 8, p. 1044-50, 2013.

SIQUEIRA JUNIOR, J. F.; RÔÇAS, I. N.; MARCELIANO-ALVES M. F.; PÉREZ, A. R.; RICUCCI, D. Unprepared root canal surfasse áreas: causes, clinical implications, and therapeutic strategies. **Braz. Oral. Res.**, v. 32, n. 65, p. 2-19, 2018.

SIQUEIRA JUNIOR, J. F.; UZEDA, M.; FONSECA, M. E. F. A scanning eléctron microscopic evaluation of in vitro dentinal tubules penetration by selected anaerobic bactéria. **J. Endod.** v. 22, n. 6, 1996.

SIQUEIRA JUNIOR, J.F.; RÔÇAS, I.N. Bacterial pathogenesis and mediators in apical periodontitis. **Braz. Dent. J.** v. 18, p.267-80, 2007.

SIQUEIRA, J. F. JR.; RÔÇAS, I. N. Optimising single-visit disinfection with supplementary approaches: a quest for predictability. **Aust Endod J.**, v.37, p.92–98, 2011.

SIRTES, G.; WALTIMO, T.; SCHAETZLE, M.; ZEHNDER, M. The effects of temperature on sodium hypochlorite short-term stability, pulp dissolution capacity, and antimicrobial efficacy. **J Endod.**, v.31, n.669-671, 2005.

SOUSA NETO, M.D.; SILVA-SOUSA, Y.C.; MAZZI-CHAVES, J.F.; CARVALHO, K.K.T.; BARBOSA, A.F.S.; VERSIANI, M.A.; JACOBS, R.; LEONI, G.B. Root canal preparation using micro-computed tomography analysis: a literature review. **Braz. Oral Res.** v. 32, n. 66, p. 20-43, 2018.

SOUZA, L. C.; BRITO, P. R.; DE OLIVEIRA, J. C.; ALVES, F. R.; MOREIRA, E. J.; SAMPAIO-FILHO, H. R.; ROCAS, I. N.; SIQUEIRA, J. F. Photodynamic therapy with two different photosensitizers as a supplement to instrumentation/irrigation procedures in promoting intracanal reduction of enterococcus faecalis. **J Endod.**, v.36, n.2, p.292-296, 2010.

STOJICIC, S.; ZIVKOVIC, S.; QIAN, W.; ZHANG, H.; HAAPASALO, M. Tissue Dissolution by Sodium Hypochlorite: Effect of Concentration, Temperature, Agitation, and Surfactant. **J Endod.**, v.36, n.9, p.1558–1562, 2010.

STRINGHETA, C. P.; BUENO, C. E. S.; KATO, A. S.; FREIRE, L. G.; IGLECIAS, E. F.; SANTOS, M.; PELEGRINE, R. A. Micro-computed tomographic evaluation of the shaping ability of four instrumentation systems in curved root canals. **Int. Endod. J.** v. 52, n. 6, p. 908-916, 2019.

STUART, C. H.; SCHWARTZ, S. A.; BEESON, T. J.; OWATZ, C. B. Enterococcus faecalis: Its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. **J Endod.** v.32, n.2, p.93-8, 2006.

SUSILA, A.; MINU, J. Activated Irrigation vs. Conventional non-activated Irrigation in Endodontics – A Systematic Review. **Eur Endod J.**, v.3, p.96-110, 2019.

SVENSÄTER, G.; BERGENHOLTS, G.; Biofilms in endodontic infections. **Endod. Top.** v. 9, p. 27-36, 2004.

SWIMBERGHE, R. C. D.; COENYE, T.; DE MOOR, R. J. G.; MEIRE, M. A. Biofilm model systems for root canal disinfection: a literature review. **Int Endod J.** v.52, n.5, p.604-628, 2019.

TABASSUM, S.; KHAN, F. R. Failure of endodontic treatment: The usual suspects. **Eur J Dent.** v.10, p.144-147, 2016.

TAVELLA E SILVA, N. C.; GIBIN, J. T.; RIVERA, I. C. M. M.; RACHED JUNIOR, F. J. A.; LEONI, G. B.; RAUCCI-NETO, W. Calcium hydroxide paste removal strategies and bond strengths of epoxy – and silicate-based sealers. **Aust Endod J.**, v.47, n.2, p.236-244, 2021.

TIANFENG, D. U.; ZHEJUN WANG.; YA SHEN.; JINGZHI, M. A.; YINGGUANG C. A. O.; MARKUS HAAPASALO. Effect of Long-term Exposure to Endodontic Disinfecting Solutions on Young and Old *Enterococcus faecalis*. **J Endod.**, v. 40, n. 4, p. 509-514, 2014.

TOWNSEND, C.; MAKI, J. An in vitro comparison of new irrigation and agitation techniques to ultrasonic agitation in removing bacteria from a simulated root canal. **J Endod.** v.35, n.7, p.1040-1043, 2009.

TURKAYDIN, D.; DEMIR, E.; BASTURK, F. B.; SAZAK-ÖVECOGLU, H. Efficacy of XP-Endo Finisher in the removal of triple antibiotic paste from immature root canals. **J Endod.** 2017 Sep;43(9):1528-31.

VAN DER LUIS, L. W.; VERSLUIS, M.; WU, M. K.; WESSELINK, P. R. Passive ultrasonic irrigation of the root canal: a review of the literature. **Int Endod J.** v. 40, n. 6, p.415-426, 2007.

VAN DER SLUIS, L. W. Endodontics in motion: new concepts, materials, and techniques. The role of irrigants during root canal treatment. **Ned Tijdschr Tandheelkd.**, v.122, n.10, p.533-538, 2015.

VAN DER SLUIS, L. W. M.; WU, M. K.; WESSELINK, P. R. A comparison between a smooth wire and a K file in the removal of artificially placed dentine debris in plastic blocks. **Int Endod J.**, v.38, p.593–596, 2005a.

VAN DER SLUIS, L. W. M.; WU, M. K.; WESSELINK, P. R. The efficacy of ultrasonic irrigation to remove artificially placed dentine debris from human root canals prepared using instruments of varying taper. **Int Endod J.**, v.38, p.764–768, 2005b.

VAN DER SLUIS, L. W.; GAMBARINI, G.; WU, M. K.; WESSELINK, P. R. The influence of volume, type of irrigant and flushing method on removing artificially placed dentine debris from the apical root canal during passive ultrasonic irrigation. **Int Endod J.**, n. 39, p. 472–6, 2006.

VANSAN, L. P.; PÉCORÁ, J. D.; COSTA, W. F.; MAIA CAMPOS, G. Effects of various irrigating solutions on the cleaning of the root canal with ultrasonic instrumentation. **Braz. Dent. J.** v. 1, n. 1, p. 37-44, 1990.

VARELA, P.; SOUZA, E.; DE-DEUS, G.; DURAN-SINDREU, F.; MERCADÉ, M. Effectiveness of complementary irrigation routines in debriding pulp tissue from root canals instrumented with a single reciprocating file. **Int. Endod. J.** v., n., p., 2018.

VAZ-GARCIA, E. S.; VIEIRA, V. T. L.; PETITET, N. P. D. F.; MOREIRA, E. J. L.; LOPES, H. P.; ELIAS, C. N.; LEAL-SILVA, E. J. N.; ANTUNES, H. S. Mechanical Properties of Anatomic Finishing Files: XP-Endo Finisher and XP-Clean. **Braz Dent J.**, v.29, n.2, p.208-213, 2018.

VERSIANI, M.A.; LEONI, G.B.; STEIER, L.; DE-DEUS, G.; TASSANI, S.; PÉCORÀ, J.D.; SOUSA-NETO, M.D. Micro-computed Tomography Study of Oval-shaped Canals Prepared with the Self-adjusting File, Reciproc, WaveOne, and ProTaper Universal Systems. **J. Endod.** v. 39, n.8, p.1060-1066, 2013.

WANG Z.; SHEN Y.; HAAPASALO M. Effect of smear layer against disinfection protocols on *Enterococcus faecalis*-infected dentin. **J. Endod.** v. 39, n. 11, p. 1395- 1400, 2013.

WELLER, R. N.; BRADY, J. M.; BERNIER, W. E. Efficacy of ultrasonic cleaning. **J Endod.**, v. 6, n. 9, p. 740 – 743, 1980.

WILLIAMSON, A. E.; CARDON, J. W.; DRAKE, D. R. Antimicrobial susceptibility of monoculture biofilms of a clinical isolate of *Enterococcus faecalis*. **J. Endod.** v. 35, n. 1, p. 95-97, 2009.

WU, M. K.; DUMMER, P. M. H.; WESSELINK, P. R. Consequences of and strategies to deal with residual post-treatment root canal infection. **Int Endod.** v.39: p.343– 356, 2006.

WU, M. K.; WESSELINK, P. P. A primary observation on the preparation and obturation of oval canals. **In Endod J.**, v.34, n.2, p.137-141, 2001.

YARED, G. M.; BOU DAGHER, F. E.; MACHTOU, P. Cyclic fatigue of ProFile rotatory instruments after clinical use. **Int. Endod. J.** v. 33, p. 204-207, 2000.

ZEHNDER M. Root Canal Irrigants. **J Endod.** v.32; p.389–398, 2006.

ZEHNDER, M.; BELIBASAKIS, G. N. On the dynamics of root canal infections – what we understand and what we don't. **Virulence.**, v.6, n.3, p.216-222, 2015.

ZUOLO, M. L.; ZAIA, A. A.; BELLADONA, F. G.; SILVA, E. J. N. L.; SOUZA, E. M.; VERSIANI, M. A.; LOPES, R. T.; DE-DEUS, G. Micro-CT assessment of the shaping ability of four root canal instrumentation systems in oval-shaped canals. **Int Endod J.**, v.51, n.5, p.564-571,2018.