

Márcia Maria Bonetti

**Avaliação histoquímica da  
permeabilidade dentinária, após a  
utilização do EDTA como auxiliar na  
irrigação do canal radicular.**

Uberlândia

2008

Márcia Maria Bonetti

**Avaliação histoquímica da  
permeabilidade dentinária, após a  
utilização do EDTA como auxiliar na  
irrigação do canal radicular.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia, Área de concentração em Reabilitação Oral.

**Orientador:** Prof. Dr. João Carlos Gabrielli Biffi

**Banca Examinadora**

Prof. Dr. João Carlos Gabrielli Biffi

Prof. Prof. Dr. Idomeo Bonetti Filho

Dr Paulo César Azevedo

Uberlândia, 2008

 UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

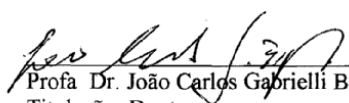
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

AV. Pará, 1720, bloco 2u – sala 2U09 – Campus Umuarama - UBERLÂNDIA -MG – 38400-902  
(0XX) 034 –3218-2550

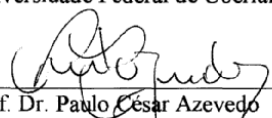
**RELATÓRIO DA COMISSÃO JULGADORA DA PROVA DEFESA DE MESTRADO DA CD Márcia Maria Bonetti DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA DESTA UNIVERSIDADE.**

Às quatorze horas do dia vinte e oito de JULHO do ano de dois mil e oito, reuniu-se a Comissão Julgadora indicada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação desta Faculdade, para o julgamento da Dissertação de Mestrado apresentada pela candidata Márcia Maria Bonetti com o título: Avaliação da permeabilidade dentinária após o uso do EDTA e do hipoclorito de sódio como auxiliares na irrigação do canal radicular. O julgamento do trabalho foi realizado em sessão pública compreendendo a exposição, seguida de arguição pelos examinadores. Encerrada a arguição, cada examinador, em sessão secreta, exarou o seu parecer. A Comissão Julgadora, após análise do Trabalho, verificou que o mesmo encontra-se em condições de ser incorporado ao banco de Dissertações e Teses da Biblioteca desta Universidade. Acompanham este relatório os pareceres individuais dos membros da Comissão Julgadora.

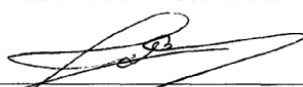
Uberlândia 28 de JULHO de 2008

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. João Carlos Gabrielli Biffi  
Titulação: Doutor  
Universidade Federal de Uberlândia – UFU

  
\_\_\_\_\_  
Aprovado/Reprovado/Conceito

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Paulo César Azevedo  
Titulação: Doutor  
Universidade Federal de Uberlândia – UFU

APROVADO A  
\_\_\_\_\_  
Aprovado/Reprovado/Conceito

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Idomeo Bonetti Filho  
Titulação: Doutor  
Universidade Estadual Paulista - UNESP

Aprovada A  
\_\_\_\_\_  
Aprovado/Reprovado/Conceito

# **Dedicatória**

---

## **À Deus**

*Por me guiar e fortalecer nos momentos difíceis... Por me mostrar que nossos sonhos são possíveis mesmo que os caminhos sejam diferentes daquilo que imaginávamos, por me revelar que apesar de desejarmos trabalhar com perfeição, é no erro que coisas maravilhosas também acontecem, por me fazer sentir como a primavera, que se deixa cortar para voltar inteira.*

*“Possui sabedoria, pois ela é melhor do que o ouro, e adquire a prudência, pois que é mais preciosa que a prata”*

*Provérbios, 16:16*

## **Ao meu filho, Gabriel**

*Por ser meu estímulo a cada dia, por me tornar uma pessoa melhor com a dádiva de ser mãe, por me projetar para o crescimento a fim de que o seu próprio futuro seja minha esperança de vida. Apesar de pequenino, você demonstra uma enorme sabedoria e compreensão ao respeitar e entender minha ausência nos momentos importantes do seu crescimento. Que você possa compreender que tudo por que lutei foi também e, principalmente, por você!!*

## **Ao meu pai, Antonio**

*Pelo esforço desmedido em todos os momentos da minha vida, desde os sonhos infantis aos profissionais. Eu chego a mais uma etapa da minha formação por que o senhor esteve presente me apoiando, incentivando e ajudando de todas as formas possíveis. Agradeço todos os sacrifícios, abdições e carinho em meu nome e em nome do meu filho. Muito obrigada por tudo! Certamente palavras não bastam pelo que fez por mim, mas podem transmitir um pouco da minha gratidão e do meu amor!!*

## **À minha mãe, Maria Abadia**

*Pela simplicidade e perseverança além da incansável confiança depositada em meu trabalho e em meus estudos. Obrigada por acreditar em meus sonhos e abrir mão dos próprios ideais para se dedicar ao meu filho com tanto amor e carinho. Eu a considero verdadeira mestre na arte de cuidar da nossa família e é com muito orgulho que digo que esta conquista é também da senhora. Muito obrigada pelas orações, pela ansiedade compartilhada, por sofrer e rir junto comigo. Saiba que tudo seria mais difícil, não fosse a certeza de saber que a senhora estaria sempre aí a qualquer hora, em qualquer momento.*

## ***Ao meu irmão, Marcel***

*Sua ponderação e retidão de caráter me inspiram e incentivam a todo momento. Obrigada pelo apoio durante todos estes anos, pelo carinho comigo e com o Gabriel, obrigada pela presença da Sabrina, do querido Pedrinho e agora de mais um anjinho, que encantam e enriquecem a nossa família. Que você possa alcançar cada dia mais sucesso e felicidade. Muito obrigada, por tudo!!*

## ***À minha irmã, Iara***

*Pelos momentos que comigo você torceu, chorou, sorriu e até brigou... Por poder contar com sua garra italiana a favor de mim e do Gabriel incondicionalmente, por ter aprendido com você nos pequenos detalhes, por ter sido minha companhia em momentos difíceis onde até mesmo suas broncas eram necessárias e, acredite, seu futuro será tão brilhante quanto o seu coração o é!! Agradeço pelo orgulho que posso sentir por ser sua irmã.*

## ***Ao meu namorado, Geovane***

*Por me mostrar um lado da vida que parecia estar bem aqui, mas de forma inativa... Obrigada por me encantar com sua sensibilidade e simplicidade. A forma como me incentivou e apoiou só revelou a sua própria sabedoria diante das adversidades da vida. Cada crédito de confiança depositado em mim e no meu trabalho se fez imprescindível para que este momento chegasse. Agradeço o carinho e a companhia, sempre!*

## ***A toda minha família:***

*À minha tia Altair e ao tio Urias, obrigada pelos momentos de acolhimento, por fazerem da casa de vocês a minha casa, onde fui recebida como filha tantas vezes! À minha querida avó, Mercedes, obrigada pelas orações, pelo apoio constante em meus estudos, desde os tempos da graduação. A todos os familiares que, com muito carinho, torceram e acompanharam o meu trabalho.*

# ***Agradecimentos***

---

**Ao Professor Dr. João Carlos Gabrielli Biffi**, meu reconhecimento e gratidão pela paciência, compreensão e acolhimento. Aprendi com o senhor mais do que conhecimentos científicos, aprendi a prática da ética, pude ver de perto a sabedoria de saber quando e como agir, principalmente no que diz respeito à arte de ensinar. Certos ensinamentos levamos por toda a vida.

**Ao Prof. Dr. Idomeo Bonetti Filho**, por ter aceitado participar da avaliação deste trabalho. É um enorme prazer poder estar diante de um querido professor que me ensinou os primeiros passos da Endodontia. Obrigada pela presença hoje e pelos ensinamentos do passado.

**Ao Prof. Dr. Carlos José Soares**, pela compreensão desprendida principalmente no final do meu curso. Diante de tantas adversidades, agradeço pelo seu profissionalismo e respeito.

**Ao Prof. Dr. Antonio Durighetto** pelo incentivo desde a época do Procede. Agradeço o carinho com que sempre me ensinou.

**À equipe do PROCEDE, Celinha, Auxiliadora, Keller e Miriam**, pelos momentos de aprendizado, pelo apoio, pela amizade conquistada.

**À Camilla Christian Gomes Moura**, pela colaboração e ensinamentos relacionados à histoquímica.

**Às colegas Natércia, Liliane e Adriana**, por dividirmos as alegrias e tristezas dos trabalhos laboratoriais, por compartilharmos sentimentos tão difíceis em momentos tão delicados.

**À Fernandinha e Carol** pela amizade e alegria da convivência.

**Ao Gustavo Assis**, um querido ouvinte e conselheiro.

**À Gisele**, pelas “viagens” ao frigorífico, por me estender a mão sempre que precisei.

**À Abigail**, nossa querida “**Biga**”, por toda assistência na formatação e normatização deste trabalho, além da sua atenção e de seu carinho sempre requisitados.

**À Eunice**, pelo apoio durante a especialização e o mestrado. Muitas vezes, é de uma forma conturbada que acabamos encontrando grandes amigos.

**Às amigas de infância Guga, Lidiane e Melissa**

“Qualquer indivíduo é capaz de solidarizar-se com o sofrimento de um amigo; solidarizar-se com êxitos alheios já requer uma natureza delicadíssima.” -  
Oscar Wilde

**À amiga Mirna,**

Por me estender a mão em momentos delicados e difíceis, por representar, com seu dinamismo quase altruísta, uma porta sempre aberta ao diálogo e à amizade.

**À Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia**, que se caracteriza pelo incentivo à extensão, ensino e pesquisa. Agradeço a oportunidade de aprimorar meus conhecimentos.

**À FAPEMIG** pelo suporte financeiro para o desenvolvimento deste trabalho.



***"...E eu vos direi: Amai para entendê-las!  
Pois só quem ama pode ter ouvido  
Capaz de ouvir e de entender estrelas."***

**Ora (dizeis) ouvir  
estrelas Olavo  
Bilac**

# SUMÁRIO

---

## LISTAS

I.	FIGURAS	3
II.	TABELAS	4
III.	ABREVIATURAS	5
IV.	NOTAÇÕES	7
	RESUMO	8
	ABSTRACT	9
1.	INTRODUÇÃO	10
2.	REVISÃO DE LITERATURA	13
3.	PROPOSIÇÃO	46
4.	MATERIAL E MÉTODOS	47
5.	RESULTADOS	56
6.	DISCUSSÃO	62
7.	CONCLUSÕES	71
	REFERÊNCIAS	72
	ANEXOS	

# LISTAS DE FIGURAS E SIGLAS

## I. FIGURAS

**Figura 1** –Incisivo inferior bovino, secção apical promovendo um remanescente de 17 mm (A). Raiz seccionada acondicionada em frasco contendo água destilada (B).....48

**Figura 2** – Dente sendo imerso na solução de sulfato de cobre (A). Dente sendo imerso na solução de ácido rubeânico (B). Dentes imersos em ácido rubeânico no interior da câmara de vácuo por 5 minutos (C). Dentes mantidos por mais 25 minutos em contato com o ácido rubeânico (D).....52

**Figura 3** – Vista da máquina Isomet 1000 para corte de tecido duro (A). Dente fixado para o corte (seta fina) e disco (seta grossa) (B). Raiz em posição de corte (C). Secção transversal da raiz (D).....53

**Figura 4** – Esquematização do corte a partir do qual serão obtidas as medidas de pigmentação do corante para vestibular, lingual, mesial e distal.....54

**Figura 5** –Terço cervical (A), Terço médio (B) e Terço apical (C) do caso 35 (grupo controle). Terço cervical (D), terço médio (E) e terço apical (F) do caso 28 (irrigado com Naocl 1% e EDTA).....55

**Figura 6-** Imagem do corte a ser analisado a partir do qual serão obtidas as medidas de pigmentação (P) do corante para vestibular, lingual, mesial e distal, considerando a espessura dentinária (R).....58

## II. TABELAS

**Tabela 1.** ANEXO - Valores (mm), dos níveis de infiltração nas secções representativas dos terços radiculares cervical, médio e apical em quatro medidas por secções, nas faces vestibular (V), lingual (L), mesial (M) e distal (D), dos grupos 1 a 10, após irrigação dos canais radiculares com hipoclorito de sódio a 1% e a 5%, hipoclorito de sódio a 1% e 5% + EDTA e água destilada (grupo controle).....83

**Tabela 2.** Médias das medidas obtidas das áreas pigmentadas dos corpos de prova tratados com NaOCl 1% (G1), NaOCl 5% (G2), NaOCl 1% + EDTA (G3), NaOCl 5% + EDTA (G4) e um grupo controle (G5).

**Tabela 3** – Probabilidades encontradas, quando da aplicação do teste de Kruskal-Wallis, às médias das medidas de áreas de pigmentação, obtidas com corpos de prova tratados com NaOCl 1% (G1), NaOCl 5,25% (G2), NaOCl 1% + EDTA (G3), NaOCl 5% + EDTA (G4) e um grupo controle, considerando-se as áreas cervical, medial e apical.

**Tabela 4** – Probabilidades encontradas, quando da aplicação do teste de Mann-Whitney às médias das medidas de áreas de pigmentação, obtidas com corpos de prova tratados com NaOCl 5%, NaOCl 1% + EDTA, NaOCl 5% + EDTA e um grupo controle, combinadas as séries de dados, duas a duas.

**Tabela 5** - Probabilidades encontradas, quando da aplicação do teste de Kruskal-Wallis, às médias das medidas de áreas pigmentadas, obtidas nas três áreas, dos corpos de prova tratados com NaOCl 1%, NaOCl 5%, NaOCl 1% + EDTA, NaOCl 5% + EDTA e um grupo controle, considerando-se cada uma das três áreas.

### III. ABREVIATURAS

**UFU** - Universidade Federal de Uberlândia

**FOUFU** - Faculdade de odontologia da Universidade Federal de Uberlândia

**EDTA** - ácido etilenodiaminotetracético

**SCR** - sistema de canais radiculares

**NaOCl** - hipoclorito de sódio

**Ca** - cálcio

**O** - oxigênio

**PH**- potencial hidrogeniônico

**NaOH** - hidróxido de sódio

**H<sub>2</sub>O** – molécula de água

**HClO** - ácido hipocloroso

**ppm** –partes por milhão

**MEV** – Microscopia eletrônica de varredura Ni- Ti

**K** - *kerr*

**H** - *hedstroen*

**GG** - *Gates Glidden*

**CT** - comprimento de trabalho

**IPD** - índice de permeabilidade

**mm** – Unidade de comprimento (milímetro).

**min** – Minutos.

**µm** – Micrômetro (milésima parte do milímetro)

**et al .** – Abreviatura de “et alii” (e colaboradores).

#### **IV- LISTA DE NOTAÇÕES**

**n**<sup>o</sup> – Número.

**#**- Número

**®** - marca registrada

**=** - igual

**p** – Probabilidade.

**&** - e (comercial)

**%** – Porcentagem.

**°C** – Unidade de temperatura (graus Celsius).

**ª** - Unidade de

**h** – Horas.

**s** – Segundos.

**G** - grama

**&** - e



## RESUMO

---

O presente estudo avaliou a permeabilidade dentinária em toda extensão do canal radicular, após a irrigação com hipoclorito de sódio associado ou não ao EDTA. Foram utilizados cinquenta incisivos bovinos unirradiculares, de similar idade e anatomia, divididos em cinco grupos experimentais de acordo com as referidas soluções: NaOCl 1% -G1, NaOCl 1% + EDTA- G2, NaOCl 5,25%- G3, NaOCl 5,25% + EDTA-G4 e água destilada-G5 (controle). Os dentes foram seccionados transversalmente com disco diamantado a 17mm do ápice e as raízes instrumentadas, sendo o batente apical realizado com lima K # 60 a 16mm. O comprimento real de trabalho foi determinado visualmente pelo recuo de 1mm da lima K # 15 após alcançar o forame apical. Posteriormente realizou-se o método histoquímico, uma reação físico-química de coloração da estrutura dentinária que permite evidenciar o quanto as soluções irrigadoras penetram na dentina, realizado com a solução de sulfato de cobre e ácido rubeânico. Em seguida, foi feita a secção transversal de toda extensão da raiz em uma cortadeira de precisão, obtendo-se cortes de 100 micrômetros de espessura, num total de aproximadamente 16 a 18 cortes. Destes, foram selecionadas 3 amostras de cada uma das regiões cervical, média e apical. A escolha das amostras foi feita por dois operadores que selecionavam as mais centrais de cada terço. As amostras foram incluídas e a área de pigmentação do corante na dentina foi quantificada por análise morfométrica em microscópio óptico, aumento de 40x. As medidas obtidas em milímetros, referentes a vestibular, lingual, mesial e distal de cada um dos três cortes das áreas cervical, médio e apical foram analisadas. De acordo com os resultados, considerando o modelo experimental utilizado, observou-se a prevalência da diferença de permeabilidade entre os terços cervical, médio e apical. Entretanto, nenhuma diferença significativa foi encontrada entre as referidas soluções estudadas. A permeabilidade dentinária do canal radicular apresentou-se, portanto, seguindo uma ordem de efetividade das soluções irrigadoras, em relação a qual o terço cervical tem maior permeabilidade que o médio e este maior que o apical, indiferente à solução irrigadora utilizada.

**Palavras Chave:** permeabilidade dentinária, canal radicular, irrigação, EDTA.



# ABSTRACT

---

The present study evaluated the dentinal permeability in all extension of the root canal, after the irrigation with sodium hypochlorite associated or not with the EDTA. Fifty bovine incisors, of similar age and anatomy, were divided in five experimental groups in accordance with the related solutions that had been used: NaOCl 1% - G1, NaOCl 1% + EDTA - G2, NaOCl 5.25% - G3, NaOCl 5.25% + EDTA - G4 and distilled water - G5 (control). The teeth were cut transversally 17mm from the apex and the roots had been instrumented. The apical prepare was executed with K # 60, in 16mm and this length was determined visually moving back 1mm with K # 15 after to reach the apical forame. Later histochemical method was carried out, a reaction physicist-chemistry of coloration of the dentinal structure that allows to evidence as much as irrigant solutions penetrate in the dentine, executed with sulfate cooper and rubeanic acid. After that, the transversal section of all extension of the root in a cut machine was made, getting itself cuts of 100 micrometers of thickness, in a total of approximately 16 or 18 cuts. Of these, 3 samples of each one of the regions cervical, medial and apical had been selected. The choice of the samples was made by two operators who selected the central part from the each third. The samples had been enclosed and the pigmentation area reached for the stain in dentine was quantified by morfometric analysis in optic microscope, increase of 40x. The measures gotten in millimeters, concerning the vestibular, lingual, mesial and distal of each one of the three cuts of the areas cervical, medial and apical had been analyzed. According the results, considering the experimental model used, was observed that it had prevalence of the difference of dentinal permeability between the thirds cervical, medial and apical. However, no significant difference was found between the related studied solutions. The dentinal permeability of the radicular canal appeared, therefore, following an effectiveness order of the irrigant solutions, in which relation cervical third has greater permeability that the medium and this greater that the apical, indifferent to the irrigant solution used.

**Key-Words:** dentinal permeability, root canal, irrigation, EDTA.

# 1. INTRODUÇÃO

---

O sucesso do tratamento endodôntico depende do método e da qualidade da instrumentação, irrigação, desinfecção e, ainda, de uma obturação tri-dimensional do canal radicular (Sen, 1995). Diferentes tipos de instrumentos, sejam manuais ou rotatórios, associados às soluções irrigadoras têm sido utilizados durante a instrumentação a fim de se preparar o canal de forma adequada e livre de debris, culminando numa obturação satisfatória e no sucesso esperado da terapia endodôntica. Entretanto, mesmo as técnicas mais atuais podem não realizar uma completa limpeza do sistema de canais radiculares, especialmente em canais curvos e/ou irregulares (Prati *et al* 2004; Shafer & Zapke 2000 ; Biffi & Rodrigues, 1989 ; Baker *et al* 1975 ; Sen, 1995; Peters *et al* 2000). Além dos debris, existe a evidência da formação de uma impregnação de material orgânico e inorgânico aderidos nas paredes de canais radiculares como conseqüência do corte da dentina pelos instrumentos endodônticos (Boyde & Knight, 1970; McComb & Smith, 1975; Mader *et al*, 1984). Esta impregnação, chamada no idioma inglês de *Smear layer*, foi inicialmente evidenciada por Boyde *et al* (1963) e, posteriormente, observada na endodontia por McComb & Smith (1975).

As vantagens e desvantagens da *smear layer*, assim como removê-la ou não, apresentou-se como um assunto muito controverso na literatura (Sen, 1995). Alguns autores acreditam na possibilidade de que a *smear layer* reduz a ação bacteriana (Vojinovic 1973; Diamond & Carrel 1984, Drake *et al* 1994; Peters *et al* 2000, Torabinejat *et al*, 2002), uma vez que diminuindo a permeabilidade dentinária pela presença da *smear layer*, seria também reduzida a entrada das bactérias para o interior dos túbulos dentinários. Em contrapartida, Baker *et al* (1975) e Yamada *et al* (1983) observaram que as bactérias podem permanecer na *smear layer* mesmo após a instrumentação dos canais radiculares e, ainda, sobreviverem e se multiplicarem, proliferando-se dentro dos túbulos dentinários (Orstavik & Haapasalo 1990; Foster *et al* 1993, Sen 1995; Meryon *et al*, 1986). A presença da *smear layer*, também impede a ação dos agentes antimicrobianos (Bystrom & Sundquist, 1985; Sen

*et al*, 1995) e diminui a adesividade e a adaptação dos materiais obturadores (White *et al*, 1984; Gutierrez *et al*, 1990b; Oksan *et al* 1993; Kouvas *et al* 1998) e, conseqüentemente, alteram o selamento apical (Kennedy *et al* 1986, Lloyd *et al* 1995 ; Froes *et al* 1997 e Froes *et al* 2000).

Considerando-se que prognóstico para o sucesso do tratamento de canais radiculares provém de um canal livre de bactérias após a obturação (Estrela, 2003), é imprescindível a eliminação dos microorganismos em todos os estágios do tratamento endodôntico (Heling & Chandler, 1998). Como todas as técnicas de instrumentação, manual e rotatória, produzem tanto a *smear layer* quanto os debris (McComb & Smith 1975; Mendel *et al* 1990; AHLQUIST *et al*, 2001), a literatura aponta a importância da interação da instrumentação às substâncias químicas complementares (Garberoglio & Becce, 1994; Guerisoll *et al*, 2002) as quais favorecem a limpeza do sistema de canais radiculares, uma vez que atuam sobre substâncias orgânicas e inorgânicas (Di Lenarda, 2000), removendo total ou parcialmente a *smear layer*, facilitando o preparo e a desinfecção do canal radicular (Sen, 1995; Heling & Chandler, 1998).

O hipoclorito de sódio (NaOCl), nas concentrações variadas de 0,5 a 5,25%, é a substância química mais aceita como solução irrigadora durante a instrumentação dos canais radiculares por suas propriedades anti-sépticas e capacidade de dissolução de matéria orgânica (Moorer & Smith 1975). Como substância química complementar à irrigação, o ácido etilenodiaminotetracético sal dissódico (EDTA) é o agente quelante específico introduzido na endodontia em 1957 por Nygaard-Ostby em substituição aos ácidos inorgânicos até então utilizados. Caracteriza-se por ter a capacidade de aumentar a permeabilidade dentinária e dissolver matéria inorgânica, no caso a *smear layer* (Hulsmann *et al*, 2003). A associação de substâncias químicas juntamente com a ação mecânica da instrumentação é o melhor caminho para obtenção da limpeza do sistema de canais radiculares (Goldman *et al*, 1982; Yamada *et al* 1983; Baumgartner & Mader 1987, Cengiz *et al*. 1990; Di Lenarda, 2000).

Embora seja indiscutível a ação quelante do EDTA na dentina (Nygaard-Ostby 1957; McComb & Smith , 1975; Goldman *et al* 1981; 1982), fica a dúvida quanto à sua ação em tempo real da conduta clínica de rotina (Di Lenarda *et al* 2000, Goldberg & Spielberg, 1982), tendo em vista às limitações da

instrumentação devido à complexidade anatômica do canal radicular (Rodrigues & Biffi, 1989; Biffi & Rodrigues, 1989; Ciuchhi, 1989; Buchanan 1991; Shafer & Zapke 2000). A efetiva ação do EDTA ainda é motivo de pesquisas para avaliação da sua real atuação, principalmente no terço apical, caracterizado pelo difícil acesso e complexa morfologia dos túbulos dentinários (Baker *et al*, 1975; Whittaker & Kneale 1979; Kennedy *et al*, 1986). A obtenção de melhores informações em relação à possível quantificação da efetividade do EDTA em função da profundidade atingida na dentina, em toda a extensão do canal radicular, em especial à região apical, seria o principal objetivo da presente pesquisa.

Diante do exposto, o trabalho vem apresentar um método quantitativo histoquímico e morfométrico da permeabilidade dentinária, para o qual utilizaram-se como solução irrigadora o NaOCl a 1% e a 5,25%, associados ou não ao EDTA.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

---

Para um melhor entendimento, a revisão da literatura foi embasada nos seguintes tópicos: Anatomia, *Smear layer* e Soluções Irrigadoras (Hipoclorito de Sódio e EDTA).

### 2.1 Anatomia - influência na limpeza e modelagem dos canais radiculares

O bom senso, a sensibilidade e o conhecimento anatômico são expressivos durante a instrumentação dos canais radiculares; tendo por base, além da condição anatômica, a condição patológica e a intensidade da curvatura do canal, assim como o instrumento utilizado, o que reflete a importância da limpeza e modelagem do canal no sucesso da terapia endodôntica (Estrela, 2003).

Percebe-se que a limpeza e a conformação dos condutos radiculares estão condicionadas ao estado patológico da polpa e dos tecidos periapicais e à morfologia radicular como um todo. Estudos de Baker *et al* (1975) indicam as múltiplas dificuldades implícitas na limpeza dos pequenos e complexos espaços da anatomia radicular.

Essa complexa anatomia dos canais limita o acesso das limas a todas as paredes da dentina prejudicando a sua total limpeza e, ainda, associada aos microorganismos instalados nos túbulos dentinários, representam reais dificuldades do tratamento endodôntico (Lee, 2004). Biffi & Rodrigues, 1989 compararam a instrumentação manual e ultrasônica em pré-molares humanos e concluíram que a presença de debris no canal radicular depende mais da variação anatômica do canal que da técnica de instrumentação utilizada. Também Vansan (1990) mostraram que é no terço apical onde existe a maior dificuldade de ação das soluções irrigadoras, além do fato de que nenhuma solução é capaz de eliminar completamente todos os debris existentes.

Para Buchanan (1991) todos os condutos radiculares possuem alguma curvatura, mesmo aqueles que se apresentam aparentemente retos na região apical. Tais curvaturas nem sempre são percebidas na imagem radiográfica convencional por ser a representação bidimensional de uma imagem tridimensional. Apesar da dificuldade de visualização, sabe-se que na região apical existe a compactação e o acúmulo de debris e microorganismos dentro dos túbulos dentinários, favorecendo os índices de contaminação microbiana e, conseqüentemente, de lesões periapicais (Rodrigues & Biffi, 1989).

Shafer & Zapke 2000 mostraram que para qualquer tipo de técnica existe a influência da anatomia. Em análise de microscopia eletrônica os autores compararam a produção de *smear layer* e debris nas regiões cervical, média e apical de canais instrumentados com técnica manual e rotatória, em dentes retos e curvos. As regiões coronal e média de canais retos apresentaram-se mais favoráveis à limpeza, resultado semelhante aos estudos de Biffi & Maniglia (1995).

O estudo da morfologia das paredes cervical, média e apical também foi feito por Prati *et al* 2004, que compararam a produção de *smear layer* pelas técnicas de instrumentação rotatória e manual. Mesmo com o uso de soluções irrigadoras, as técnicas de instrumentação são incapazes de remover todos os debris e restos pulpares presentes nas depressões anatômicas dos canais radiculares. A *smear layer* pode ser afetada pelo *desing* do instrumento endodôntico e pelas soluções irrigadoras e a sua permanência na região apical, em comparação com as regiões coronal e média, sugere a provável contaminação bacteriana e dificuldade de selamento apical. Também Ciucchi (1989) afirmaram que a irrigação torna-se um fator crítico em canais curvos ou irregulares, comprometendo a remoção da *smear layer* e a limpeza, principalmente da região apical.

Jong-Ki Lee *et al.* (2006) analisaram por tomografia micro computadorizada a curvatura radicular em 46 primeiros molares superiores e observaram pelas imagens obtidas em três dimensões que o terço apical se

mostra com maior curvatura comparado com terços médio e coronal, comprovando a complexidade anatômica principalmente da região apical.

Sabe-se que o número de túbulos dentinários da superfície do canal radicular são menos numerosos na região apical, além de possuírem diâmetros irregulares (Baker *et al*, 1975; Kennedy *et al*, 1986). Este fato, associado às características anatômicas, reduz consideravelmente a capacidade de limpeza desta região, o que sugere que além da condição anatômica influenciar na limpeza dos canais radiculares, a constituição da dentina e a sua forma de apresentação influenciam na ação das soluções irrigadoras de limpeza, uma vez que, dependendo da área dentinária analisada, o número e o diâmetro dos túbulos dentinários sofrerão variações. Kennedy *et al* (1986) afirmaram ainda, com base nas variações fisiológicas entre jovens e adultos, que a presença de túbulos dentinários abertos na região apical e média é mais freqüente em dentes jovens comparados aos dentes envelhecidos. O diâmetro dos túbulos de dentes fisiologicamente velhos apresentam-se menores e menos numerosos, com presença de dentina esclerótica na região apical.

Bödecker & Applebaum (1933), utilizando dentes humanos extraídos nas mais variadas faixas etárias dos pacientes, estudaram o grau de permeabilidade dentinária. Com base em estudos histológicos, chegaram à conclusão de que os dentes jovens possuíam dentina mais permeável que a dos dentes adultos, contudo, devido aos processos de cárie, erosão e abrasão na adolescência, esse tecido se tornava menos permeável.

Carrigan *et al*. (1984) também em relação à idade, afirmam que os canalículos dentinários diminuem com o passar dos anos. Os autores utilizaram microscopia eletrônica de varredura para avaliarem a quantidade de canalículos dentinários presentes nos três terços das raízes (cervical, médio e apical) nas seguintes faixas etárias: 20<sup>a</sup> a 34<sup>a</sup>, 35<sup>a</sup> a 44<sup>a</sup>, 45<sup>a</sup> a 54<sup>a</sup>, 55<sup>a</sup> a 79<sup>a</sup> e acima de 80 anos, evidenciando que o número de canalículos dentinários da região cervical e média é praticamente o mesmo, diminuindo acentuadamente na região apical.

Whittaker & Kneale (1979) avaliaram, através de microscopia eletrônica de varredura, o número de canalículos dentinários da coroa ao ápice

dental e constataram que a quantidade de canalículos é maior na região coronária, regredindo significativamente em direção ao ápice. Associando-se, então, o fator anatômico da curvatura dos canais às características morfológicas dos túbulos dentinários da região apical, a ação das soluções irrigadoras para esta região torna-se extremamente comprometida.

## 2.2. Smear Layer

A composição exata da *smear layer* endodôntica ainda não foi determinada; sabe-se que tanto a ação de instrumentos mecânicos como manuais produzem esta fina camada amorfa e irregular de partículas de dentina, fragmentos de odontoblastos, microorganismos, células sanguíneas e partículas inorgânicas de tecido calcificado (Bannstrom *et al*, 1980; Cameron 1983, Mader *et al*, 1984; Sen *et al*, 1995) . O termo *smear layer* foi designado primeiramente por Boyde *et al* (1963) para se referir a uma camada residual formada após o corte do esmalte dentário. Mas foi McComb & Smith em 1975 que observaram a *smear layer* endodôntica após a instrumentação dos canais radiculares. Os autores perceberam que a *smear layer* endodôntica apresentava, diferentemente da *smear* coronária observada por Boyde *et al* 1963, uma porção inorgânica de tecido calcificado da dentina e também matéria orgânica de remanescentes pulpare e bacterianos.

A profundidade e a textura superficial da *smear layer* nas paredes dos canais radiculares atingem desde a espessura de 1 micrômetro, capaz de obstruir o orifício dos túbulos dentinários superficialmente, até 40 micrômetros de profundidade pelo interior dos túbulos (Mader *et al*, 1984). Cengiz *et al* (1990) propuseram que a penetração da *smear* no interior dos canalículos pode ser causada por ação de capilaridade resultante de forças adesivas entre o túbulo e o material pelo qual é constituída. Esta hipótese de ação de capilaridade poderia explicar o fenômeno observado por Aktener *et al* (1989) que evidenciou uma profundidade atingida pela *smear layer* de até 110 micrômetros durante a instrumentação endodôntica (Sen, 1995).



Também Pashley (1992) afirmou que a composição da *smear layer* varia de acordo com a estrutura a partir da qual ela se origina. Pode haver na sua constituição dentina orgânica e inorgânica, restos pulpares, processos sanguíneos residuais, restos fibrosos de colágeno, produtos necróticos, microorganismos, cristais de cálcio provenientes de dentina esclerótica, além de componentes orgânicos da pré dentina, de acordo com Tatsuta *et al* (1990). Pashley (1992) revela, ainda, que a formação da *smear* dentro dos túbulos dentinários é criada quando o diâmetro das partículas provenientes da instrumentação for menor que dos túbulos cortados. O tamanho das partículas varia 0,8 micrômetros (dentina superficial) até 2,5 a 3 micrômetros (dentina profunda). Na dentina mais profunda o número de túbulos por milímetro quadrado é maior, conseqüentemente, a *smear layer* é mais compacta e nesse caso é chamada *smear plug*, quando se localiza dentro dos túbulos e mais profundamente.

De acordo com Mader *et al* (1984) somente nas regiões onde existe o contato do instrumento endodôntico com as paredes dos canais, haverá formação da *smear layer*, não sendo percebida nenhuma camada residual em regiões não instrumentadas (Goldman *et al* 1981). Apesar de não haver formação de *smear* onde não existe ação dos instrumentos endodônticos, pode haver deposição da mesma nessas regiões, mesmo que seja uma camada residual superficial e dispersa; diferente da *smear plug* que realmente estará presente após a instrumentação, uma vez que esta é lançada para dentro dos túbulos dentinários (Mader *et al*, 1984).

Como a formação da *smear layer* está na dependência da ação mecânica das limas, pesquisas avaliaram a qualidade da instrumentação, seja ela manual ou rotatória. Mandel *et al* (1990) afirmaram que não há diferença na formação da *smear layer* independente da técnica de instrumentação utilizada. Os autores compararam técnicas manual, ultra-sônica (Cavi-Endo) e rotatória (Canal Finder). Observaram, entretanto, que na região apical houve maior deposição de *smear layer*, talvez pelo fato de que nas demais regiões não houve instrumentação de algumas áreas. Também McComb & SMITH (1975) não perceberam nenhuma diferença na formação da *smear layer*

quando avaliaram o uso de limas tipo *K* e alargadores Hedstroen comparados com a técnica rotatória *Giromatic*.

Czontskowsky *et al* (1990) afirmaram que o uso das brocas *Gates-glidden* produzem mais *smear layer* que o uso de limas manuais. A quantidade de *smear* formada está na dependência do tipo de instrumento utilizado e técnica realizada (Dautel-Morazin *et al* 1994). Além disso, a característica anatômica do canal, a qualidade e o volume da solução irrigadora utilizada, assim como a frequência da irrigação afetam diretamente a quantidade da *smear layer* formada.

Alquist *et al* (2001) compararam a produção da *smear layer* pelas técnicas manuais e rotatórias com limas Ni-Ti. Para o trabalho foram utilizados 30 dentes permanentes com 20 a 25 graus de curvatura aproximadamente, divididos em dois grupos, os que foram instrumentados pela técnica manual e os da técnica rotatória. Todos os canais foram irrigados com solução de hipoclorito de sódio 0,5%. A hipótese inicial, de acordo com os autores, é a de que a técnica rotatória pudesse apresentar um canal mais limpo após a instrumentação. Entretanto, de acordo com os resultados, obtidos a partir de uma análise qualitativa por microscopia eletrônica, a técnica manual apresentou uma instrumentação com paredes dentinárias mais limpas que a rotatória. Os autores enfatizam o fato de que ambas as técnicas produzem *smear layer* e debris dentinários.

As vantagens e desvantagens da *smear layer*, assim como removê-la ou não, foi um assunto muito controverso na literatura (Sen, 1995).

Vojinovic (1973) afirmava que os *plugs* dentinários poderiam impedir a invasão de bactérias para o interior dos túbulos, o que estava de acordo com Michelich *et al* (1980), Diamond & Carrel (1984), Peters *et al* (2000), Torabinejat *et al*, (2002), os quais relatam que a *smear layer* pode diminuir a permeabilidade dentinária e, com isso, reduzir a ação das bactérias. Também Drake *et al* (1994) e Gutiérrez *et al* (1982) concordavam que a camada de *smear layer* formava uma barreira contra a entrada de microorganismos para os túbulos dentinários.

De acordo com Drake *et al* (1994), após análise em microscopia eletrônica, a dissolução da *smear layer* pelo uso de EDTA e NaOCl permite a penetração de *Streptococcus anginosus* para o interior dos túbulos dentinários, diferentemente se a camada de *smear* fosse preservada. Gutiérrez *et al* (1982) afirmavam que a infiltração bacteriana seria sempre menor na região apical que nas cervicais e médias, já que existe dificuldade de remoção da *smear layer* pelas soluções irrigadoras na área apical.

Por outro lado, se a presença da *smear layer* dificulta o trânsito de bactérias para o interior dos túbulos como afirmavam alguns autores (Vojinovic 1973, Gutiérrez *et al* 1982; Diamond & Carrel 1984, Peters *et al* 2000 Torabinejat *et al*, 2002), também dificultaria a desinfecção dos canais radiculares (Orstavik & Haapasalo 1990, Foster *et al* 1993, Sen 1995).

Orstavik & Haapasalo (1990) avaliaram a permeabilidade das espécies de *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus sanguis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* em cortes de dentina bovina quanto à presença ou ausência da *smear layer*. Após a utilização do EDTA 17% por 4 minutos e NaOCl 5,25%, os espécimes foram avaliados e os resultados mostraram que o *E. faecalis* infectou rapidamente toda extensão dos túbulos dentinários. O *S. sanguis* infectou totalmente após 2 semanas, o *E. coli* penetrou apenas 600 micrômetros após 2 semanas de incubação. Já o *P. aeruginosa* revelou baixo poder infectante. Os autores avaliaram também o poder desinfetante dos medicamentos testados. O hidróxido de cálcio atuou pouco sobre o *E. faecalis*, o *S. sanguis* e o *E. coli*, sendo eficiente, porém sobre o *P. aeruginosa*. O paramonoclorofenol não atuou sobre o *P. aeruginosa*, mas se mostrou eficaz contra os demais com a presença ou não da *smear layer*. O NaOCl 5,25% apresentou poder de desinfecção dentro dos túbulos dentinários, ao passo que o EDTA se mostrou com baixo poder bactericida.

Foster *et al* 1993 avaliaram a ação do hidróxido de cálcio após a ação do EDTA 17% e perceberam maior difusão dos íons hidroxila através dos túbulos dentinários, o que mostra um aumento da permeabilidade dentinária após remoção da *smear layer* endodôntica.

Sabe-se que as bactérias podem permanecer na *smear layer* mesmo após a instrumentação dos canais radiculares podendo se proliferar e multiplicar dentro dos túbulos dentinários, como se percebe nos trabalhos de Bystrom & Sundquist, 1985; Meryon *et al*, 1987; Sen *et al*, 1995.

Bystrom & Sundqvist (1985) estudaram a remoção da *smear layer* de canais com polpas necróticas. Em 20 dentes foi realizada instrumentação mecânica manual e irrigação com NaOCl 5% associada à irrigação final de EDTA por 10 minutos e NaOCl 5% por 5 minutos. Para estes apenas 3 dentes apresentaram coletas microbiológicas positivas. Para outros 20 dentes irrigados somente com NaOCl 5%, houve presença de coletas positivas em 6 dentes. Os autores concluíram que o uso combinado das soluções irrigadoras exerceu ação antibacteriana mais eficiente. A medicação intracanal foi realizada por uma semana.

Meryon *et al* (1987) realizaram um estudo quantitativo, *in vitro* e *in vivo*, dos agentes utilizados na remoção da *smear layer* (ácido fosfórico, ácido poliacrílico, ácido cítrico, ácido láctico, peróxido de hidrogênio, EDTA, Tubulicid Blue Label, Tubulicid Red Label). *In vivo*, os resultados mostraram que o EDTA foi mais efetivo na remoção da *smear layer*, seguido pelos ácidos orgânicos. *In vitro*, todos os ácidos se apresentaram mais eficazes. Os autores afirmam que a característica variável dessas soluções quanto à eficácia de remoção da *smear layer* pode determinar a facilidade com a qual a bactéria penetra nos túbulos dentinários.

Em relação à ação microbiana na *smear layer*, Sen *et al* (1995) fazem um relato literário explicando que a extensão da invasão bacteriana depende do tipo, da espécie e do tempo de ação da mesma, como também afirmaram Orstavik & Haapasalo, (1990). A *smear layer* retarda a penetração da *Proteus vulgaris*, mas não forma uma barreira completa e efetiva contra esta bactéria. Discorrem, ainda, sobre a capacidade de a *Pseudomona aeruginosa* remover a *smear layer* e abrir os túbulos dentinários após possível produção de colagenase, também observado por Meryon *et al*. (1986), além de bactérias como *A. viscosus*, *Corynebacterium ssp.* e *S. sanguis* digerirem a *smear layer* para facilitar sua penetração e proliferação dentro dos túbulos. Ou seja,

quando um canal radicular começa a ser fortemente infectado, as bactérias podem ser encontradas até mesmo em espaços profundos dos túbulos dentinários.

A influência da *smear layer* é evidenciada também em relação à capacidade de adesão e adaptação dos materiais seladores nas paredes dentinárias. White *et al* (1984) fizeram uma avaliação considerando a relação da penetração dos materiais plásticos nos túbulos dentinários. De acordo com os autores, a presença da *smear layer* impede a entrada do material selador nos canalículos, ao passo que a sua ausência, favorece consistentemente a penetração do material obturador. O maior contato entre material selador à dentina evita o extravasamento apical e coronal. Também Czonstkowsky *et al.* (1990) verificaram que a *Smear layer* forma uma barreira evitando o íntimo contato do material obturador com a parede do canal radicular, e que as soluções mais indicadas para sua remoção seria a associação de hipoclorito de sódio a 5,25% ao ácido cítrico a 6% ou ao EDTA a 17%.

Gutierrez *et al* (1990b) demonstraram que em cortes dentinários analisados em microscopia eletrônica de varredura, das regiões radiculares submetidas à ação do EDTA e do NaOCl, a penetração do cimento atingiu até 15 micrômetros. De acordo com os autores, o uso do NaOCl isoladamente preserva a *smear layer* e nenhuma imagem de preenchimento dos túbulos pelo cimento endodôntico foi percebida.

No trabalho de Oksan *et al* (1993), os autores analisaram a influência da *smear layer* em relação à penetração dos cimentos endodôntico nos túbulos dentinários, através de microscopia eletrônica. Observaram que a *smear layer* altera a capacidade de penetração dos cimentos na dentina e ainda, que essa penetração pode ser afetada pelas características físicas e químicas dos cimentos.

Igualmente Kouvas *et al* (1998) estudaram a influência da *smear layer* na profundidade de penetração dos cimentos endodônticos, no caso o Sealapex, o Roth 811 e o CRCS. Os autores afirmam que a *smear layer* obstrui a penetração dos cimentos dentro dos túbulos dentinários e sugerem que o uso

de hipoclorito de sódio associado ao EDTA é capaz de remover a *smear layer* e melhorar as condições clínicas do tratamento endodôntico.

De acordo com Lee *et al* (2004) em regiões não instrumentadas não há possibilidade de remover todo o resíduo tecidual e, neste caso, a ação da medicação intracanal ou da solução irrigadora é limitada. O agente antibacteriano só exercerá sua função quando em contato direto com o fator patogênico e somente as áreas livres de restos orgânicos (debris) podem ser realmente obturadas, já que a presença dos debris permite a infiltração, o que está de acordo com estudos de WU *et al* 2001.

A relação da *smear layer* com o selamento apical foi também estudada por Kennedy *et al* (1986), Lloyd *et al* (1995); Froes *et al* (1997) e Froes *et al* (2000).

De acordo com Kennedy *et al* (1986) a remoção da *smear layer* melhora o selamento apical das obturações endodônticas. O menor índice de infiltração do corante azul de metileno pelo forame apical, em obturações realizadas pela técnica de condensação lateral cimentadas com Roth's 801, ocorreu nos grupos onde a *smear layer* havia sido removida.

Lloyd *et al* (1995), entretanto, constataram que não houve melhor selamento apical após remoção da *smear layer* no trabalho realizado por eles. Os autores realizaram a instrumentação pela técnica circunferencial associada à irrigação com NaOCl 2,5% e obturação pela técnica de condensação lateral com cones de guta percha e cimento Sealapex. De acordo com os resultados obtidos, em nenhum grupo houve penetração do corante.

Também Froes *et al* (1997) e Froes *et al* (2000) não encontraram diferenças significativas quanto à presença ou ausência de *smear layer* endodôntica e a relação com a infiltração do corante azul de metileno. Os autores compararam várias técnicas de obturação, como guta-percha termo-plastificada e condensação lateral.

Em relevância ao trabalho de Sen *et al* (1995) "The *smear layer*: a phenomenon in root canal therapy", vale ressaltar que os autores fazem um resumo do que seria aceitável para se caracterizar a *smear layer*. Na revisão

literária discorrem sobre a estrutura da *smear*, sua característica como barreira física, relação com microinfiltração bacteriana e a necessidade de se realizar a sua remoção, enfatizando as soluções mais utilizadas como hipoclorito de sódio, agentes quelantes e ácidos orgânicos, assim como suas associações. Fazem também algumas conclusões como o fato de a *smear layer* sempre ser formada após a instrumentação dos canais radiculares, ser amorfa, irregular e agranular sob visão microscópica; não ser capaz de evitar a invasão bacteriana, apenas retardar este processo; poder interferir na adesão e penetração dos cimentos endodônticos dentro dos túbulos dentinários, influenciando na qualidade da obturação; ser capaz de se desintegrar e se dissolver no material obturador, o qual pode ser removido pelos produtos bacterianos como ácidos e enzimas. Relatam, ainda, que diferentes soluções e técnicas podem ser utilizadas na remoção da *smear layer*, que os ácidos orgânicos não são tão eficazes quanto os agentes quelantes para sua remoção e que a efetividade do ultra-som é controversa. Os autores indicam o uso seqüencial do EDTA e NaOCl na limpeza dos canais radiculares e alertam sobre o fato de que mesmo se a *smear layer* for removida, ainda assim existe a chance de reinfecção dos túbulos dentinários caso não haja um selamento adequado. De acordo com os autores, estudos sequenciais são, de fato, necessários para se estabelecer a correlação entre a *smear layer* endodôntica e o desempenho do selamento do canal radicular.

### **2.3 Solução Irrigadora**

A presença de canalículos no tecido dentinário foi demonstrada por M'Quillen (1866) e desde então a dentina passa a ser tratada como um tecido permeável por natureza. O estudo da permeabilidade dentinária e as soluções irrigadoras sempre estiveram relacionados, assim como o intuito de elucidar quais substâncias seriam capazes de penetrar no interior dos canalículos dentinários promovendo, conseqüentemente, desinfecção dos canais radiculares (Robazza, Paiva & Antoniazzi, 1981; Pécora *et al*, 1989; Takeda *et al*, 1999; Di Lenarda, Cadenaro & Sbaizero, 2000; Scelza, Scelza & Antoniazzi, 2000; Hulsmann, Heckendorff & Lennon, 2003).

Nenhuma solução irrigadora remove, ao mesmo tempo, componentes orgânicos e inorgânicos presentes na *smear layer* (Goldman *et al*, 1982; Yamada *et al* 1983). Além disso, a eficácia das soluções irrigadoras dependerá da sua natureza química, do volume utilizado, da temperatura, do tempo de contato com as paredes dentinárias e da tensão superficial (Ingle & Bakland, 1994).

Estudos de microscopia eletrônica comprovaram que quanto maior o volume de solução utilizada melhor é a remoção dos restos orgânicos e microorganismos do canal radicular, independente da natureza química da solução empregada (Baker *et al* 1975).

Sabendo-se que a *smear layer* teria influência na manutenção e proliferação bacteriana no interior dos canalículos dentinários, assim como na adesão e no selamento dos materiais obturadores, várias foram as pesquisas com o intuito de elucidar qual a melhor solução irrigadora capaz de remover a *smear layer* endodôntica. O hipoclorito de sódio e o EDTA são as soluções de destaque para se avaliar a remoção da *smear layer* e a sua relação com a permeabilidade dentinária.

A associação do hipoclorito ao EDTA tem sido evidenciada e comprovada como melhor forma de remoção da *smear layer* endodôntica (Baumgartner & Mader 1987, Cengiz *et al*. 1990). O hipoclorito de sódio nas suas várias concentrações é responsável pela remoção da matéria orgânica (Moorer & Smith 1975) e o EDTA se caracteriza por agir sobre a matéria inorgânica presente na *smear layer*, o que de acordo com a literatura produz bons resultados na limpeza dos canais radiculares (Garberoglio & Becce, 1994; West & Roane 2000; Guerisoli *et al*, 2002; Di Lenarda, 2000).

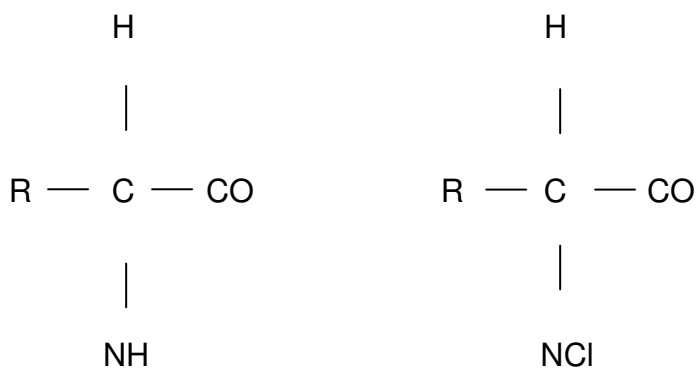
### **2.3.1 Hipoclorito de sódio**

Os compostos de cloro, também chamados halogenados, passaram a ser largamente utilizados na Medicina e também na Odontologia após os trabalhos de Dakin e Dakin & Duham, em 1915, 1916 e 1917 respectivamente.



O cloro é um dos mais potentes germicidas conhecidos e exercem ação antibacteriana sob a forma de ácido hipocloroso não dissociado (Leonardo, 2005). Tanto em solução ácida quanto em solução neutra, o ácido hipocloroso não se dissocia, e sua ação bactericida é efetiva e acentuada (Goodman & Gilman, 1967).

De acordo com Dakin & Duham a ação bactericida do hipoclorito se faz por oxidação da matéria orgânica, processo pelo qual o cloro substitui o hidrogênio do grupo das proteínas, que contém um grande número de aminoácidos. O novo composto assim formado pertence ao grupo das cloraminas com elevadas propriedades bactericidas (Leonardo 2005).



De acordo com Leonardo (2005) a ação simultânea do hipoclorito de sódio como oxidante, hidrolisante, detergente, necrolítica, proteolítica, antitóxica, bactericida, desodorizante, dissolvente e neutralizante, justifica a complexidade das reações químicas desse produto, como também a indefinição do seu real mecanismo de ação bactericida. As soluções de cloro sob a forma de hipoclorito de sódio (compostos halogenados) são comumente designadas de acordo com a concentração utilizada (Líquido de Dakin 0,5%, solução de Milton 1%, Solução de Labarraque 2,5%, Soda clorada duplamente concentrada 4-6%, solução de hipoclorito de sódio NF -USP 5,25%).

Grossman & Meiman (1941) avaliaram vários agentes de limpeza do sistema de canais radiculares e verificaram que a solução de hipoclorito de sódio a 4-6% foi o dissolvente mais eficaz sobre o tecido pulpar.

Num estudo da permeabilidade dentinária Marshall *et al* (1960) mostraram que anti-sépticos aquosos penetravam mais facilmente nos túbulos dentinários do que substâncias não aquosas, sendo que a solução de hipoclorito de sódio a 5%, em função dessa penetração, aumentava a permeabilidade dentinária.

Tylor & Austin (1973) demonstraram que essa solução desempenha uma ação solvente sobre os tecidos necrosados. Também neste ano, Antoniazzi (1973) avaliou a ação residual e a atividade antimicrobiana de algumas substâncias coadjuvantes ao preparo biomecânico, na presença ou não de microorganismos. Dentre outras soluções estudadas, o Líquido de Dakin apresentou-se extremamente efetivo quanto à ação antimicrobiana.

Trepagnier *et al.* (1977) estudaram os efeitos de varias soluções, em concentrações diversas, na dissolução de tecidos orgânicos. Os resultados alcançados indicaram que o hipoclorito de sódio a 5,0 por cento não só é mais eficaz como atua por menos tempo.

Baker *et al.* (1975) compararam, através do uso de microscopia eletrônica de varredura, a eficiência de diferentes volumes de solução irrigadoras (0,5; 1,0; 2,5, e 5,0 ml) com relação à limpeza e à remoção de debris no interior dos canais radiculares. Os autores concluíram que a melhor limpeza dos canais radiculares era diretamente proporcional ao volume de solução irrigadora utilizada, ou seja, a quantidade se mostrou mais importante que o tipo de solução. E ainda, afirmaram que a instrumentação mecânica isoladamente, não se mostra efetiva para eliminar as bactérias do sistema de canais radiculares.

McComb & Smith (1975) verificaram, por meio de microscopia eletrônica de varredura que canais onde foi realizada a irrigação somente com hipoclorito de sódio a 6% apresentaram melhor remoção de debris do que naqueles onde se associou hipoclorito 6% com água oxigenada 3%. Estes foram os primeiros autores a verificarem a presença da *smear layer* nas paredes da dentina ocasionada pela instrumentação dos canais radiculares.

Baumgartner *et al* (1984) avaliaram a eficiência do preparo biomecânico, através de microscopia eletrônica de varredura (MEV), utilizando como solução irrigadora, a solução salina 0,9%, a solução de hipoclorito de sódio a 5,25% e o ácido cítrico a 50%, em seis técnicas diferentes, combinadas ou não. Os autores observaram que a maior efetividade na remoção da *smear layer* era das técnicas onde se utilizaram o ácido cítrico ou uma combinação deste com hipoclorito de sódio.

Marcano (1989) apresentou uma revisão da literatura sobre soluções irrigadoras auxiliares da instrumentação dos canais radiculares e afirmou que soluções alcalinas agem dissolvendo matéria orgânica. O autor chama a atenção para o fato de o hipoclorito de sódio ser a solução irrigadora mais empregada, o que se justifica por apresentar PH alcalino que neutraliza a acidez do meio; baixa tensão superficial, que facilita seu acesso às irregularidades os canais radiculares; capacidade de saponificação de ácidos graxos; facilidade de penetração nos canalículos dentinários dissolvendo fibras de Thomes; dissolução de matéria orgânica e tecido necrosado; capacidade de neutralizar produtos tóxicos do canal radicular; e ainda, não é irritante quando bem empregado, além de ser econômico.

Heling & Chandler *et al* (1998) avaliaram o efeito antimicrobiano da associação das soluções irrigadoras nos túbulos dentinários de acordo com o tempo de atuação. As soluções estudadas foram: 1- solução salina por 10 minutos; 2- clorexidina 0,2% 10 minutos; 3- peróxido de hidrogênio 3% por 10 minutos; 4- clorexidina 0,1% associado a peróxido de hidrogênio 1,5% 10 minutos; 5- clorexidina 1,5% associado a peróxido de hidrogênio 3 por 10 minutos; 6- clorexidina 0,6% por 5 minutos e peróxido de hidrogênio 3% por 5 minutos; 7- hipoclorito de sódio 1% por 10 minutos; 8- EDTA 17% por 10 minutos; 9- peróxido de hidrogênio 3% por 5 minutos; 10- hipoclorito de sódio 1% por 5 minutos e peróxido de hidrogênio 3% por 5 minutos; EDTA 17% por 5 minutos e hipoclorito de sódio 1% por 5 minutos. Os autores concluem que clorexidina e hipoclorito de sódio apresentaram valores igualmente efetivos quanto à característica antimicrobiana, mas a capacidade de dissolver tecido orgânico faz do hipoclorito a solução de escolha para irrigação dos canais radiculares. A combinação da clorexidina com peróxido de hidrogênio tem

efeito sinérgico, sugerindo um potencial benéfico quando usados como soluções irrigantes, podendo representar uma resposta promissora à erradicação da persistente infecção da *E. faecalis* em casos de retratamento. Lembrando que as espécies estudadas, *E. faecalis* e *Pseudomonas aeruginosas* são as espécies bacterianas gram-positivas mais resistentes ao tratamento endodôntico.

Siqueira Jr. *et al* (1998) estudaram *in vitro* o efeito antibacteriano de seis soluções irrigadoras utilizadas em Endodontia, por meio de difusão em ágar. De posse dos resultados, os autores classificaram a capacidade antimicrobiana das soluções da seguinte forma: 1- solução de hipoclorito de sódio a 4%, 2- solução de hipoclorito de sódio a 2,5%; 3- solução de hipoclorito de sódio a 2%; 4- solução de gluconato de clorexidina a 0,2%; 5- EDTA; 6- ácido nítrico; solução de hipoclorito de sódio a 0,5%.

Várias pesquisas e considerações são feitas sobre a concentração da solução de hipoclorito de sódio. Sabe-se, entretanto, que não há um consenso na literatura quanto à escolha das soluções de hipoclorito de sódio como coadjuvante ao preparo biomecânico dos canais radiculares, no que diz respeito à concentração da mesma (Leonardo 2005).

De acordo com Johnson *et al* (2004) quanto maior a concentração da solução de hipoclorito, maior será a atividade de dissolução tecidual, assim como também será maior o potencial de toxicidade sobre os tecidos vivos. Os autores afirmam que maior dissolução tecidual ocorre com o maior tempo de exposição ao produto. Mas dentre as soluções analisadas (hipoclorito de sódio a 3%, 6%, 8% e 10%), acima de 6% nenhuma diferença significativa foi observada em qualquer tempo de exposição. Conclui-se que o aumento da concentração de soluções de hipoclorito de sódio acima de 6% não determina maior capacidade solvente.

Também em relação à dissolução tecidual, Chu *et al* (2004) estudaram o efeito de diferentes concentrações de hipoclorito de sódio sobre o tecido bovino e observaram que pouca diferença se percebe entre as concentrações 5,25% e 6%, mas diferenças significativas são percebidas entre as concentrações de 0,5% ou 1% e 5,25% e/ou 6%. Os autores enfatizam a

importância da concentração da solução na remoção da matéria orgânica tecidual.

Quanto à característica da concentração da solução e seu efeito antibacteriano, pesquisas revelaram que não há diferença significativa entre a solução de hipoclorito a 0,5% e a 5% (Bystrom & Sundqvist, 1985; Siqueira Jr 2000). Em contrapartida, estudos de Yesiloy *et al* (1995) e também Siqueira Jr (1998) afirmam haver uma estreita reação entre o menor efeito antibacteriano e diluição da solução.

Deve-se levar em consideração que, apesar de não haver um consenso quanto à concentração utilizada, a solução irrigadora desejável deverá combinar o melhor efeito antibacteriano com o mínimo de toxicidade ao periápice (Spangberg *et al* 1973, *apud* Leonardo 2005).

### **2.3.2 Ácido etilenodiaminotetracético**

O ácido etilenodiaminotetracético é o agente quelante mais utilizado para remoção da matéria inorgânica presente na *smear layer* e também o que apresenta os melhores resultados (McComb & Smith , 1975; Goldman *et al* 1981; 1982). Sabe-se que o uso da combinação do EDTA à solução de hipoclorito de sódio promove melhor limpeza do sistema de canais radiculares do que o emprego da solução de EDTA apenas como irrigante final (Goldman *et al*, 1982; Yamada *et al*, 1983). Tal fato se resume ao efeito complementar do hipoclorito na remoção da matéria orgânica associado ao efeito do EDTA em reduzir em matéria inorgânica.

De acordo com Leonardo (2005), a quelação é um fenômeno físico-químico pelo qual certos íons metálicos são seqüestrados dos complexos dos quais fazem parte para se ligarem à substância quelante, sem que haja uma reação química (Leonardo 2005). Sendo a dentina um complexo molecular contendo íons cálcio, quando submetida à ação do agente quelante, ter-se-á como resultado uma deficiência de íons cálcio, facilitando a sua desintegração.

O EDTA é o agente quelante específico para íons cálcio e, conseqüentemente, para a dentina.

Os estudos sobre o EDTA iniciaram-se por volta de 1953 com Nikiforuck & Sreebny que avaliaram as propriedades químicas de um sal de ácido orgânico fraco, o ácido etilenodiaminotetracético sal dissódico (EDTA), assim como a melhor forma de se utilizar esta solução como agente desmineralizante de tecido duro. A aplicação do EDTA sobre tíbias, fêmures e mandíbulas de ratos com 120 dias de vida determinavam o grau de desmineralização desta solução. A ação do EDTA se dava pela reação de quelação com o cálcio e a capacidade desmineralizante desta solução ampliaria a possibilidade de aplicá-la na instrumentação dos canais radiculares. Os autores afirmaram, ainda, que o PH ideal do EDTA para as descalcificações dentinárias deve ser próximo do neutro, ou seja, 7,5.

Nygaard-Ostby (1957) introduziu o EDTA na Endodontia propondo a instrumentação de canais atresiadados com uma solução de ácido etilenodiaminotetracético sal dissódico (EDTA) capaz de promover a quelação de íons de cálcio da dentina em PH neutro. O EDTA em PH 7,3 é biologicamente compatível com tecidos pulpres e periapicais, daí a justificativa do autor em utilizá-lo. A sugestão é EDTA a 15% em PH 7,3, obtido pela adição de hidróxido de sódio 5 N.

Com base nos estudos de Ostby (1957), Holland *et al* (1973) discorrem sobre a obtenção de uma solução concentrada, o EDTA trissódico, com PH 7,7 e com maior efeito descalcificador sobre a dentina. De acordo com Paiva & Antoniazzi (1988) o EDTA trissódico possui OS igual a 0,6 mol/litro sendo, portanto 600 vezes mais solúvel que o EDTA puro.

O acréscimo de 4 moléculas de NaOH ao ácido diaminotetracético resultou na formação do EDTA tetrassódico. Essa adição de mais uma molécula de NaOH tornou o EDTA uma solução tamponada, de PH 7,5, mais alcalina e capaz de estabilizar o meio (Ohlweiler, 1982). Além do fato de que PH 7,5 ser o ideal para o EDTA seqüestrar os íons cálcio da dentina (Nikiforuck & Sreebny, 1953; MCombs & Smith, 1975).

A ação do EDTA sobre a dentina foi comprovada por Ferh & Ostby (1963) que evidenciaram a capacidade de desmineralização do EDTA e sua proporção ao tempo de aplicação. A aplicação do EDTA na dentina por 5 minutos desmineralizava uma camada de 20 a 30 micrômetros e em 48 horas uma profundidade de 50 micrômetros. Os autores ainda observaram que a camada atingida pelo agente quelante se mostrava bem definida e limitada por uma linha regular de demarcação, demonstrando a autodelimitação, de fundamental importância clínica.

De acordo com Patterson *et al* (1963), a dureza da dentina varia de 25 a 80 na escala Knoop, variando de acordo com a localização, sendo menos dura na junção cementodentinária e próximo à superfície dos canais radiculares. Quando submetida à ação do EDTA, a dureza máxima chega a 1,6 na escala Knoop. A porção dentinária não atingida pelo EDTA mantém sua dureza normal, embora a área adjacente seja menos resistente à abrasão. Os autores afirmam que se o EDTA é deixado no canal por 24 horas, este efeito pode ser mantido por mais 5 dias, apesar de se apresentar com profundidade máxima de apenas 0,28 no quinto dia.

Cohen *et al* (1970) estudaram a eficácia de várias soluções quanto à permeabilidade dentinária e compararam as seguintes soluções: hipoclorito de sódio a 5%, hipoclorito e sódio a 5% e água oxigenada a 3%, peróxido de uréia em glicerina anídrica (Gly-Oxide) mais hipoclorito de sódio a 5% e o creme RC-PREP (EDTA 10% + peróxido e uréia) associado ao hipoclorito e sódio a 5% e, por último, um tensoativo, o Zefirol a 0,1%. Após a instrumentação o corante azul de metileno em solução aquosa a 2% foi introduzido no canal radicular e, com adoção do método Índice de Permeabilidade Dentinária, preconizado por Marshall *et al* (1960), puderam concluir que o uso do RC-PREP associado ao hipoclorito e sódio 5% proporcionou um aumento significativo da evidência da permeabilidade dentinária tanto no terço médio quanto na região apical.

Seidberg & Schilder (1974) estudaram a propriedade autolimitante do EDTA. Eles observaram que, quando uma quantidade excessiva da solução era colocada sobre a dentina, cerca de 73% dos seus componentes inorgânicos eram quelados e que a velocidade da reação era mais rápida na

primeira hora de aplicação, atingindo o equilíbrio em 7 horas aproximadamente. Apesar de existir uma quantidade excessiva de matéria inorgânica, somente uma quantidade proporcional de toda dentina disponível poderia ser quelada quando reagindo com uma quantidade conhecida da solução de EDTA, comprovando sua característica autolimitante.

Alguns produtos apresentam associações com o EDTA. A associação do EDTA 15% ao peróxido de uréia 10% e *Glycol* é a composição do Rc-Prep (Heling et al, 1999). O EDTA compõe-se de EDTA dissódico mais hidróxido de sódio e amônio trimetilcetil (Goldman et al, 1981; 1982) e o Largal Ultra é uma solução alcalina que possui EDTA a 15% (Gutiérrez *et al*, 1982). Também existe o EDTAC, EDTA mais Cetrimide (Abbot et al, 1991) e o EDTA-T, EDTA associado ao tergentol (Zaccaro Scelza, 1998).

Alguns detergentes também são associados ao EDTA. A associação do EDTA a um detergente catiônico, derivado do amono quaternário Cetavlon (REDTA), aumenta o poder bactericida da solução e permite maior difusão do produto acelerando o fenômeno da quelação (Hill, 1959).

Em 1973, Holland *et al*, compararam o efeito de quatro produtos à base de EDTA, sendo eles o Rc-Prep (Premier Products), EDTA Ultra Duradent (Odonto Comercial e Importadora Ltda), EDTAC (Procosol Chemical Co., Inc.) e um produto por eles preparado designado por EDTA. Os produtos testados permaneceram no interior dos canais radiculares por 5, 15 e 30 minutos, e 24 horas. Houve diferença significativa na velocidade de quelação entre os produtos analisados, sendo que o Rc-Prep e o EDTA Ultra Duradent apresentaram a menor ação quelante. O EDTAC e EDTA apresentaram resultados semelhantes. A renovação constante dos produtos à base de EDTA no interior dos canais permitiu a obtenção de maior halo de descalcificação.

Heling *et al* 1999 avaliaram o efeito bactericida do EDTA 15 % e, de acordo com este estudo, ele apresenta um baixo poder antimicrobiano após 10 minutos de atuação, o que está de acordo com os estudos de Orstavik & Hapasalo (1990).



Cauduro (1964) recomendava um tempo de ação mínimo do EDTA sobre a dentina radicular de 15 minutos e Golberg & Spielberg (1982) aconselhavam a aplicação do EDTAC por um tempo mínimo de 5 minutos para que esse agente quelante faça efeito. Cantatore *et al* (1996) observaram que o tempo de trabalho necessário para que o EDTA removesse completamente a *smear layer* foi de 2-3 minutos ou mais, dependendo da irrigação.

Vários foram os estudos para avaliar a capacidade de limpeza dos canais radiculares levando-se em consideração o tempo de atuação e também as soluções associadas ao EDTA (Baumgartner & Mader 1987; Cengiz *et al*. 1990; Takeda *et al* 1999; Di Lenarda *et al* 2000; O'Connell *et al* 2000; Guerisoli *et al* 2002; Menezes *et al* 2003).

Baumgartner & Mader (1987), em estudo de microscopia eletrônica de varredura, verificaram a capacidade de quatro soluções irrigadoras em promover a limpeza dos canais radiculares. Os autores constataram que a camada de *smear layer* está presente na superfície dos canais irrigados com solução salina e com hipoclorito de sódio e que o EDTA é capaz de remover a *smear* e expor os túbulos dentinários. O hipoclorito de sódio foi capaz de remover a polpa remanescente e a pré-dentina das superfícies de canais radiculares não instrumentados, enquanto que o EDTA e a solução salina deixavam polpa remanescente e pré-dentina. Eles concluíram que a combinação de hipoclorito de sódio com EDTA removia completamente a *smear layer* e a polpa remanescente de canais radiculares durante a instrumentação, assim como a polpa e a pré-dentina das superfícies de canais radiculares não instrumentados.

Também Cengiz *et al* (1990) através de microscopia eletrônica de varredura avaliaram a capacidade de remoção da *smear layer* com as seguintes soluções irrigadoras: solução salina, EDTA 15%, EDTA 15% seguido de solução de hipoclorito de sódio a 5,25%. O volume utilizado foi 20 ml de cada solução irrigadora, sendo que para a solução de EDTA 15% seguido de hipoclorito de sódio 5,25% foram utilizados 10 ml de cada solução para que fosse mantida a mesma quantidade de líquido irrigante. De posse dos resultados, assim como nos trabalhos de Baumgartner & Mader (1987), os

autores constataram que a associação da solução de EDTA 15% seguido de hipoclorito 5,25 % proporcionou maior remoção da *smear layer* comparado com a utilização de solução de EDTA apenas.

Takeda *et al* (1999) em estudo comparativo da remoção da *smear layer* utilizaram três soluções irrigadoras: hipoclorito de sódio 5,25% e água oxigenada alternadamente, tendo como solução irrigante final EDTA 17%-G1; ácido fosfórico 6%-G2; ácido cítrico 6%-G3. Avaliaram ainda dois tipos de laser (CO2 laser-G4 e Er: YAG laser-G5) e concluíram, através de análise de microscopia eletrônica, que a irrigação final com EDTA 17%, ácido cítrico e ácido fosfórico 6% não removem completamente a *smear layer* produzida durante a instrumentação do sistema de canais radiculares. Em contrapartida, as soluções ácidas desmineralizam a dentina intertubular ampliando os túbulos dentinários. CO2 e Er: YAG laser foram mais efetivos na remoção da *smear layer* que o EDTA e as soluções ácidas.

Di Lenarda *et al* (2000) compararam *in vitro* a efetividade do ácido cítrico e do EDTA 15% como irrigantes do canal radicular associados ao NaOCl 5%. Em um dos grupos foi realizada instrumentação rotatória com limas de Níquel-Titânio (ProFile taper .04) e no outro instrumentação manual com limas de aço-inox Flexile File. Cada grupo, com instrumentação manual e rotatória, passou por variações quanto à solução irrigadora (EDTA ou ácido cítrico associados ao hipoclorito de sódio), sendo que naquele grupo onde havia apenas o EDTA, este foi o controle. Os autores fizeram uma análise qualitativa e quantitativa por microscopia eletrônica de varredura e perceberam que a solução de 1 mol de ácido cítrico possui uma boa estabilidade química se corretamente utilizada e se apresenta bastante efetiva até mesmo em pequenas aplicações em curto espaço de tempo, o que é compatível com a aplicação clínica, sugerindo este irrigante como viável ao uso clínico. Salientando que em 1964, CAUDURO sugeriu um tempo clínico de 15 minutos para remoção da camada residual.

O'Connel *et al*. (2000) avaliaram a remoção da *smear layer* utilizando diferentes sais de EDTA, ajustados ao PH 7.1, associados ao NaOCl ou HCl. Quando as soluções de EDTA foram associadas a NaOCl 5,25% houve

completa remoção da *smear* nas porções coronal e média dos canais radiculares (análise em MEV), mas não no terço apical. Nenhuma das soluções de EDTA (15% sal alcalino; 15% sal ácido; 25% sal alcalino) usadas isoladamente foi capaz de remover a *smear layer* das paredes dentinárias, independente da região analisada.

Guerisoli *et al* (2002) avaliaram a remoção da *smear layer* comparando EDTAC e hipoclorito de sódio 1% sob agitação ultra-sônica. Três grupos foram instrumentados e irrigados com água destilada – G1; hipoclorito de sódio 1% - G2; hipoclorito associado ao EDTAC –G3. Um quarto grupo não foi instrumentado e apenas irrigado com hipoclorito de sódio 1% associado ao EDTAC. A ação do ultra-som para o grupo 1 e 2 foi de 1 min de agitação com uma lima 15 a 1 mm do ápice; para o grupo 2 e 3, 30 segundos de agitação para o hipoclorito e 30 segundos para o EDTAC. De acordo com a metodologia empregada, os autores observaram que não houve diferença significativa entre os grupos 1 e 2 (água destilada e hipoclorito de sódio apenas). O grupo 3 e 4 foram estatisticamente similares. Concluíram que o hipoclorito de sódio 1% associado ao EDTAC é eficiente na remoção da *smear layer* das paredes dos canais radiculares. Tanto a água destilada quanto hipoclorito de sódio isoladamente não produzem paredes livres de *smear layer*. Em relação aos terços cervical, médio e apical, nenhuma diferença foi encontrada quando analisados separadamente.

Menezes *et al* (2003) indicam o uso do EDTA após a instrumentação dos canais radiculares após avaliarem a remoção da *smear layer* das paredes dos canais irrigados com hipoclorito de sódio 2,5%, gluconato de clorexidina 2% e solução salina associados ou não ao EDTA 17%, totalizando 6 grupos dos 50 dentes humanos com canais únicos. De acordo com os resultados obtidos, em análise de microscopia eletrônica, os autores relataram que tanto clorexidina 2% quanto hipoclorito de sódio 2,5% não são eficazes na remoção da *smear layer*, fato este que muda consideravelmente quando se associam estas soluções ao EDTA. Salientam ainda, que a clorexidina, apesar de ser uma solução com poder antibacteriano, não é capaz de remover matéria orgânica, fator essencial durante a instrumentação dos canais radiculares. Os autores recomendam a solução de clorexidina 2% em casos de pacientes que

possuam alergia à solução de hipoclorito de sódio e enfatizam que este seria realmente a solução de escolha como irrigante. De acordo com a metodologia empregada, concluíram, então, que as soluções avaliadas não se mostraram efetivas na remoção da *smear layer* e que não houve diferença significativa entre as paredes dentinárias dos terços avaliados, exceto para o grupo do hipoclorito de sódio associado ao EDTA com melhor limpeza no terço cervical e, ainda, que o uso do EDTA aumenta significativamente a remoção da *smear layer* quando associado às soluções avaliadas.

Aktener *et al* (1993) e Peters & Barbakow (2000) relacionaram o uso de EDTA ao volume de solução utilizada, semelhante ao que Baker (1975) revelou sobre a influência da quantidade de volume de uma solução utilizada e sua efetividade de limpeza dos canais.

Aktener *et al* (1993) estudaram a efetividade do EDTA e suas associações variando a proporção do etilenodiamino ED (solvente orgânico) assim como o volume de solução utilizada. Para tanto, utilizaram-se: Grupo 1- 10 ml solução salina (controle); grupo 2- 10 ml de quatro partes de EDTA e uma parte de ED; grupo 3- 20 ml de quatro partes de EDTA e uma parte de ED; grupo 4- 10 ml de quatro partes de EDTA e duas de ED; grupo 5- 20 ml de duas partes de EDTA e duas partes de ED; grupo 6- 10 ml de quatro partes de EDTA e três partes de ED; grupo 7- 20 ml de quatro partes de EDTA e três partes de ED. A duração a irrigação nos grupo 1,2,4 e 6 foi de 1 min e nos grupos 3,5 e 7 , de 2 min. Cada canal recebeu a irrigação final com 10 ml solução salina. Os resultados obtidos indicaram os grupos 5, 6 e 7 como os mais eficientes na remoção da *smear layer*, estes grupos apresentaram maior volume de solução (grupos 5 e 7) e maior proporção de solvente orgânico (grupo 6).

Peters & Barbakow (2000) relataram que nenhuma técnica de instrumentação consegue remover completamente todos os debris e toda *smear layer* das paredes dos canais radiculares. Os autores compararam dois tipos de técnicas de instrumentação (Lightspeed LS e Pro-File PF). Utilizaram para o grupo A água como solução irrigadora e para grupo B hipoclorito de sódio 5,25% alternado com EDTA 17%. De acordo com autores, os irrigantes

hipoclorito de sódio- EDTA favorecem a remoção da *smear layer* principalmente nos canais mais ampliados pela instrumentação, onde o volume da solução utilizada foi maior.

A remoção da *smear layer* pelo EDTA foi comprovada por vários autores (Pécora1992; Scelza 2000; Zanato *et al* 2001; Guerisoli *et al* 2002; Menezes *et al* 2003), mas de acordo com Tao *et al.* (1991) o uso do EDTA em canais instrumentados não aumenta significativamente a permeabilidade, apesar de remover a *smear layer* das paredes dentinárias; a justificativa poderia ser a presença da *smear plug* que obstrui a entrada dos túbulos, como já revelaram os trabalhos de Cameron (1983) e Pashley (1992).

Pécora(1992) concluiu que tanto o uso alternado quanto misturado das soluções de Dakin e EDTA 15% promoveu aumento na evidência da permeabilidade dentinária, em comparação com o uso destas soluções de forma isolada. O autor avaliou as soluções de Dakin (hipoclorito de sódio a 0,5%) e de EDTA 15% usadas de forma isolada, alternada e misturadas durante a instrumentação dos canais radiculares. Para cada grupo de solução testada foram utilizados 10 incisivos centrais superiores humanos, recém extraídos. Quando se utilizava a solução isoladamente o volume era equivalente a 10,8 ml da solução testada. No caso de uso alternado, utilizaram-se 5,4 ml de cada solução; quando se misturavam as soluções, a proporção utilizada foi de 1:1, ou seja, 5,4 ml de cada solução perfazendo um total de 10,8 ml. Para se avaliar a permeabilidade o autor utilizou método histoquímico e a quantificação foi feita por análise morfométrica. Além da evidência do aumento da permeabilidade dentinária na presença do EDTA, os autores relacionam os terços radiculares, cervical e médio como os que apresentaram resultados estatisticamente semelhantes entre si e maiores que os índices evidenciados na região apical. Estes resultados são concordante ao trabalho de O'Connel *et al* (2000), os quais afirmaram que todas as soluções dissódicas (alcalinas) e tetrassódica (ácida) quando associadas ao hipoclorito 5,25% foram efetivas na remoção da *smear layer* dos terços coronal e médio, mas não na porção apical.

Scelza (2000) avaliou a capacidade de limpeza das paredes dentinárias dos canais radiculares quando utilizadas as seguintes soluções:

EDTA-T, ácido cítrico e hipoclorito de sódio. Para o trabalho, trinta dentes humanos com raízes retas foram utilizados e instrumentados com lima tipo K-file 45 a 70 para o preparo apical, sendo que 2 ml de hipoclorito de sódio a 1% foram utilizados para irrigação após cada troca de instrumento, atingindo 22ml no total. Depois de instrumentados e divididos em 3 grupos os dentes foram irrigados e aspirados com solução final por 4 minutos (G1: 10ml hipoclorito de sódio 1% + 10ml ácido cítrico 10% + 10ml água destilada); G2: 15ml hipoclorito de sódio 0,5% + 15ml EDTA-T; G3: 10ml hipoclorito de sódio 5,25% + 10ml peróxido de hidrogênio + 10ml hipoclorito de sódio 5,25%). Os autores observaram, por microscopia eletrônica, que em todos os grupos havia maior número de túbulos dentinários expostos na região cervical, seguido pelo terço médio e por fim o apical. Independente do terço radicular, entretanto, houve maior limpeza no grupo 2 (EDTA-T), seguido pelo grupo 1 (ácido cítrico) e 3 (hipoclorito + peróxido hid), sendo o grupo 1 e 2 estatisticamente diferente quando comparado com o grupo 3. O uso de um material solvente orgânico associado a um quelante tem se mostrado altamente eficaz e indispensável, alega os autores.

Zanatto *et al* (2001) estudaram a influência EDTA em relação à remoção da *smear layer* no interior do canal radicular comparando o tempo de permanência desta solução no interior do canal (G1- 2 minutos; G2- 30 segundos; G3- controle) . Os dentes receberam agitação mecânica com broca lentulo durante o período em que a solução esteve no interior do canal. O grupo controle não recebeu nenhum tratamento. Os autores avaliaram que não houve diferença estatisticamente significante entre o tempo de agitação do EDTA com 2 minutos ou 30 segundos, mas ambos se apresentaram mais efetivos em relação ao controle.

Hulsmann *et al* (2003) estudaram o modo de ação e a indicação dos agentes quelantes e soluções utilizadas no tratamento de canal radicular. Os autores fazem um relato das principais características das soluções, e mostram que a eficácia da atuação do EDTA depende do tempo de atuação do mesmo; afirmam também que a possibilidade de danos ao periápice é baixa. A característica antibacteriana do EDTA não é equivalente à do hipoclorito de sódio, o que equivale aos estudos de Heling *et al* (1999), apesar de ser capaz

de potencializar o efeito antimicrobiano do hipoclorito, uma vez que favorece a ação deste nas regiões mais profundas da dentina. A respeito da indicação dos agentes quelantes, os autores fazem algumas conclusões: 1- O preparo biomecânico do canal radicular pode ser realizado com a adição de um agente quelante. Os canais devem primeiramente ser inundados com solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) para dissolver tecido necrótico ou vital; 2- O agente quelante em forma de pasta age como lubrificante no interior do canal e reduz o risco de fratura do instrumento; 3- A solução de hipoclorito de sódio deve ser preferencialmente escolhida para o preparo biomecânico em função de suas propriedades antibacterianas e de dissolução tecidual; 4- O enxágüe do canal com solução de EDTA 17% reduz a extensão da *smear layer* o que resulta na melhor limpeza das paredes do canal radicular e melhor adaptação dos cimentos na obturação dos canais. A ordem na qual se deve utilizar hipoclorito de sódio e EDTA ainda não está bem definida; 5- Agentes que contenham EDTA devem ser utilizados pelo período de 1 a 5 minutos; 6- A solução de EDTA é aplicada na câmara pulpar como auxiliar para se localizar a entrada de canais calcificados; 7- A extrusão apical dos agentes quelantes deve ser evitada.

Lim *et al* (2003) numa avaliação de microscopia eletrônica a respeito da remoção da *smear layer*, realizou um trabalho onde variou a solução irrigadora de três grupos, sendo eles: GA- instrumentação com irrigação de 0,5 ml de NaOCl 1% a cada troca de lima e irrigação final com 10 ml de hipoclorito de sódio a 1%; GB- irrigação com 0,5 ml de hipoclorito de sódio a cada troca de lima e irrigação final com 10 ml EDTA 17%; GC- irrigação com 0,5 ml hipoclorito de sódio 1% intercalado com Glyde File Prep a cada troca de lima e irrigação final com 10 ml de hipoclorito de sódio 1%. Os grupos nos quais se utilizaram o EDTA e Glyde File Prep foram significativamente mais bem limpos comparados com o grupo no qual foi utilizado apenas o hipoclorito. A região apical apresentou-se com mais resíduos, entretanto, nenhuma diferença significativa.

Çalt & Serper *et al* (2002) sugerem que o tempo de aplicação do EDTA não deva se prolongar por mais de 1 min durante o tratamento endodôntico. Os autores afirmam que alterações na dureza e na mineralização

dentinária, assim como na limpeza do canal radicular estão na dependência do tempo de aplicação do EDTA; o que vai ao encontro dos trabalhos de Scelza (2003). E ainda, o EDTA causa mais erosão dentinária que as soluções de EGTA - ethylene Glycolbis (beta- aminoethyl ether)- N,N,N',N'- tetracetic acid (Çalt & Serper, 2000).

Em relação à alteração dentinária pela ação do EDTA, Ciucchi (1989) observou que a própria instrumentação produziria uma nova *smear layer* a cada toque da lima à dentina, havendo, então, sucessiva necessidade da ação do agente quelante. Os autores questionaram a utilização do EDTA, já que sempre haveria a formação da *smear layer* e a consequente utilização do agente quelante, o que pode acarretar danos à dentina. Eles questionam até que ponto o clínico deve selar o canal radicular após a irrigação feita apenas com hipoclorito de sódio, sabendo que há a *smear layer* nas paredes do canal; ou hipoteticamente usar o EDTA e acreditar que se removeu a *smear layer*, o que nem sempre ocorre de acordo com os autores, além de poder gerar danos à dentina.

Scelza *et al* (2003) compararam o efeito quelante das soluções de EDTA-T (EDTA 17% + éter lauril sulfato de sódio 1,25%), ácido cítrico e EDTA 17%. Foram utilizados 90 dentes caninos humanos instrumentados e divididos em 9 grupos de acordo com a solução utilizada e com a variação de tempo para aplicação da mesma (3, 10 e 15 minutos), sendo o volume utilizado para todos os grupos foi de 20 ml. A análise da concentração do cálcio foi feita por um espectroscópio de absorção e de posse dos resultados os autores concluíram que a solução de ácido cítrico apresentou maiores valores de remoção dos níveis de cálcio na dentina em 3,10 e 15 minutos, sendo que não houve diferença significativa entre esta solução e o EDTA 17%, entretanto EDTA-T se revelou significativamente menos eficaz que o ácido cítrico. O aumento da ação quelante do EDTA 17% nos tempos 3, 10 e 15 minutos não foi significativa, concluindo-se que o EDTA 17% não é uma solução tempo-dependente, diferente da solução de ácido cítrico. Entretanto, em termos de eficácia, estas duas soluções se mostraram equivalentes, podendo, ambas, serem indicadas como agentes quelantes. Os autores relatam que a



desmineralização, a dureza e a limpeza dentinária estão na dependência do tempo de ação do EDTA.

Lui *et al* (2007) realizaram um trabalho no qual avaliaram o EDTA, o hipoclorito de sódio (NaOCl 1%) e Smear Clear (EDTA + agente umectante) quanto à remoção da *smear layer*, associando-os ao ultra-som. De acordo com os autores o EDTA associado ao ultra-som promove mais adequada limpeza dos canais e afirmam ser uma técnica clinicamente aplicável. Já o Smear Clear não mostrou resultados melhores que o EDTA usado sozinho, o que significa que adicionar um agente umectante ao EDTA não altera a efetividade do mesmo. Os autores alertam que em relação à região apical, onde existem curvaturas e complexidades anatômicas, maiores estudos são necessários.

Uma nova solução foi sugerida por Torabinejad (2003), o MTAD. Sua constituição é uma mistura de tetraciclina isômera, ácido cítrico e um detergente aniônico chamado Tween 80. Estudos de Shabahang *et al*, (2003) evidenciaram que, além da capacidade antibacteriana, o MTAD possibilita a remoção da camada de *smear layer*. Torabinejad *et al* (2003) comparou o EDTA 17% com a solução de hipoclorito de sódio 5,25% e a solução de MTAD e demonstraram que o MTAD remove a camada residual e não altera a estrutura dos túbulos dentinários como o EDTA, considerando que os canais foram irrigados com o hipoclorito de sódio seguidos da irrigação final com o MTAD. A questão da manutenção da estrutura dentinária também foi levantada por Grande, *et al*. 2006, Merending, *et al* 2007; Sayig *et al*. 2007; De Deus *et al* (2008).

Grande *et al*. 2006, avaliaram a interação do EDTA com o hipoclorito de sódio por análise de ressonância magnética nuclear. Os autores explicam que a excessiva desmineralização da dentina pode criar dificuldades na adaptação dos materiais seladores às paredes dos canais e relatam que o volume de EDTA utilizado é menos importante que o tempo de atuação do mesmo. O uso combinado do hipoclorito e EDTA causa a oxidação das moléculas de EDTA em tempo progressivo e este efeito complementar resulta na profunda erosão dos túbulos dentinários. E ainda, indicam a redução do tempo de uso e da concentração do EDTA, já que utilizar apenas o hipoclorito

de sódio na limpeza dos canais não é suficiente, mas não seria justificado o uso do hipoclorito de sódio após a aplicação do EDTA.

Nos estudos de Marening *et al* 2007 em relação ao impacto das soluções irrigadoras nas propriedades da dentina, os autores analisaram a questão da aplicação do EDTA após o uso da solução de hipoclorito em suas várias concentrações (1 a 5%) e as tendências de se associar as duas soluções, sendo a irrigação final com hipoclorito de sódio ao invés do EDTA. Ao aplicar o EDTA antes do hipoclorito a matriz orgânica é exposta, tornando-a vulnerável à ação do hipoclorito de sódio, podendo causar, inclusive fraturas radiculares. Os autores sugerem um tempo de 3 minutos para aplicação seqüencial do hipoclorito e EDTA; e o uso da água destilada entre a aplicação destas soluções.

Sayin *et al*. 2007, avaliaram a perda de cálcio da dentina após a irrigação dos canais com as seguintes soluções: NaOCl, EDTA, EGTA, EGTA + NaOCl, Tetraciclina, EDTA + NaOCl, EGTA + NaOCl, EGTA + NaOCl, Tetraciclina + NaOCl e água destilada. As soluções de EDTA e EDTA associado ao NaOCl apresentaram os maiores valores de perda de cálcio nos tempos de 1 e 5 minutos de aplicação. Os autores concluíram que quando o EDTA é usado de forma isolada, a matriz orgânica é o fator limitante na dissolução dentinária, uma vez que existe o acúmulo desta matriz na superfície das paredes. A subsequente aplicação do NaOCl, por remover a matriz orgânica, facilita a exposição do material inorgânico que sofrerá ação do EDTA; aumentando a desmineralização da dentina. Os autores enfatizam a necessidade de novos estudos para avaliar a capacidade seladora dos cimentos em relação a essa perda de cálcio.

De Deus *et al* ( 2008) testaram quantitativa e longitudinalmente dois agentes quelantes, EDTA 17% e HEBP (etidronato) 9% e 18% através do uso de modelos comparativos de raízes únicas. O EDTA removeu a *smear layer* em 60 segundos enquanto o HEBP, em 300 segundos. E mais, assim como os trabalhos de Baumgarter & Mader (1987), o uso do EDTA e do NaOCl causaram uma dissolução progressiva da dentina e expansão das áreas peri e intertubulares. Os autores alertam para este fator de dissolução dentinária,

alegando que as alterações podem afetar o selamento apical e a resistência da dentina.

Baumgartner *et al* (2007) avaliaram a eficácia do hipoclorito de sódio 1,3% associado ao Bio/Pure MTAD e do Hipoclorito de sódio a 5,25% associado ao EDTA quando irrigantes do canal radicular. De acordo com os autores o MTAD (mistura de isômero da tetraciclina, ácido e detergente) tem capacidade de remover a *smear layer*, desinfetar os canais radiculares e possivelmente erradicar o *E. Faecalis*, quando utilizado com o NaOCl ao final da irrigação dos canais. Entretanto, os autores concluíram que a associação do EDTA e NaOCl 5,25% foi mais efetiva contra o *E. faecalis* quando comparado com a associação do MTAD e NaOCl 1,3%, a qual permitiu a permanência de 50% de contaminação dentro dos canais radiculares.

A avaliação do MTAD e do EDTA quanto à infiltração bacteriana foi analisada por Ghodduzi *et al* (2007). Os autores concluíram que tanto o EDTA quanto o MTAD são mais eficazes que o NaOCl quanto à remoção da *smear layer* e redução da infiltração bacteriana, mas nenhuma diferença entre os mesmos foi observada.

Sobre os métodos de análise da permeabilidade dentinária, citam-se trabalhos de Marshal *et al*, 1960; Anderson & Ronning 1962; Pécora 1985; Zuolo *et al*. 1987; Pécora *et al* 1987; 1990; Prokopowitsch *et al*. (1989).

Marshall *et al* (1960) estudaram a permeabilidade dentinária utilizando para o experimento quatro grupos de amostras a saber: Grupo 1- formado por dentes controle que não receberam a instrumentação mecânica. Neste grupo as polpas foram removidas com extirpa nervo e os ápices selados com cera. Grupo 2- dentes que receberam instrumentação mecânica do canal radicular e água corrente para irrigação. Grupo 3- composto por dentes que receberam tratamento químico-mecânico, ou seja, instrumentados com auxílio de soluções irrigadoras- EDTA (Nygaard-Ostby, 1957), soda clorada 5,25% alternada com água oxigenada 3% (Grossman, 1943), nitrato de prata amoniacal (Howe, 1917) e solução aquosa de ácido sulfúrico neutralizada após um minuto por ação do bicarbonato de sódio (Callahan, 1894). Grupo 4- dentes que receberam instrumentação com auxílio de água oxigenada % (3ml, 5min);

soda clorada 5,25% (3ml, 5min); nitrato de prata amoniacal (1min); ácido sulfúrico (1 min) e eugenol (5 min). A permeabilidade foi indicada pelo uso de radioisótopos S35, NA22, I131 e P32, soluções marcadas de sulfato de sódio, cloreto de sódio, iodeto de sódio isotônico e fosfato de sódio, respectivamente. Os autores concluíram que as regiões cervical e média da dentina radicular são as mais permeáveis a todos os isótopos utilizados, enquanto que a região apical se mostrou altamente impermeável. Admitiram ainda, que a junção dentino-cementária atua como barreira à infiltração dos isótopos e que as soluções de EDTA, eugenol e bicarbonato de sódio diminuíram a permeabilidade dentinária aos radioisótopos. Com este trabalho foi possível formular o Índice de Permeabilidade Dentinária (IPD), parâmetro para avaliar matematicamente os níveis de permeabilidade das paredes dentinárias do canal radicular, utilizado, por exemplo, por Cohen *et al* (1970).

Anderson & Ronning (1962) avaliaram a permeabilidade dentinária através da obtenção de cortes da coroa por instrumentos rotatórios e por fratura da coroa. Nos cortes obtidos por instrumentos rotatórios havia menor penetração de corante em relação aos cortes obtidos por fraturas. Os autores esclarecem que a presença de debris nas secções dentinárias obtidas por instrumentos rotatórios impede uma maior infiltração dos corantes nos canalículos dentinários.

Pécora(1985) num estudo da permeabilidade dentinária utilizou-se de 55 dentes caninos humanos extraídos os quais foram divididos em 11 grupos que receberam o mesmo tratamento de instrumentação baseado na técnica de Schilder (1974). Cada grupo recebeu uma solução irrigadora a saber: Grupo 1: ácido cítrico 10%; Grupo 2: Tergentol- furacin; Grupo 3: solução controle, PH 7,0; Grupo 4: água PH 6,3; Grupo 5: EDTA; Grupo 6: RC-PREP associado à soda clorada; Grupo 7: soda clorada; Grupo 8: solução de Milton; Grupo 9: líquido de Dakin; Grupo 10: soda clorada associada à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e Grupo 11: ENDO-PTC associado ao Líquido de Dakin. O estudo da permeabilidade foi realizado através de cortes transversais com adoção de método histoquímico proposto por Roselino (1983) e a quantificação dos níveis de permeabilidade foi realizada por meio de análise morfométrica. De posse dos resultados, concluiu-se que as soluções halogenadas e a de EDTA foram as que mais aumentaram a evidência da permeabilidade dentinária.

Zuolo *et al.* (1987) estudaram o efeito do EDTA e sua associação com tensoativos aniônicos e catiônicos na permeabilidade da dentina radicular de incisivos superiores humanos extraídos, e também utilizaram o método histoquímico de Roselino (1983) para avaliar a permeabilidade dentinária radicular. A associação mais eficiente na promoção do aumento da permeabilidade foi a de EDTA associado a um com tensoativo cationico (EDTAC).

Pécora *et al* (1987) apresentaram novamente o método histoquímico para quantificar a permeabilidade dentinária radicular utilizando técnica morfométrica em 55 dentes que foram divididos em 11 grupos, cada qual instrumentado pela técnica preconizada por Schilder (1974), variando para cada grupo a solução irrigadora utilizada. Após a instrumentação, os dentes foram secos e submetidos ao processo histoquímico, ou seja, imersos em soluções de sulfato de cobre 1% e posteriormente de ácido rubeânico 1%. O próximo passo seria o corte dos dentes em fatias de 1 a 1,5 micrômetros, sendo que para cada secção, coronal, média e apical, utilizaram-se 2 cortes de cada área para serem incluídos e avaliados, por análise morfométrica, em microscópio óptico. A área pigmentada pelos reagentes foi quantificada. Os autores concluem ser este um método eficiente para a análise da permeabilidade dentinária.

Prokopowitsch *et al* (1989) analisaram as possíveis variações da porcentagem de penetração dentinária radicular do corante azul de metileno no terço apical em cinquenta dentes humanos extraídos. Os dentes foram instrumentados manualmente, utilizando-se como coadjuvante as seguintes soluções irrigadoras: soro fisiológico, Tergentol -Furacin , hipoclorito de sódio a 1,0 por cento (solução de Milton), Endo-PTC e EDTA-T (ácido etilenodiaminotetracético associado ao Tergentol ). Após, os dentes foram seccionados no sentido longitudinal para avaliação do grau de infiltração. Dentro das condições experimentais estabelecidas, os autores concluíram que não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores das médias de penetração do corante em relação à hemissecção do terço apical, entre a associação de Tergentol e Furacin e o EDTA-T, como também entre o Endo-PTC e o EDTA-T.

O EDTA quela vários íons metálicos, entre eles  $Pb^{++}$ ,  $Cu^{++}$ ,  $Zn^{++}$ ,  $Co^{++}$ ,  $Ni^{++}$ ,  $Al^{++}$ ,  $Cd^{++}$ ,  $Sn^{++}$ ,  $Ca^{++}$ ,  $Sr^{++}$ ,  $Ba^{++}$ ,  $Mg^{++}$ ,  $Bi^{++}$ ,  $Fe^{++}$  (VOGEL, 1981) e o níquel identifica-se facilmente, por meio de uma reação química com dimetilglioxima (Feigl, 1958). Roselino & Minelli (1969) adaptaram a reação de Feigl (1958) para detectar íons níquel em métodos de infiltração marginal utilizados em Odontologia. Pécora *et al.* (1990) modificaram esse método para que se pudesse verificar a quelação de íons níquel no interior dos canalículos dentinários e verificaram que os íons níquel são quelados tanto pela solução de EDTA como pela associação 1:1 da solução de EDTA + solução de Dakin. Por meio dessa simples reação química, pode-se observar que a solução de Dakin (pH 9,0) não inativa a ação quelante da solução de EDTA (pH 7.3). Mesmo com o aumento de pH, a quelação se processa.

Em relação ao uso de dentes bovinos nas pesquisas para se avaliar a permeabilidade dentinária, trabalhos de Slutzky- Goldberg *et al.*, 2004; Okino *et al.* 2004, Santos *et al.*, 2006 revelam que, além da similaridade com a estrutura dentinária do dente humano, existe a facilidade de acesso e coleta dos mesmos, além da possibilidade de padronização da maturação do tecido dentário e do menor risco de transmissão de doenças infecciosas.

## **3. PROPOSIÇÃO**

---

### **3.1. OBJETIVO GERAL**

Avaliar a permeabilidade dentinária em toda extensão dos canais radiculares, por meio de um método histoquímico e morfométrico, com aplicação do NaOCl 1% e 5,25% associado ou não ao EDTA.

### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1- Comparar os níveis de penetração do corante entre as regiões cervical, média e apical.

2- Comparar a permeabilidade dentinária entre as substâncias utilizadas (NaOCl 1%, NaOCl 5,25%, NaOCl 1% + EDTA, NaOCl 5,25% + EDTA, controle).

## 4. MATERIAL E MÉTODO

---

### 4.1. Coleta e seleção dos dentes

Foram selecionados, por meio de critério de padronização anatômica radicular, 50 dentes incisivos inferiores unirradiculares, de animais adultos, bovinos, coletados em frigorífico com inspeção de vigilância sanitária. Os dentes foram limpos com curetas periodontais, armazenados em solução tamponada de timol a 0,2% (Biopharma, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil), mantidos em refrigeração a 9°C até o momento de uso. Antes da instrumentação os dentes foram lavados em água corrente por 24 h para remoção dos traços de timol. Em seguida, foram submetidos à profilaxia com pedra pomes (Vigodent, RJ, Brasil) e água e armazenados em água destilada sob refrigeração a 4°C .

### 4.2. Preparo dos dentes e divisão dos grupos Experimentais

Depois de lavados, os dentes foram seccionados transversalmente a 17 mm do ápice radicular com discos diamantados de dupla face (KG Sorensen, São Paulo, Brasil) sob jato de água constante. Posteriormente, foram secos e impermeabilizados com duas camadas de cianocrilato (Super-Bonder, Loctite, Brasil Ltda) e analisados em lupa para melhor avaliação da impermeabilização dos mesmos. Em seguida, divididos em 5 grupos:

G1- NaOCl 1%

G2- NaOCl 5,25%

G3-NaOCl 1% + EDTA

G4-NaOCl 5,25% + EDTA

G5-Água destilada (grupo controle)



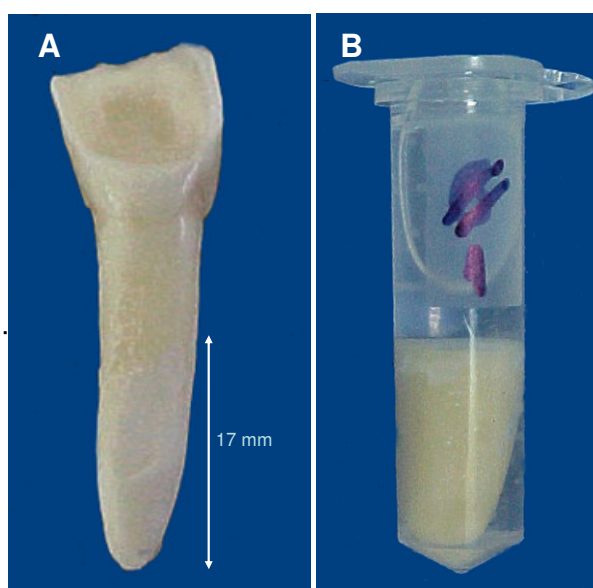


Figura 1: A. Incisivo inferior bovino, secção apical promovendo um remanescente de 17 mm; B. Raiz seccionada acondicionada em frasco contendo água destilada

### 4.3. Preparo químico-mecânico do canal radicular

#### 4.3.1. Técnica de instrumentação

O comprimento real de trabalho para cada raiz foi definido visualmente com a lima tipo K # 15 (Dentsply –Malleifer, Ballaigues, Suíça), a partir do recuo de 1 mm após atingir o forame apical. A lima inicial foi aquela que se adaptou ao diâmetro anatômico do canal quando medida no comprimento real de trabalho. Para a instrumentação seguiu-se os princípios de limpeza e modelagem preconizados por SCHILDER (1974). Os dois terços dos canais foram inicialmente preparados com lima tipo Kerr de diâmetro compatível com a espessura do canal até aproximadamente até 13 mm de comprimento. Posteriormente com o uso de brocas *Gates Glidden* (Mailleffer, Ballaigues, Suíça) - GG# 5 (usada na embocadura do canal), #4 (até 5 mm), GG # 3 (até 8 mm) e GG # 2 (até 12mm) - promoveu-se o alargamento e preparo inicial dos terços cervical e médio (Goerig, 1982). O terço apical foi instrumentado progressivamente até a lima K # 60 (instrumento memória)

estabelecendo-se o batente apical, a partir do qual foi realizado o escalonamento progressivo até a lima K # 80. A lima inicial para realização do batente apical variou entre *kerr* # 30 e 35 e a irrigação do canal radicular foi realizada de acordo com a metodologia de cada grupo.

### **4.3.2. Irrigação dos canais radiculares**

Grupo 1- NaOCl 1%. Para a irrigação do canal foi utilizado solução de hipoclorito de sódio a 1% durante toda a instrumentação sendo que a cada troca de lima a solução era renovada por meio de aspiração e o conduto irrigado com 1ml desta solução. Em seguida, foi realizada uma irrigação final com 10ml de água destilada, volume equivalente ao que foi utilizado durante toda a instrumentação com o hipoclorito de sódio a 1%.

Grupo 2- NaOCl 5,25%. Foi realizada a irrigação com solução de hipoclorito de sódio a 5,25%, utilizando-se também 1ml de solução a cada troca de lima renovando-a mediante aspiração e nova irrigação. Em seguida foi realizada a irrigação final com 10 ml de água destilada, equivalente ao volume total utilizado durante toda a instrumentação com o hipoclorito de sódio a 5,25%.

Grupo 3- NaOCl 1% + EDTA. A irrigação do canal foi realizada com solução de hipoclorito de sódio a 1% durante toda a instrumentação, renovando-a com 1ml desta solução, mediante aspiração e nova irrigação a cada troca de instrumento, perfazendo um total de 10 ml de solução utilizada durante a instrumentação com hipoclorito de sódio a 1%. O canal foi irrigado com 10 ml de água destilada e seco com pontas de papel absorventes. Em seguida, foi preenchido plenamente com 1 ml de solução de solução EDTA a 17%, onde este permaneceu durante 5 minutos em contato com as paredes do canal. Inicialmente foi realizada leve agitação com a lima K # 60 (memória). Posteriormente, foi realizada a irrigação final com 10 ml de água destilada.

Grupo 4- NaOCl 5,25% + EDTA. A irrigação do canal foi realizada com a solução de hipoclorito de sódio a 5,25% durante toda a instrumentação, renovando-a com 1ml desta solução, mediante aspiração e nova irrigação a

cada troca de instrumento, perfazendo um total de 10 ml de solução utilizada durante a instrumentação com hipoclorito de sódio a 5,25%. O canal foi irrigado com 10 ml de água destilada e seco com pontas de papel absorventes. Em seguida, foi preenchido plenamente com 1 ml de solução de solução EDTA a 17%, onde este permaneceu durante 5 minutos em contato com as paredes do canal. Inicialmente fez-se leve agitação com o uso da lima K # 60 (memória). Posteriormente, foi realizada a irrigação final com 10 ml de água destilada.

Grupo 5- Água destilada (controle). A irrigação do canal foi realizada com solução de água destilada renovando-a mediante aspiração e irrigação, sendo que se utilizou 1 ml de solução a cada troca de instrumento, perfazendo um total de 10 ml de solução utilizada durante toda a instrumentação. Foi feita também a irrigação final com mais 10 ml de água destilada.

Os canais foram irrigados com seringa BD Plastipak 20 x 5,5, sendo posicionada o mais próximo possível do comprimento real de trabalho sem que houvesse o travamento dentro do canal, mantendo-o sempre preenchido com a solução irrigadora.

#### **4.4. Preparo das amostras**

##### **4.4.1. Reação histoquímica**

O cátion, indicador da profundidade do nível da permeabilidade é dado pelo *cobre* da solução aquosa de sulfato de cobre a 1% e o revelador da presença do *cobre* foi dado pela complexação do *ácido rubeânico* de uma solução alcoólica a 1%, reagentes preconizados por Feigl (1958). A técnica de Feigl (1958), que preconiza esses reagentes, foi modificada por Roselino (1983), em função da natureza própria do experimento e utilizada por Pécora(1985, 1987).

O preparo das soluções foi feito da seguinte maneira:

1- Preparação da solução de sulfato de cobre: 10 g de sulfato de cobre foram dissolvidos em 100 ml de água destilada deionizada. Nesta solução, adicionaram-se 25 ml de hidróxido de amônio a 25%.

2- Preparação da solução alcóolica de ácido rubeânico: 1g de ácido rubeânico foi dissolvido em 100 ml de álcool etílico.

Para a pesagem dos produtos químicos, foi utilizada uma balança eletrônica CG Libror 3200H, de procedência nacional.

Inicialmente os cinco dentes já instrumentados que compunham determinado grupo foram imersos separadamente em um frasco enumerado que foi preenchido com a solução de sulfato de cobre a 10%. Os frascos foram colocados num recipiente para aplicação de vácuo por 5 minutos, com o objetivo de remover o ar contido no interior do canal radicular e aumentar o contato da solução com as paredes dentinárias. Após aplicação do vácuo, os dentes eram mantidos no mesmo recipiente, que permanecia fechado, por mais 25 minutos, perfazendo um total de 30 minutos na solução de sulfato de cobre 10%.

A seguir os dentes eram removidos da solução, secos com toalhas de papel absorvente e a solução presente no interior do canal era removida com cones de papel absorvente. Imediatamente, em outro frasco semelhante ao primeiro, as amostras foram adicionadas à solução alcóolica de ácido rubeânico. Tanto o tempo de aplicação do vácuo quanto o tempo de atuação do revelador (ácido rubeânico) sobre as raízes foram iguais aos utilizados para a solução de sulfato de cobre.

A reação da solução de sulfato de cobre com a solução de ácido rubeânico faz surgir uma forte coloração na estrutura da dentina que vai do azul intenso até a coloração preta, dependendo da concentração dos íons cobre.

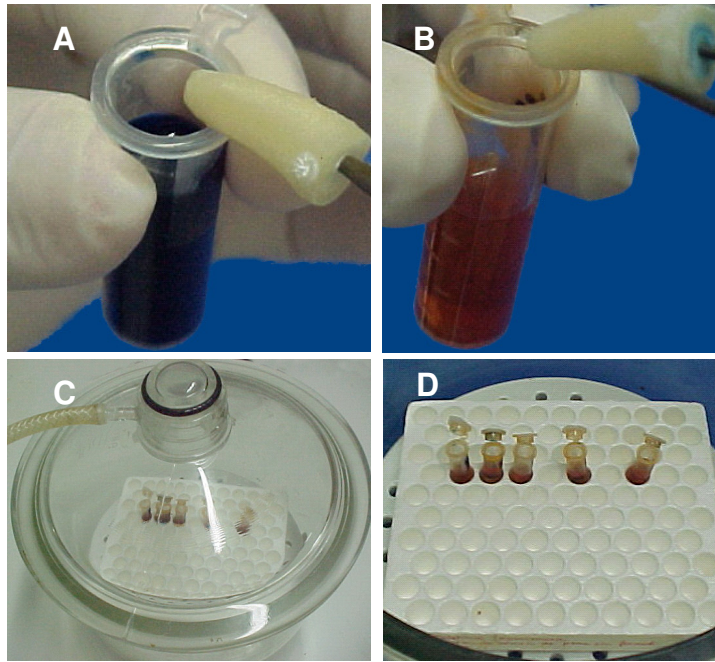


Figura 2: A. Dente sendo imerso na solução de sulfato de cobre; B. Dente sendo imerso na solução de ácido rubeânico; C. Dentes imersos em ácido rubeânico no interior da câmara de vácuo por 5 minutos; D. Dentes mantidos por mais 25 minutos em contato com o ácido rubeânico.

#### 4.4.2. Obtenção dos cortes das regiões apical, média e Cervical

Após a instrumentação e a realização do método histoquímico, foi realizada secção transversal das raízes com o uso de uma cortadeira de precisão, com velocidade de corte calibrada em 200 RPM. Assim seriam obtidos os cortes de toda a extensão da raiz.

Para proceder a esta operação, os dentes preparados foram presos a uma placa de acrílico com o uso de cianocrilato gel (super Bonder) e esta placa se prendia firmemente ao braço da cortadeira (Isomet 1000, Buehler, Lake Bluff, IL, USA). O movimento do braço permitia o contato da raiz com o disco diamantado (4" x 0,12 x 0,12, Extec, Enfield, CT, USA) que a seccionava transversalmente, obtendo-se cortes de 100 a 150 micrômetros de espessura,

com superfícies lisas e paralelas, num total de aproximadamente 16 a 18 secções. Para prevenir a queima da dentina durante a secção das raízes, um jato de água fria era direccionado na superfície do corte. Os cortes foram seleccionados por dois operadores. Dividindo-se toda a extensão da raiz em três áreas (cervical, média e apical), a critério de padronização, foram escolhidas as três amostras localizadas mais centralmente em relação a cada terço, perfazendo um total de 9 cortes seleccionados para cada raiz.

Completada esta etapa, as amostras seleccionados eram desidratadas em álcool ascendente 70°, 80°, 96° e 100%, por um período de duas horas em cada e, depois, clarificados em xilol (3 banhos) e montados em lâminas de vidro com Entellan (MERCK). Após o endurecimento do Entellan, os cortes foram examinados microscopicamente, a fim de observar, com ampliações variáveis, se apresentaram as transparências das áreas coradas e não coradas. Cada lâmina recebeu a identificação de acordo com a solução irrigante utilizada para posterior avaliação quantitativa dos níveis de permeabilidade dentinária.

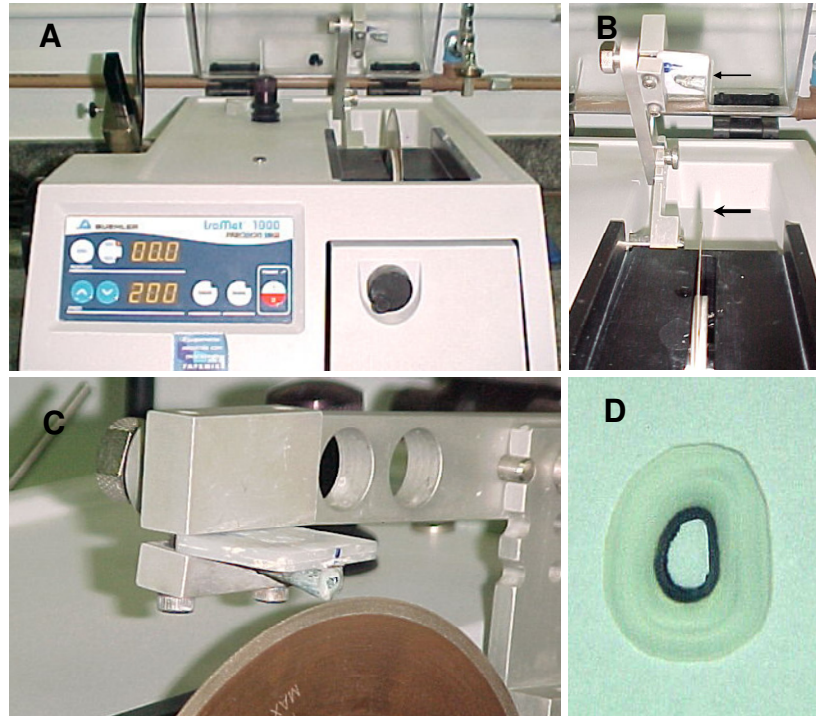


Figura 3- A. vista da maquina Isomet 1000 para corte de tecido duro; B. dente fixado para o corte (seta fina) e disco (seta grossa); C. raiz em posição de corte e D. secção transversal da raiz.

### 4.4.3. Análise Morfométrica

A avaliação dos cortes transversais de cada terço das raízes estudadas foi realizada de forma padronizada e por um único operador. Utilizou-se o microscópio Toolmaker's (Mitutoyo Corporation), em um aumento de 40x.

Para critério de organização das medidas a serem obtidas, cada corte foi posicionado e avaliado seguindo-se um padrão de organização vestibular, lingual, mesial e distal. Sobre a imagem do corte, uma linha imaginária foi traçada no sentido vestibular e lingual e outra no sentido mesial e distal (figura 4). A área de pigmentação do corante (P), correspondente à área escura próxima à luz do canal, foi mensurada e as medidas anotadas numa tabela (tabela 1- anexo) para posterior análise estatística. Formam obtidas quatro medidas de cada secção num total de 12 medidas por terço analisado.

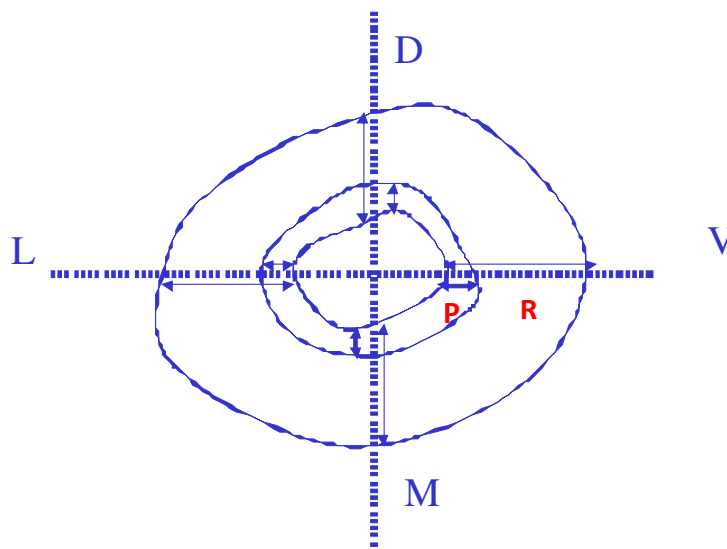


Figura 4 - Esquemática do corte a ser analisado a partir do qual serão obtidas as medidas de pigmentação (P) do corante para vestibular, lingual, mesial e distal, considerando a espessura dentinária (R).

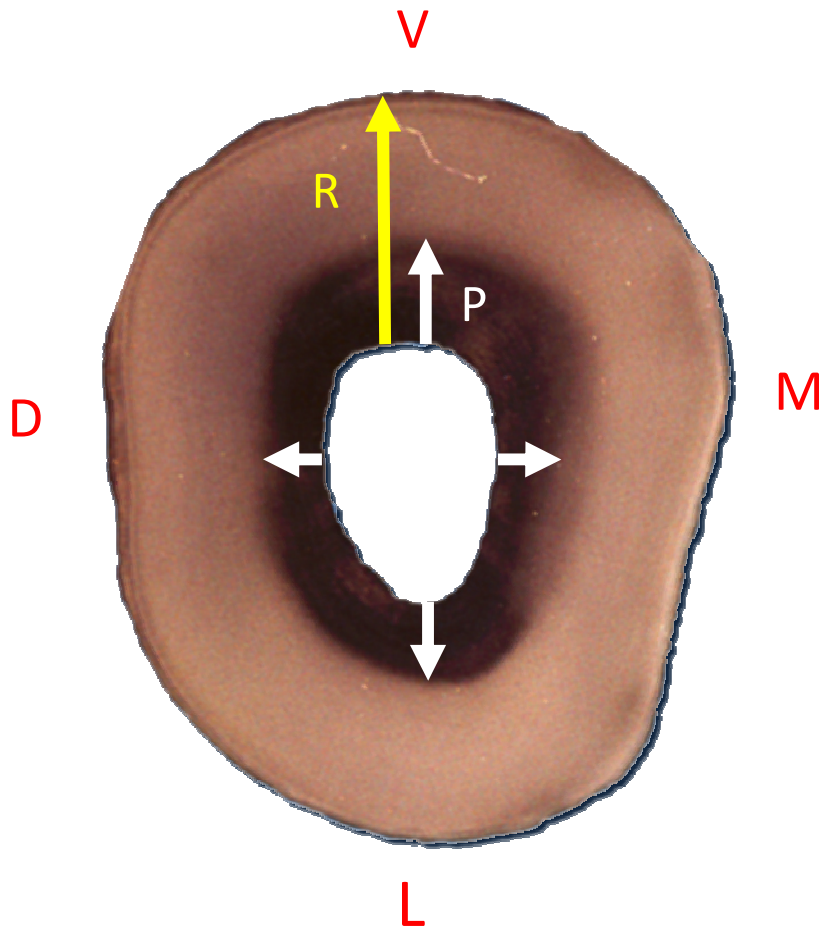


Figura 5 - Imagem do corte a ser analisado a partir do qual serão obtidas as medidas de pigmentação (P) do corante para vestibular (V), lingual (L), mesial (M) e distal (D), considerando a espessura dentinária (R).

**Tabela 1- ANEXO -** Valores (mm), dos níveis de infiltração nas secções representativas dos terços radiculares cervical, médio e apical em quatro medidas por secções, nas faces vestibular (V), lingual (L), mesial (M) e distal (D), dos grupos 1 a 10, após irrigação dos canais radiculares com hipoclorito de sódio a 1% e a 5%, hipoclorito de sódio a 1% e 5% + EDTA e água destilada (grupo controle).



## 5 RESULTADOS

---

Os dados experimentais desse trabalho consistiram em 1800 valores numéricos resultantes das medidas das penetrações na dentina cervical, média e apical, sendo estes resultados dados em milímetros. Os valores representam o cálculo da penetração do complexo rubeanato de cobre na dentina.

Na análise realizada consideraram-se os seguintes fatores:

- 1- Comparação dos níveis de penetração em função das regiões estudadas, em número de três: cervical, média e apical.
- 2- Comparação do nível de permeabilidade, referente às soluções utilizadas (NaOCl 1%, NaOCl 1% + EDTA, NaOCl 5,25%, NaOCl 5,25% + EDTA, Controle);

O experimento fatorial originalmente era composto por uma amostra populacional de todas as variáveis envolvidas (dez dentes, cinco soluções, três regiões e doze leituras), dando o produto de  $10 \times 5 \times 3 \times 12 = 1800$ , valores do número de leituras realizadas.

As medidas obtidas diretamente do microscópio foram distribuídas numa tabela (tabela 1- Anexo) referente às medidas da penetração na dentina de três cortes selecionados de cada região (cervical, média e apical) dos cinco grupos analisados (NaOCl 1%, NaOCl 1% + EDTA, NaOCl 5%, NaOCl 5% + EDTA, Controle), sendo que para cada área cervical, média ou apical foi feita uma medida relacionada à vestibular, à lingual, à mesial e à distal. A partir dessa tabela foi feita a média (TABELA 2) para cada doze medidas referentes aos valores cervicais, doze dos valores mediais e doze apicais, de todas as amostras de cada grupo.

**Tabela 2** - Médias das medidas obtidas das áreas pigmentadas dos corpos de prova tratados com NaOCl 1% (G1), NaOCl 5% (G2), NaOCl 1% + EDTA (G3), NaOCl 5% + EDTA (G4) e um grupo controle (G5).

C A S O	T E R Ç O	Tratamento				
		Naocl 1% (G1)	Naocl 5% (G2)	Naocl 1% + EDTA (G3)	Naocl 5% + EDTA (G4)	Controle (G5)
		Média				
1	C	0,633333	0,529167	0,533333	0,3975	0,35
	M	0,924167	0,5025	0,4375	0,175833	0,276667
	A	1,008333	0,4825	0,400833	0,106667	0,156667
2	C	0,380833	0,37	0,609167	0,178333	0,364167
	M	0,025833	0,124167	0,126667	0,034167	0,009167
	A	0,026	0,035	0,028333	0,031667	0,01
3	C	0,01	0,4975	0,614167	0,395833	0,4325
	M	0,009167	0,0975	0,026667	0,184167	0,025
	A	0,003333	0,000833	0,011667	0,025833	0,005833
4	C	0,5425	0,721667	0,7625	0,495	0,22
	M	0,096667	0,0125	0,525	0,265	0,023333
	A	0,014167	0,009167	0,1325	0,0025	0,006667
5	C	0,646667	0,721667	0,578333	0,824167	0,6075
	M	0,380833	0,465	0,470833	0,335833	0,4575
	A	0,023333	0,225	0,500909	0,018333	0,371667
6	C	0,819167	0,884167	1,284167	0,555	0,804167
	M	0,7875	0,67	0,675	0,253333	0,6675
	A	0,3125	0,164167	0,398333	0,101667	0,005
7	C	0,670833	0,964167	0,5275	0,858333	0,755
	M	0,398333	0,355	0,45	0,5775	0,5725
	A	0,160833	0,2325	0,16	0,2	0,134167
8	C	0,330833	0,340833	0,46	0,251667	0,274167
	M	0,28	0,293333	0,3775	0,069167	0,065833
	A	0,020833	0,276667	0	0	0
9	C	0,155	0,3225	0,360833	0,298333	0,195
	M	0,12	0,280833	0,14	0,3	0,015833
	A	0,0675	0,053333	0,0275	0,2325	0,0125
10	C	0,346667	0,2875	0,265833	0,341667	0,266667
	M	0,450833	0,273333	0,298333	0,128333	0,106667
	A	0,37	0,501667	0,289167	0,039167	0

Na figura 6 observar as secções de dois casos correspondentes um ao grupo controle e o outro a um grupo experimental, demonstrando a presença do corante infiltrado nas paredes do canal.

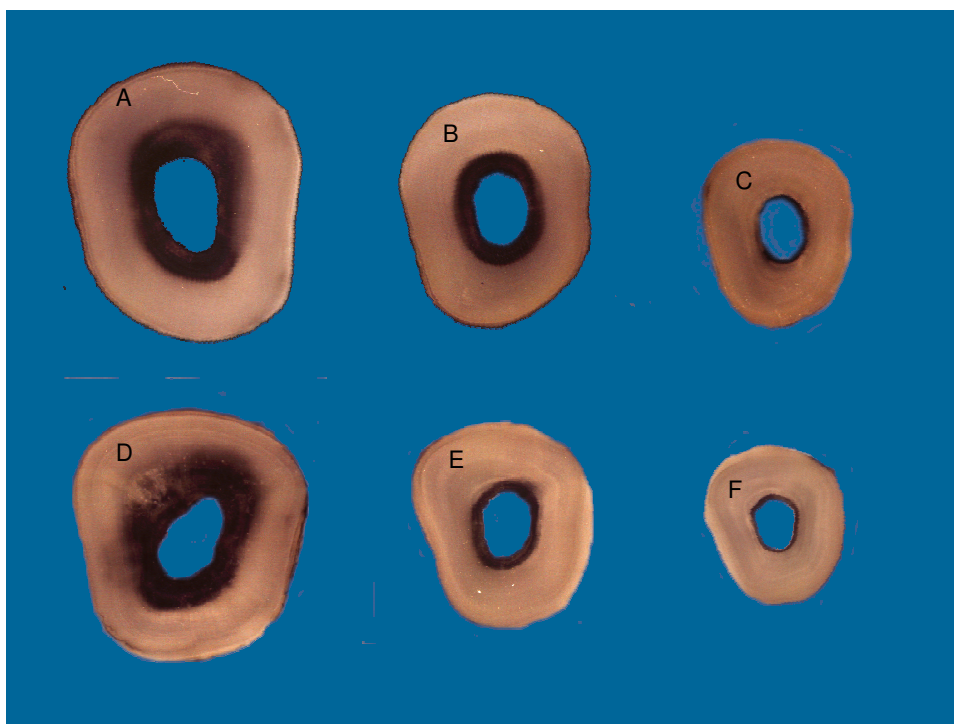


Figura 6- Terço cervical (A), Terço médio (B) e Terço apical (C) do caso 35 (grupo controle). Terço cervical (D), terço médio (E) e terço apical (F) do caso 28 (irrigado com Naocl 1% e EDTA).

Com o objetivo de verificar a existência ou não de diferenças estatisticamente significantes entre as médias das medidas de áreas pigmentadas, obtidas com corpos de prova tratados com NaOCl 1%, NaOCl 5,25%, NaOCl 1% + EDTA, NaOCl 5,25% + EDTA e um grupo controle, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis (SIEGEL, 1975), considerando-se as áreas: cervical, média e apical.

O nível de significância foi estabelecido em 0,05, em uma prova bilateral.

Os resultados estão demonstrados na tabela nº 3.

**Tabela 3** – Probabilidades encontradas, quando da aplicação do teste de Kruskal-Wallis, às médias das medidas de áreas de pigmentação, obtidas com corpos de prova tratados com Naocl 1% (G1), Naocl 5,25% (G2), Naocl 1% + EDTA (G3), Naocl 5% + EDTA (G4) e um grupo controle, considerando-se as áreas cervical, medial e apical.

Variáveis Analisadas	Probabilidades
Naocl 1% (G1)	0,095
Naocl 5% (G2)	0,003*
Naocl 5% + EDTA (G3)	0,003*
Naocl 1% + EDTA (G4)	0,001*
Controle (G5)	0,002*

(\*)  $p < 0,05$

De acordo com os resultados demonstrados na tabela nº3, foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre as médias das medidas de áreas de pigmentação, obtidas com NaOCl 5,25%, NaOCl 5,25% + EDTA, NaOCl 1% + EDTA e Grupo Controle, considerando-se as áreas cervical, medial e apical. Uma vez que o teste de Kruskal-Wallis não indica a direção das diferenças, foi aplicado o teste U de Mann-Whitney (SIEGEL, 1975), às médias das medidas de áreas de pigmentação, obtidas com NaOCl 5,25%, NaOCl 5,25% + EDTA, NaOCl 1% + EDTA e Grupo Controle, considerando-se as áreas cervical, medial e apical, combinadas as séries de valores duas a duas.

**Tabela 4** – Probabilidades encontradas, quando da aplicação do teste de Mann-Whitney às médias das medidas de áreas de pigmentação, obtidas com corpos de prova tratados com NaOCl 5% (G2), NaOCl 1% + EDTA (G3), NaOCl 5% + EDTA (G4) e um grupo controle (G5), combinadas as séries de dados, duas a duas.

Variáveis Analisadas	NaOCl 5,25%	NaOCl1% + EDTA	NaOCl5% + EDTA	Controle
	(G2)	(G3)	(G4)	(G5)
Cervical x medial	0,021*	0,031*	0,019*	0,064
Cervical x apical	0,002*	0,001*	0,001*	0,001*
Medial x apical	0,150	0,082	0,037*	0,050

(\*)  $p < 0,05$

De acordo com os resultados demonstrados na tabela nº 4, foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre as médias das medidas de áreas pigmentadas, relativas a:

- Cervical e medial, quando tratados com Naocl 5,25%, sendo que os valores mais elevados foram os obtidos na área cervical;
- Cervical e medial, quando tratados com Naocl 1% + EDTA, sendo que os valores mais elevados foram os obtidos na área cervical;
- Cervical e medial, quando tratados com Naocl 5,25% + EDTA, sendo que os valores mais elevados foram os obtidos na área cervical;
- Cervical e apical, quando tratados com Naocl 5,25%, sendo que os valores mais elevados foram os obtidos na área cervical;
- Cervical e apical, quando tratados com Naocl 1% + EDTA, sendo que os valores mais elevados foram os obtidos na área cervical;
- Cervical e apical, quando tratados com Naocl 5,25% + EDTA, sendo que os valores mais elevados foram os obtidos na área cervical;
- Cervical e apical, no grupo controle, sendo que os valores mais elevados foram os obtidos na área cervical;
- Medial e apical, quando tratados com Naocl 5,25% + EDTA, sendo que os valores mais elevados foram os obtidos na área medial.

Com interesse em verificar a existência ou não de diferenças estatisticamente significantes entre as médias das medidas de áreas pigmentadas, obtidas nas três áreas dos corpos de prova tratados com NaOCI 1%, NaOCI 5%, NaOCI 1% + EDTA, NaOCI 5% + EDTA e um Grupo Controle, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis (SIEGEL, 1975), considerando-se cada uma das três áreas.

O nível de significância foi estabelecido em 0,05, em uma prova bilateral.

Os resultados estão demonstrados na tabela nº 5.

**Tabela 5** - Probabilidades encontradas, quando da aplicação do teste de Kruskal-Wallis, às médias das medidas de áreas pigmentadas, obtidas nas três áreas, dos corpos de prova tratados com Naocl 1%, Naocl 5%, Naocl 1% + EDTA, Naocl 5% + EDTA e um grupo controle, considerando-se cada uma das três áreas.

Variáveis Analisadas	Probabilidades
Cervical x medial	0,510
Cervical x apical	0,454
Medial x apical	0,168

(\*)  $p < 0,05$

De acordo com os resultados demonstrados na tabela nº 5, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os valores das variáveis analisadas.

## 6. DISCUSSÃO

---

O estudo da permeabilidade dentinária do canal radicular é de grande relevância para a endodontia, uma vez que os canalículos dentinários podem alojar microrganismos em consequência da infecção pulpar. A desinfecção desses canalículos é um dos mais importantes objetivos da terapia endodôntica; requerendo, portanto, um agente desinfetante direta ou indiretamente (Baumgartner *et al.*, 2007; Lui *et al.*, 2007).

Até os dias atuais, os que se dedicam à Endodontia procuram soluções irrigantes ideais; soluções que possam dissolver tecidos (Grossman & Meiman 1941; Moorer & Smith 1975); que possuam efeitos antimicrobianos (Antoniazzi 1973; Marcano, 1989; Heling & Chandler *et al.* 1998;) e sejam eficazes na remoção dos restos de dentina; que aumentem a permeabilidade dentinária com compatibilidade biológica (Johnson *et al.* 2004). Essas soluções devem apresentar baixa viscosidade e tensão superficial quase nula; e ainda, estimular a reparação tecidual e favorecer a ação dos materiais obturadores ou, pelo menos, não prejudicarem e não alterarem a coloração da dentina, além de não enfraquecerem as estruturas dentinárias (Leonardo 2005).

No estudo do aumento da permeabilidade dentinária, promovido pelas soluções auxiliares de instrumentação, Marshall *et al.* (1960) propuseram um método para quantificar a permeabilidade dentinária do canal radicular. Este método, que recebeu o nome de Índice de Permeabilidade Dentinária (IPD), consiste em cortes no sentido longitudinal da raiz e sua divisão imaginária em três níveis, ou seja, cervical, médio e apical. O IPD baseado, a rigor, na enumeração das divisões de 1 a 3, que, ao longo da raiz, formam 9 áreas sendo três na região cervical, três na região media e três na região apical. A avaliação da permeabilidade, no caso semi-quantitativa, é calculada multiplicando-se a extensão longitudinal pela transversal da mancha. Esse método foi aplicado utilizando radio-isótopos ou corantes (Marshall *et al.* 1960, Cohen *et al.* 1970).

No presente estudo realizou-se uma análise morfométrica para quantificação da permeabilidade dentinária com base nos trabalhos de Pécora(1985; 1987). Foram utilizados cortes transversais das regiões cervical, média e apical das raízes. Estes cortes foram preparados até a espessura de 100 micrômetros aproximadamente e avaliados em um microscópio óptico dotado de grade de integração, onde se mensurou a área de dentina pigmentada. A pigmentação da dentina foi realizada previamente, numa análise que, de acordo com Lison (1960) apud Pécora(1985), é chamado ensaio histoquímico. No ensaio histoquímico, o cobre, indicador utilizado, foi revelado no interior dos canalículos dentinários pelo ácido rubeânico, resultando no complexo rubeanato de cobre com a coloração azul. A revelação dos íons cobre pelo ácido rubeânico é dada por uma reação química, cujo resultado é a formação de um sal, o rubeanato de cobre, insolúvel tanto em alcoóis como em xilol. A sensibilidade do método de revelação do cobre pelo ácido rubeânico é da ordem de 0,006g (Feigl, 1958). O método de estudo histoquímico empregado é semelhante aos trabalhos de Roselino (1983); Zuolo *et al.* (1987); Pécora *et al.* (1985; 1987).

A avaliação das estruturas pela morfometria, com microscópio de transmissão dotado com grade de integração, oferece resultados absolutos em função dos valores, em milímetros, do raio do complexo infiltrado nos canalículos dentinários, baseado na maior ou menor permeabilidade da dentina. A quantificação da penetração dos íons de cobre por meio da análise morfométrica oferece segurança quanto à determinação da área e/ou porcentagem de infiltração na dentina. Sendo assim, o método morfométrico se justifica pela fidelidade e alta reprodutibilidade do mesmo, além do fato de que o íon cobre apresenta tamanho molecular bem menor que as moléculas orgânicas dos corantes, sem os efeitos nocivos à saúde e ao meio ambiente, causados normalmente pelo uso de radioisótopos (Pécora1985).

Os dentes utilizados no presente estudo foram dentes incisivos bovinos, armazenados em solução tampão de timol a 0,2% Pécora *et al.* (1985; 1987, 1990, 1992). O uso de incisivos com características de canais mais retos ameniza a possibilidade de alterar a instrumentação em função de um canal



complicado morfológicamente (Shafer & Zapke 2000). Buscou-se também a padronização em relação à característica da dentina, que poderia estar mais ou menos calcificada, a fim de que não houvesse grupos de dentes mais permeáveis, o que altera os resultados da análise. Para tanto, padronizou-se a idade dos animais dos quais foram extraídos os dentes (Slutzky- Goldberg *et al*, 2004; Okino *et al*. 2004, Santos *et al*, 2006). De acordo com Kennedy *et al* 1986 é mais fácil a obtenção de túbulos abertos na região apical e média de dentes jovens que dos dentes velhos, além do número de canalículos diminuir com o passar dos anos Carrigan *et al* (1984). Apesar da padronização feita, não se descarta a possibilidade de haver algum grupo ou amostra menos ou mais permeável em função das variações inerentes da própria dentina.

Sabe-se que nem todas as paredes do canal radicular estarão completamente limpas para que possam sofrer diretamente a ação das soluções irrigantes de maneira homogênea (Lee, 2004). Para minimizar essa influência optou-se pela obtenção de 12 medidas por terços radiculares estudados. Além disso, a ação das soluções estaria limitada ao tempo de utilização clínica, o que nem sempre é o tempo empregado em pesquisas *in vitro* para este propósito. Cantatore *et al* (1996) observaram que o tempo de trabalho necessário para que o EDTA remova completamente a *smear layer* seria de 2-3 minutos ou mais, mas este resultado estaria na dependência da irrigação realizada. Lembrando, ainda, que em 1982, Goldberg & Spielberg haviam sugerido um tempo clínico de 15 minutos para remoção da camada residual.

Durante a instrumentação seguiram-se os princípios de SHILDER (1974) de limpeza e modelagem dos canais radiculares. Preconizou-se a ampliação do terço cervical com brocas *Gates Glidden* para melhor acesso à região apical. Para a ação das soluções irrigantes na região apical foram utilizadas agulhas descartáveis 25x4, posicionadas a 4 mm do comprimento de trabalho (Goerig *et al*. 1982; Pécora, 1992; 2000; Drake *et al*. 1994; Tatsuda *et al*. 1996, Scelza *et al*. 2000).

Após a instrumentação dos canais, as raízes foram impermeabilizadas com cianocrilato, com o objetivo de evitar a pigmentação do lado externo da raiz durante a análise histoquímica.

As soluções utilizadas como irrigantes do canal radicular para este estudo foram água destilada, solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) nas concentrações de 1 e 5,25%, e solução de EDTA 17% (ácido dietilamino tetraacético dissódico). As soluções auxiliares de instrumentação ou soluções irrigantes, de acordo com sua composição básica e associações, podem apresentar efeitos variados no aumento da permeabilidade dentinária. (Cohen, 1970; Baker, 1975; Wayman, 1979; Pécora, 1992; Heling & Chandler, 1998; Takeda *et al*, 1999; O'Connell *et al*, 2000; Menezes *et al*, 2003; De-Deus *et al*, 2007).

A água destilada deionizada é utilizada nos estudos de permeabilidade como solução controle e representa o real comportamento da dentina, pois não tem ação sobre os componentes orgânicos e inorgânicos presentes no interior dos canais radiculares ou resultantes do ato de instrumentação (Pécora, 1985, 1990, 1992; Pécora *et al.*, 1993 e 2000).

Já a solução de hipoclorito de sódio promove aumento na evidência da permeabilidade dentinária por causa de sua ação de solvência de tecidos orgânicos presentes nos canais radiculares. O hipoclorito de sódio não remove a *smear layer*; entretanto, é capaz de dissolver tecido orgânico e limpar canalículos dentinários (McComb & Smith, 1975; Yamada *et al*, 1983; Mader *et al*, 1984; Lim *et al*, 2003; Menezes, *et al* 2003). Sabe-se que o aumento da concentração do hipoclorito de sódio é proporcional à sua capacidade dissolvente de tecido orgânico (Johnson *et al* 2004; Chu *et al* 2004); embora suas altas concentrações possam comprometer a biocompatibilidade em relação aos tecidos periapicais (Trepagnier *et al.* 1977; Johnson *et al* 2004). Quando bem empregada, a solução de hipoclorito de sódio não causa danos ao periápice, além de ser uma solução viável economicamente (Marcano, 1989). A *smear layer* superficial e isoladamente não impede a sua ação; acredita-se, contudo, que sua parte mais profunda, chamada *smear plug*, localizada na entrada dos túbulos dentinários, possa

interferir na ação da solução irrigante no interior dos canalículos dentinários (Cameron, 1983; Pashley, 1992), alterando a permeabilidade dentinária (Cameron, 1983; Mader, 1984; Vojinovic, 1973).

O EDTA é o agente quelante que atua sobre a substância inorgânica da *smear layer* e empregado em associação à solução de hipoclorito de sódio que, por sua vez, age sobre a substância orgânica. Essa combinação seria a forma mais eficaz na limpeza do sistema de canais radiculares (Baumgartner & Mader 1987; Cengiz *et al.* 1990; Sen *et al.* 1995; Kouvas *et al.* 1998; Peters & Barbakow 2000; O'Connell *et al.* 2000; Scelza 2000, Menezes *et al.* 2003). Com a remoção da *smear layer*, menor seria a probabilidade de manutenção ou favorecimento de microorganismos dentro dos túbulos dentinários, o que é benéfico e promissor em relação ao sucesso da terapia endodôntica (Sen *et al.* 1995; Kouvas *et al.*, 1998; Prati *et al.* 2004)

A questão seria saber se o EDTA realmente age na *smear layer*, principalmente na da região apical e no tempo clínico adequado. Trabalhos de Whitakker & Kneale (1979) e Carrigan *et al.* (1984) mostraram que as regiões apicais dos canais radiculares apresentam menor número de canalículos dentinários por unidade de área do que os terços cervical e médio. Com isso, sempre a permeabilidade da região apical será menor que os demais terços da raiz. Além disso, as dificuldades de instrumentação no terço apical, inerentes da própria anatomia do canal, refletem na ação do EDTA (Rodrigues E Biffi, 1989; Biffi & Rodrigues, 1989).

Grande parte dos trabalhos realizados utilizou-se de microscopia eletrônica de varredura para avaliar a remoção de *smear layer* promovida pelo EDTA (Scelza *et al.*, 2000; Scelza *et al.*, 2003), mas a relação *smear layer* com o aumento da permeabilidade dentinária e efetividade de diferentes soluções irrigadoras foi também evidenciada por método histoquímico (Pécora 1985; Pécora *et al.*, 1987, 1992, 2000; Zuolo *et al.* 1987; Prokopowitsch *et al.*, 2000).

No presente estudo, o método histoquímico e a análise morfométrica por meio da pigmentação da dentina permitiu verificar o quanto a solução de EDTA e/ou hipoclorito de sódio são capazes de favorecer a penetração do

corante nos túbulos dentinários. Levando-se em consideração que a *smear layer* avança até 40 micrômetros (Mader *et al*, 1984) ou, até mesmo, 110 micrômetros (Aktener *et al*, 1989), as bactérias atingiriam, no mínimo essas mesmas medidas. Daí a necessidade de se avaliar o quanto uma substância é capaz de atuar nas paredes do canal facilitando a ação dos agentes antimicrobianos, com ênfase, principalmente na região apical, onde a ação da solução irrigante ou da medicação intracanal fica prejudicada em função das dificuldades de acesso durante a instrumentação (Lee, 2004; Prati *et al* 2004; Jong-Ki Lee *et al*, 2006, Lui *et al* 2007).

Na tabela 3 em resultados, de acordo com as probabilidades encontradas quando da aplicação do teste de Kruskal-Wallis às médias das medidas relativas à penetração do corante, obtidas nos corpos de prova, observaram-se diferenças estatisticamente significativas considerando-se as áreas cervical, média e apical.

A região cervical possui características anatômicas favoráveis tanto em relação ao maior número de túbulos dentinários presentes comparado com a região média e apical (Whitaker & Kneale 1979; Carrigan *et al* (1984), quanto à melhor possibilidade de a instrumentação atingir mais efetivamente todas as paredes, uma vez que o acesso a essa região é melhor (Jong-Ki Lee *et al* 2006). Em regiões onde a ação mecânica da lima nas paredes dos canais tem melhor atuação, seja por favorecimento anatômico ou por habilidade do operador em executar uma instrumentação efetiva, a ação do agente quelante pode ser favorecida. De acordo com Maniglia & Biffi, 1995 e Shafer & Zapke 2000 regiões cervical e média são favoráveis à limpeza. São fatores estes que, por sua vez, facilitam a ação do hipoclorito na dissolução da matéria orgânica e do agente quelante em relação à permeabilidade, devido ao maior contato dessas substâncias com a parede dentinária previamente instrumentada (Baumgartner & Mader 1987; Lee, 2004; Lui Jeen-Nee *et al* 2007).

Mas mesmo sem ação das soluções irrigadoras, a complexa anatomia e morfologia dentinárias regem as variações na permeabilidade, o que pôde ser comprovado pela diferença estatisticamente significativa observada no grupo controle entre as regiões cervical e apical, com

favorecimento para a cervical, evidenciando muito bem a influência da anatomia e, conseqüentemente, da instrumentação neste contexto. De acordo com Pécora (1985), a água destilada revela exatamente a real característica da dentina com relação à permeabilidade.

Acredita-se, portanto, que diferentes soluções irrigantes ficam limitadas à ação das limas e das irregularidades naturais das paredes do canal radicular, onde a limpeza adequada rege as variações na permeabilidade, o que pôde ser comprovado pela diferença estatisticamente significativa observada no grupo controle quando se comparou a região cervical e a apical, com os melhores resultados para a cervical, evidenciando muito bem a influência do acesso e conseqüentemente da efetiva instrumentação.

Uma vez que o teste de Kruskal-Wallis não indica a direção das diferenças, foi aplicado o teste *U* de Mann-Whitney (Siegel, 1975). As probabilidades encontradas são evidenciadas na tabela 4, em resultados, constatando-se diferenças significativas entre as médias das medidas correspondentes às áreas pigmentadas, considerando-se os terços analisados e as soluções irrigadoras. O fato de não haver nenhuma diferença em relação a determinados terços como médio e apical (NaOCl 5%, NaOCl 1% +EDTA e controle); cervical e médio (controle) mostra que houve a mesma qualidade em relação à limpeza nesta extensão do canal, talvez por uma ação mecânica favorável para as áreas referidas. Sabe-se que quanto maior a proximidade com o ápice, menos diferenças são percebidas quanto à permeabilidade, havendo necessidade de uma maior concentração da solução de hipoclorito (Chu *et al* 2004), e/ou da presença do EDTA para uma significativa alteração da permeabilidade (Siqueira Jr. *et al* 1998; Johnson *et al* 2004; Leonardo, 2005), como foi observado para NaOCl 5% + EDTA entre terços médio e apical (tabela 4). Porém essa diferença entre os terços não significou uma melhor profundidade na infiltração quando comparada com outras soluções empregadas (tabela 5).

De maneira geral notam-se mais efetivamente diferenças entre a infiltração do corante na região cervical em relação à média e apical; e, na região média mais efetiva em relação à apical; o que está de acordo com vários

trabalhos literários (Yamada *et al* 1983; Vansan *et al* 1990; ABbott 1991; Pécora1992, O'Connel *et al* 2000).

Espera-se que qualquer tipo de solução irrigante seja mais efetivo se comparado ao grupo controle. Sabe-se, contudo, que quando não há o contato da lima nas paredes dos canais, não haverá possibilidade de haver qualquer intervenção da solução irrigante no tempo clínico em que foi empregada Maniglia & Biffi, 1995 e Peters & Barbakow (2000). Esse fato explicaria alguns dados encontrados na tabela 5, em resultados, após aplicação do teste Kruskal-Wallis, onde nenhuma diferença significativa foi encontrada quando foram comparadas as áreas cervical, média e apical entre os grupos analisados (NaOCl 1%, NaOCl 5%, NaOCl 1% + EDTA, NaOCl 5% + EDTA e controle). Na realidade, o resultado vem ao encontro do fato de que, até os dias atuais, ainda não se consegue de forma efetiva preparar o canal radicular de forma efetiva e a ponto de permitir a quantificação da ação das diferentes soluções irrigantes.

Questiona-se se o volume utilizado e o tempo de contato da solução irrigante com as paredes do canal teriam sido suficientes para verificar diferenças significativas entre as soluções, tanto para melhor ação do NaOCl nas concentrações 5,25%, quanto para a ação do EDTA (Baker *et al.* 1975; Aktener *et al* 1993; Dautel-Morazin, 1994; Cantatore *et al* 1996; Peters & Barbakow 2000). Apesar de Scelza *et al* (2003) afirmarem não haver relação entre tempo e ação do EDTA, Grande *et al.*, (2006) correlacionam o tempo à capacidade de ação do EDTA.. Esse fato intrigante nos reporta para outro questionamento: será que a concentração do hipoclorito de sódio influenciaria na ação do quelante?

Trabalhos mais recentes apontam para uma possível alteração da estrutura dentinária relacionada ao uso do EDTA associado ao hipoclorito de sódio 2,5 e 5,25%, além da maior compactação da *smear plug*, o que seria capaz de modificar a permeabilidade em função da desmineralização da dentina (Torabinejad 2003; Grande *et al*, 2006; Merending *et al*, 2007; Sayin *et al.* 2007; De-Deus *et al*, 2008). Somente trabalhos específicos para estes fins poderiam explicar melhor essa hipótese, mas abrem-se aqui dúvidas quanto à

relação da função do EDTA quando utilizado em tempo clínico real, o que, por sua vez, já foi questionado por Ciucchi (1989).

Levando-se em consideração que a maior concentração do hipoclorito de sódio conseguiria remover de forma eficaz matéria orgânica, por que neste trabalho nenhuma diferença ocorreu? Sabe-se, entretanto, que a solução é um coadjuvante; sendo assim, tais alterações podem recair sobre o operador em relação à qualidade da instrumentação, ou mesmo sobre a própria anatomia radicular. E ainda, se a área atingida pela instrumentação possuir maior dureza, haverá variações quanto à ação do agente quelante (Patterson *et al* 1963). Tanto um fato quanto outro diverge para um único ponto: a influência da instrumentação é evidente na ação da solução irrigante e do agente quelante. A menos que novas pesquisas consigam esclarecer a correlação da influência da solução irrigante na ação do agente quelante e vice-versa, as respostas estarão nas limitações impostas pela morfologia complexa da cavidade pulpar durante o preparo do canal.

Acredita-se também que, independente da ação das diferentes soluções irrigantes utilizadas como coadjuvantes no preparo do canal, o sucesso do tratamento acontece em índices satisfatórios, o que permite afirmar que o mais importante no tratamento endodôntico é o adequado preparo biomecânico propiciando uma obturação fisicamente estável.

Do presente trabalho expõe-se que a efetividade das soluções irrigantes analisadas quanto à permeabilidade dentinária é maior na região cervical que na medial e esta maior que na apical. Torna-se necessário elucidar a importância da instrumentação e as limitações impostas pela complexa morfologia da cavidade pulpar como fatores imprescindíveis para que as próprias soluções coadjuvantes possam exercer sua real função. E ainda, métodos para melhorar a quantificação da *smear layer* no uso clínico de uma forma mais representativa de toda a extensão do canal, ainda devem ser desenvolvidos.

## 7. CONCLUSÕES

---

De acordo com os resultados obtidos a partir da metodologia empregada, conclui-se que:

- 1- Em relação aos níveis de penetração do corante entre os terços analisados, houve diferença significativa entre os mesmos, seguindo-se uma ordem de efetividade em relação à permeabilidade do terço cervical maior que o terço médio e este maior que o apical.
- 2- O método quantitativo proposto possibilitou comparar o nível de permeabilidade referente às soluções NaOCl 1%, NaOCl 5,25%, NaOCl 1% + EDTA, NaOCl 5,25% + EDTA e grupo controle; e os resultados não evidenciaram diferença significativa na permeabilidade dentinária entre as soluções de hipoclorito empregadas (1% e 5,25%) e suas associações ao EDTA.



# REFERÊNCIAS

---

1. Abbott, PV. *et al.*, An SEM study of the effects of different irrigation sequences and ultrasonics. **Int Endod J**, v.24, p.308-316, 1991.
2. Aktener, BO.; BILKAY, U. *Smear layer* removal with different concentrations of EDTA-Ethylenediamine mixtures. **J Endod**, v. 19, n. 5, p. 228-231, 1993.
3. Alquist, M; Henningsson, O. Hultenby, K.; Ohlin, J. The efficacy of manual and rotator techniques in the cleaning of root canals: a scanning electron microscopy study. **Int Endod J**, v. 34, p. 533-537, 2001.
4. Anderson, DJ.; Ronning, GA. Dye diffusion in human dentine. **Arch. Oral Biol.**, v.7, n.40, p.505-12, July-Aug. 1962.
5. Antoniazzi, JH. **Análise "in vitro" da atividade antimicrobiana de algumas substâncias auxiliares da instrumentação no preparo químico mecânico de canais radiculares de dentes humanos.** Ribeirão Preto, 1973. Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.
6. Baker, NA.; Eleazer, PD.; Averbach, RE.; Seltzer, S. Scanning electron microscopic study of the efficacy of various irrigating solution. **J. Endod.**, v.1, n.4, p.127-35, Apr. 1975.
7. Baumgartner, J C. & Mader, C L. A scanning electron microscope evaluation of four root canal irrigation regimes. **J. Endod.**, v. 13, p. 147-157, 1987.
8. Baumgartner JC.; Johal, S.; Marshall, JG. Comparison of the Antimicrobial Efficacy of 1,3% NaOCl/BioPure MTAD to 5,25% NaOCl/15% EDTA for Root Canal Irrigation. **J Endod**, v.33, p.48-51, 2007.
9. Biffi, JCG **O ultra-som em endodontia. Avaliação quantitativa e histobacteriológica em dentes humanos.** Araraquara, Faculdade de Odontologia, UNESP, 1987. (Tese de Doutorado).
10. Biffi, JCG. & Rodrigues, HH. Ultrasound in Endodontics: a quantitative and histological assessment using human teeth. **Endodontics Dental Traumatology** , v.5, p. 55-61, 1989.
11. Bodecker, CF.; Applebaum, E. The variable permeability of the dentin and its relation to operative dentistry. **Dent Cosmos**, v. 75., n. 1, p.21-31, Jan. 1933.

12. Boyde A, Knight PJ Scanning electron microscope studies of the preparation of the embrasure walls of class II cavities. **Brit Dent J**, v. 129, p. 557-564, 1970.
13. Buchanan, LS. Cleaning and shaping the root system: negotiating canals to the termini. In Cohen, S., Burns, R. **Pathways of the pulp** 5a Ed. 1991.
14. Bystrom, A.; Sundqvist, G. The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. **Int Endod J**, v.18, p.35-40, 1985.
15. Callahan, JR. Sulfidric acid for opening root canals. **Dent Cosmos**, v.36, n.12, p.957-9, Dec 1894.
16. Cameron, JA. The use of ultrasonics in the removal of the *smear layer*: A scanning electron microscope study. **J Endod**, v.9, n.7, p.289-292, Jul. 1983.
17. Cantatore, G.; Ceci, A.; Giannini, P. Valutazione al SEM dell' efficacia de alcune soluzioni irriganti nella rimozione del fango dentinale canalare. In: Atti Del III Congresso dei Docenti Di Odontoiatria. Roma, Italy, Collegio Dei Docenti di Odontoiatria, 565, 50, 1996.
18. Carrigan, PJ.; Morse, DR.; Furt, ML.; Sinai, IH. Scanning electron microscope evaluation of human dentinal tubules according to age and location. **J. Endod.**, v.11, n.8, p.359-63, 1984.
19. Çalt, S.; Serper, A. Smear layer removal by EGTA. **J Endod**, v. 26, n. 8, p. 459-461, Aug. 2000.
20. Çalt, S.; Serper, A. Time – dependent effects of EDTA on dentin structures. **J Endod**, v. 28, n.1, p.17-19, Jan. 2002.
21. Cengiz, T.; Aktener, BO.; Piskin, B. The effect of dentinal tubule orientation on the removal of the *smear layer* by root canal irrigant. A scanning electron microscopic study. **Int Endod J**, v.23, p. 163-171, 1990.
22. Chu GT, Fleury AAP, Murray P, Flax MD. The ability of different concentrations of NaOCl to dissolve and reduce the weight of bovine pulp tissue in vitro. **J Endod**, v. 30, p. 274, 2004.
23. Ciucchi, B.; Khettabi, M.; Holz, J. The effectiveness of different endodontic irrigation procedures on the removal of smear layer: a scanning electron microscopic study. **Int Endod J**, v. 22, p. 21-28, 1989.
24. Cohen, S.; Stewart, GG; Laster, LL. The effects of acids, alkalies, and chelating agents on dentine permeability. **Oral Surg.**, v.29, n.4, p.631-4, Apr. 1970.

25. Czonstkowsky, M.; Wilson, EG.; Holstein, FA. The Smear Layer in Endodontics. **Dent. Clin. North Am.**, v.34, n.1, p.13-25, Jan. 1990.
26. Dakin, HD. In the use of certain antiseptic substances in the treatment of infected wounds. **Br. Med. J.**, (2) : 318-320, Aug. 1915.
27. Dakin, H.D. The behavior of hypochlorities on intra-venous injectin and their action on blood serum. **Brit Med J.**, v.1, p. 852-854, 1916.
28. Dakin, HD.; Dunham, EK. The relative germicidal efficacy of antiseptics of the chlorine group and acriflavine and other Dyes. **Brit Med J.**, v.2, p.641-645, 1917.
29. Dautel-Morazin, A. an ultrastructural study of the smear layer: comparative aspects using secondary electron image and backscattered electron image. **J Endod**, v. 20, n. 11, p. 531-534, 1994.
30. De-Deus G, Zehnder M, Reis C, Fidel S, Fidel RAS, Galan JR J, Paciornik S. Longitudinal Co-site microscopy study on the chelating ability of Etidronate and EDTA using a comparative single-tooth model. **J Endod**, v. 34, n. 1, p. 71-75, 2008.
31. Di Lenarda, R.; Cadenaro, M.; Sbaizero, O. Effectiveness of 1 mol L<sup>-1</sup> citric acid and 15% EDTA irrigation on *smear layer* removal. **Int Endod J**, v.33, p.46-52, 2000.
32. Drake, R. et al . Bacterial retention in canal walls in vitro: effect of smear layer. **J Endod**, v. 20, n. 2, p.78-82, 1994.
33. Estrela, C. **Ciência Endodôntica**. São Paulo, Artes Médicas, 2v, 2004.
34. Ferh, FR; Ostby, NB. Effect of EDTA and sulfuric acid on root canal dentine. **Oral Srg.**, v.16, n.2, p.199-205, 1963.
35. Foster, KH., Kulild, JC., Wellwe, RN. Effect of smear layer removal on the diffusion of calcium hydroxide through radicular dentin. **J Endod**, v. 19, p. 136-140, 1993.
36. Froes, J.AV. **Influência da *smear layer* no selamento apical em três técnicas de obturação**. Belo Horizonte: FOUMG, 1997. 134p (Dissertação de Mestrado em Odontologia, área Endodontia)
37. Froes, JAV. Horta, HGP.; Silveira, AB. Smear layer influence on the apical seal of four different techniques. **J Endod**, v.26, n. 6, p.351-354, 2000.
38. Garberoglio, R.; Becce, C. Smear layer removal by root canal irrigants. **Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol**, v.78, n.3, p.359-366, Sep. 1994.

39. Ghoddusi, J.; Robani, A.; Rashed, T.; Ghaziani, P.; Akbart, M. An evaluation of microbial leakage after using MTAD as a final irrigation. **J Endod**, v. 33, n. 2, p.173-176, 2007.
40. Goerig, AC.; Michelich, RJ.; Schultz, HH. Instrumentation of root canals in molar using the step-down technique. **J Endod** . , v.8, p. 550-554, 1982.
41. Goldberg F, Spielberg C. The effects of EDTA and variation of its working time analyzed with electron microscopy. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 53, p. 74-77, 1982.
42. Goldman, LB.; Goldman, M.; Kronmann, JH.; Lim, PS. The efficacy of several irrigating solutions for endodontics: a scanning electron microscopic study. **Oral Sur, Oral Med, Oral Pathol**, v.52, n.2, p.197-204, Aug. 1981.
43. GOLDMAN, M.; GOLDMAN, M.; KRONMAN, J.H.; LIM, P.S. The efficacy of several endodontic irrigating solutions: a scanning electron microscopic study. Part II. *J Endod*, v.8, n.11, p.487-492, 1982.
44. Goodman, LS.; Gilman, A **As bases farmacológicas da terapêutica**. 3ª Ed., Guanabara-Koogan, 1967.
45. Grande, NM.; Plotino, G.; Falanga, A. Pomponi, M.; Somma, F. Interaction between EDTA and sodium hypochlorite: A nuclear magnetic resonance analysis. **J Endod**, v. 32, n. 5, p.460-464, 2006.
46. Grossman, L I. & Meiman, BW. Soluton of pulp tissue by chemical agents. **J. Am. Dent. Assoc.**, v. 28, p. 223-5, 1941.
47. Grossman, L I. Irrigation of root canals. **J. Am. Dent. Assoc.**, v.30, n.16, p.1915-7,1943.
48. Guerisoli, DMZ.; Marchesan, MA; Walmsley, AD; Lumley, PJ; Pécora, JD. Evaluation of smear layer removal by EDTAC and sodium hypochlorite with ultrasonic agitation. **Int Endod J**, v. 35, p. 418-421, 2002.
49. Gutierrez, JH. Sanning electron microscope study on the action of endodontic irrigants on bacteria invading the dentinal tubules. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 69, p. 491-501, 1990a.
50. Gutierrez, JH. The risk of intentional dissolution of the smear layer after mechanical preparation of root canals. **Oral surg Oral Med Oral Pathol**, v. 70, n.1, p. 96-108, 1990b.
51. Heling, I.; Chandler, NP. Antimicrobial effect of irrigant combinations within dentinal tubules. **Int Endod J**, v.31, p.8-14, 1998.
52. Heling, I. *et al*. In vitro antimicrobial effect of RC-Prep within dentinal tubules. **J Endod**, v. 25, n. 12, p. 782-785, 1999.

53. Hill, PK. Endodontics. **J Prothet Dent**, v.9, p.142, 1959.
54. Holland, R.; Souza, V.; Nery, Mg. & Mello, V. Efeitos de diferentes preparados à base de EDTA na dentina dos canais radiculares. *Ver. Fac. Odont., Araçatuba*, v. 2, p. 127-31, 1973.
55. Hulsmann, M.; Heckendorf, M.; Lennon, Á. Chelating agents in root canal treatment: mode of action and indications for their use. **Int Endod J**, v.36, n.12; p.810-830, Dec. 2003.
56. Hulsmann, M.; Heckendorf, M.; Shafers, F. Comparative in-vitro evaluation of three chelator pastes. **Int Endod J**, v.35, n.8, p.668-679, Aug. 2002.
57. Ingle, JI ; Bakland, LK Edodontics, 4a ed. Baltimore : Williams, Wilkens, 1994. 944p.
58. Johnson BR; unaretto R, Chruszczyk A, Daniel J, Begole EA Tissue solvent activity of high concentration NaOCl on bovine tendon collagen. **J Endod**, v.30, p. 266 (abst OR 48), 2004.
59. Kennedy, W.; Walker, WA.; Gough, RW. *Smear layer* removal effects on apical leakage. **J Endod**, v. 12, p.21-27, 1986.
60. Kouvas, V.; Liolios, E.; Parissis-Messimeris, S; Boutsoukias, A. Influence of smear layer on depth of penetration of three endodontic sealers: an SEM study. **Endod Dent Traumatol** 1998, 14: 191-195
61. Leonardo, MR. **Endodontia: Tratamento de canais radiculares-Princípios técnicos e biológicos**. São Paulo: Artes Médicas, 2005. V.1, cap. 13, p. 487-540.
62. Lee J-K, Ha BH, Choi JH, Heo SM, Perinpanayagam H. Quantitative three-dimensional analysis of root canal curvature in maxillary first molars using micro-computed tomography. **J Endod.**, v. 32, p.941-945, 2006.
63. Lee SJ, Wu MK, Wesselik PR. The effectiveness of syringe irrigation and ultrasonics to remove debris from simulated irregularities within prepared root canal walls. **Int Endod J**, v. 37, p. 1-7, 2004.
64. Lim, TS.; Wee, TY.; Choi, MY.; Koh, C.; Lim, S. Light and scanning electron microscopic evaluation of Glyde File Prep in smear layer removal. **Int Endod J**, v. 36, p. 336-343, 2003
65. Lloyd A. *et al*. Seability of Trifecta technique in the presence or absence of the smear layer. **J Endod**, v.38, p. 35-40, 1995.
66. Lloyd A, Thompson J, gutmann JL, dummer PM. Seability of Trifecta technique in the presence or absence of the *smear layer*. **J Endod** v.28, n.1, p.35-40, 1995.

67. Lui JN.; Kuab, HG.; Chen, NN. Effect of EDTA with and without surfactants or ultrasonics on removal of smear layer. **J Endod**, v. 33, n.4, p-472-475, 2007.
68. Mader, CL.; Baumgartner, JC.; Peters, DD. Scanning electron microscopic investigation of the smeared layer on root canal walls. **J Endod**, v.10, n.10, p. 477-483, Oct. 1984.
69. Mandel, E.; Machtou, P.; Friedman, S. Scanning electron microscope, observation of canal cleanliness. **J Endod**, v.16, n. 6, p.279, 283, 1990.
70. Maniglia, CAG.; Biffi, JCG. Avaliação do volume do canal radicular após as instrumentações manual e ultra-sônica. **Rev. Assoc. Paul. Cir. Dent.**, v.49, p.291-294, 1995.
71. Marcano, PB. Substâncias irrigadoras. **Rev. Esp. Endodoncia**, v.7, n.2, p.51-3, 1989.
72. Marending, M.; Paqué, F.; Fisher, J.; Zebnder, M. Impact of irrigant sequence on mechanical properties of human root dentin. **J Endod**, v. 33, n. 11, p. 1325-1328, 2007.
73. Marshall, JF.; Massler, M.; Dute, HL. Effects of endodontic treatments on permeability of root dentine. **Oral Surg.**, v.13, n.2, p.208-23, Feb. 1960.
74. McComb, D.; Smith, DC. A preliminary scanning electron microscopic study of root canals after endodontic procedures. **J. Endod.**, v.1, n.7, p.238-42, July 1975.
75. Menezes, ACSC.; Zanet, CG.; Valera, MC. *Smear layer* removal capacity of disinfectant solutions used with and without EDTA for the irrigation of canals: a SEM study. **Pesq Odontol Bras**, v.17, n.4, p.349-355, 2003.
76. Meryon, SD.; Tobias, RS.; Jakeman, KJ. Smear removal agents: A quantitative study in vivo and in vitro. **J. Prosth. Dent**, v.57, n.2, p.174-179, Feb.1987.
77. M'Quillen, JHM. Microscopic study of dental tissues. **Dent Cosmos**, v. 7, n. 9, p. 449-55, 1866.
78. Nikiforuk, G.; Sreebny, L. Demineralization of hard tissues by organic chelating agents at neutral pH. **J. Dent. Res.**, v.32, n.6, p.859-67, Dec. 1953.
79. Nygaard-Østby, B. Chelation in root canal therapy. Ethylenediamine tetraacetic acid for cleansing and widening of root canals. **Odontologisk Tidsskrift**, v.65, n.2, p.3-11, Feb. 1957.
80. O'Connell, MS.; Morgan, LA.; Beeler, WJ.; Baumgartner, JC. A comparative study of *smear layer* removal using different salts of EDTA. **J Endod**, v.26, p.739-744, 2000.

81. Ohlweiler, OA. **A química Analítica Quantitativa**. 3a Ed. Rio de Janeiro: Livros técnicos e científicos editor. 1982. Cap3: Equilíbrios ácidos-básico, p.31-60.
82. Oksan, T.; Aktener, BO.; Sen, BH.; Tezel, H. The penetration of root canal sealers into dentinal tubules. A scanning electron microscopic study. **Int Endod J**, v.26, p.301-305, 1993.
83. Orstavik D, Haapasalo M. Desinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. **Endod Dental Traumatol**, v.6, p. 142-149, 1990.
84. Ostby, BN. Seis anos de experiência clínica y experimental com El ácido etileno-diamino tetra-acético (EDTA) como coadjuvante em La terapia de los conductos radiculares. **Rev. Ass. Odont. Argent.**, v.50, p. 75-81, 1962
85. Paiva, JG.; Antoniazzi, JH. **Endodontia, bases para a prática clínica**. São Paulo, Artes Médicas LTDA, 1984
86. Pashley, DH.; Kehl, T.; Pashley, E.; Palmer, P. Comparison of in vitro and in vivo dog dentin permeability. **J. Dent. Res.**, v.60, n.3, p.763-68, Mar. 1981
87. Pashley, DH.; Andriga, HJ.; Derkson, GD; Derkson, ME.; Kalathoor, SR. Regional variability in the permeability of human dentine. **Archs Oral Biol**, v. 32, n. 7, p. 519-523, 1987.
88. Pashley, DH. Smear layer: overview of structure and function. **Proceeding Finnish Dentistry Society**, v.88, s.1, p.215-224, 1992.
89. PATTERSON, S.A. In vivo and in vitro studies of the effect of the disodium salt of ethylenediamine tetraacetate on human dentine and its endodontic implications. *Oral Surg.*, v.16, n.1, p.83-103, Jan. 1963.
90. Pécora, JD. **Contribuição ao estudo da permeabilidade dentinária radicular. Apresentação de um método histoquímico e análise morfométrica**. Ribeirão Preto, 1985. 110p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.
91. Pecora, JD.; Costa, WF.; Campos, GM.; Roselino, RB. Presentation of a histochemical method for the study of root dentine permeability. **Rev odont USP**, v.1, n.2, p. 3-9, Jun. 1987.

92. Pécora, JD.; Savioli, RN.; Vansan, LP.; Silva, RG.; Saquy, PC.; Costa, WF. Apresentação de um método histoquímico para revelar a ação quelante do EDTA na dentina radicular. **Rev. Ass. Paul. Cirurg. Dent.** v.44, n.5, p.263-5, set./out. 1990.
93. Pécora, J.D. **Efeito das soluções de Dakin e de EDTA, isoladas, alternadas e misturadas, sobre a permeabilidade da dentina radicular.** Ribeirão Preto, 1992. 147p. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.
94. Pécora, JD.; Sousa Neto, MD.; Saquy, PC.; Silva, RG.; Cruz Filho, AM.: Effect of Dakin's and EDTA solutions on dentin permeability of root canals. **Braz. Dent. J.** 4(2): 79-84, 1993.
95. Pecora, J.D. *et al.* Evaluation of dentin root canal permeability after instrumentation and Er: YAG laser application. **Lasers Surg Med**, v.26, n.3, p.277-281, 2000.
96. Peters, LB.; Wesselink, PR.; Moorer, WR. Penetration of bacteria in bovine root dentine in vitro. Penetration of bacteria in bovine root dentine in vitro. **Int Endod J**, v.33, n.1, p.28-36, Jan. 2000.
97. Peters, O.A.; Barbakow, F. Effects of irrigation on debris and *smear layer* on canal walls prepared by two rotary techniques: a scanning electron microscopic study. **J Endod**, v.26, n.1, p.6-10, Jan. 2000.
98. Prati, C.; Foschi, F.; Montebugnoli, L.; Mrchionni, S. Appearance of the root canal walls preparation with NiTi rotatory instruments: a comparative SEM investigation. **Clin Oral Invest**, v.4, p.253-258, 2004.
99. Prokopowitsch, I.; Moura, AAM.; Muench, A. Análise in vitro da permeabilidade dentinária do terço radicular do terço apical tendo como fonte de variação a substância química auxiliar da instrumentação. **Rev Odontol Universidade de São Paulo**, v.3, p.345-353, 1989.
100. Robazza, CRC.; Paiva, JG.; Antoniazzi, JH. Variações da permeabilidade da dentina radicular quando do emprego de alguns fármacos auxiliares do preparo endodôntico. Contribuição ao estudo. **Ass. Paul. Cirur. Dent.**, v. 35, n. 6. Nov/Dez 1981.
101. Rodrigues, HH. & Biffi, JCG. A histological assessment of nonvital teeth after ultrasonic root canal instrumentation. **Endodontics Dental Traumatology**, v.5 p. 182-187, 1989.



102. Roselino, RB. Método Histoquímico, 1983 - apud Pécora, JD. **Contribuição ao estudo da permeabilidade dentinária radicular.** Apresentação de um método histoquímico. Ribeirão Preto, 1985, 110 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.
103. Roselino, RB, & Minelli, CJ. Contribuição ao estudo da penetração do Ácido Fosfórico na dentina através de técnica histoquímica. *Boi. Fac. Far., Odont. R. Preto* v.6, n.1, p.120-5, jan./jun. 1969.
104. Sayin, CT.; Serper, A.; Cebreli, ZC.; Kalayci, S. Calcium loss from root canal dentin following EDTA, EGTA, EDTAC, and Tetracycline-HCl treatment with or without subsequent NaOCl irrigation. *J Endod*, v. 33, n. 5, p. 581-584, 2007.
105. Scelza, MFZ.; Antoniazzi, JH.; Scelza, P. Efficacy of final irrigation- A scanning electron microscopic evaluation. *J Endod*, v.26, n.6, p.355-358, Jun. 2000.
106. Scelza, M.F.Z; Teixeira, A.M.; Scelza, P. Decalcifying effect of EDTA-T, 10% citric acid, and 17% EDTA on root canal dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Pral Radiol Endod* , v. 95, p.234-236, 2003.
107. Scelza, MF.; Pierro, V.; Scelza, P.; Pereira, M. Effect of three diferent time periods of irrigation with EDTA-T, EDTA, and citric acid on smear layer removal. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, v.98, n.4, p.499-503, Oct. 2004.
108. Schilder, H. Cleaning and Shaping the Root Canal. *Dent. Clin. North Am.*, v.18, n.2, p.269-96, Apr. 1974.
109. Shabahang, S.; Powerssmall, M.; Torabinejad, M. in vitro antimicrobial efficacy of MTAD and sodium hypochlorite. *J Endod*, v.29, n.7, p. 450-452, 2003.
110. Seidberg, B.H.; Shilder, H. An evaluation of EDTA in endodontics. *Oral Surg Oral Med, Oral Pathol*, v. 37, n.4, p.609-620, 1974.
111. Sen, BH.; Wesselink, PR.; Turkun, M. The *smear layer*: a phenomenon in root canal therapy. *Int Endod J*, v.28, p.141-148, 1995.
112. Shafer, E.; Zapke, K. A comparative scanning electron microscopic investigation of the efficacy of manual and automated instrumentation of root canals. *Journal of Endodontics*, v.26, n.11, p.660-664, Nov. 2000.
113. Siegel, S. **Estatística não-paramétrica, para as ciências do comportamento.** Trad. Alfredo Alves de Farias. Ed. McGraw-Hill do Brasil. São Paulo, 1975, 350 p.

114. Siqueira JR, Batista MMD, Fraga RC, Uzeda M. Antibacterial effects of endodontic irrigants on Black-pigmented gram negative anaerobes and facultative bacteria. **J Endod**, v.24, p. 414-416, 1998.
115. Spangberg, L.; Engstrom, B.; Langeland, K. Biological effects of dental materials. 3-Toxicity and antimicrobial effect of endodontic antiseptic in vitro. **Oral Surg.**, v.36, n. 6, p. 856-871, 1973. *apud* Leonardo 2005.
116. Tao, L.; Anderson, RW.; Pashley, DH. Effect of endodontic procedures on root dentin permeability. **J endod** v. 17, n.12, p. 583-588, 1991.
117. Takeda, FH.; Harashima, T.; Kimura, Y.; Matsumoto, K. Efficacy of Er: YAG Laser in Removing Debris and Smear Layer on Root Canal Walls. **J. Endod.**, v.24, n.8, p.548-51, Aug. 1998a
118. Takeda, FH.; Harashima, Y.; Matsumoto, Y. Matsumoto, K. A comparative study of removal of smear layer by three endodontic irrigants and two types of laser. **Int Endod J** v. 32, p. 32-39, 1999.
119. Torabinejad, M.; Handysides, R.; Khademi, AA.; Bakland, LK. Clinical implications of the *smear layer* in endodontics: a review. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v.94, n.6, p.658-666, Dec. 2002.
120. Torabinejad M, Khademi AA, Babagoli J. A new solution for the removal of the smear layer. **J Endod**, v.29, p.170-175, 2003.
121. Trepagnier, CM.; Madden, RM.; Lazzari, EP. Quantitative study of sodium hypochlorite as an in vitro endodontic irrigant. **J. Endod.**, v.3, n.5, p.194-6, May 1977.
122. Taylor, H.D.; Austin, J. H. The solvent action of antiseptics on necrotic tissue. *J exp. Med.*, v. 27, p. 155-164, 1918. *Apud* Leonardo, M. R. **Endodontia: Tratamento de canais radiculares- Princípios técnicos e biológicos**. São Paulo: Artes Médicas, 2005. V.1, cap. 13, p. 487-540.
123. Vansan, LP; Pécora, JD.; Costa, WF.; Maia Campos, G. effects of various irrigating on the cleaning of the root canal with instrumentation. **Braz Dent J.**, v.1, n. 1, p. 37-44, 1990
124. Voguel, A. **Análise Inorgânica quantitativa**, 4<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro, Guanabara, p.197-8, 1981.
125. West, JD.; Roane, JB. Limpeza e modelagem do sistema de canais radiculares. In: Cohen, S.; Burns, R. **Caminhos da Polpa** 7<sup>a</sup> Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. Cap 8, p.191-242.

126. White, RR.; Goldman, M.; Lin, PS. The influence of the smeared layer upon dentinal tubule penetration by plastic filling materials. **J Endod**, v.10, p.558-562, 1984.
127. Whitakker, DK.; Kneale, MJ. The dentine - predentine interface in human teeth. A scanning electron microscopic study. **Br. Dent. J.**, v.146, n.1, p. 43-6, 1979.
128. Wu, MK. Wesselink, PR. A primary observation on the preparation and obturation in oral canals. **Int Endod J.**, v.34, p. 137-141, 2001.
129. Yamada, RS.; Armas, A.; Goldman, M.; Lin, PS. A scanning electron microscopic comparison of a high volume final flush with several irrigating solutions: part 3. **J Endod.**, v.9, n. 4, p. 137-142, 1983.
130. Yesiloy, C. *et al.* Antimicrobial and toxic effects of established and potencial root canal irrigants. **J Endod.**, v.21, n. 10, p.513-515, 1995.
131. Zanato, A.; Só, MV.; Figueiredo, JAP. Remoção da camada de esfregaço: Influência do tempo de agitação do agente quelante (EDTA). **Rev. Odontol UNICID**, v.13, n.2, p.103-111, maio/agosto. 2001.
132. Zuolo, M.; Murgel, CAF.; Pécora, JD.; Antoniazzi, JH.; Costa, WF. Ação do EDTA e suas associações com tensoativos na permeabilidade da dentina radicular. **Rev. Odontol. USP**, v.1, n.4, p.18-23, out./dez. 1987.

# ANEXOS

**Tabela 1-** Valores (mm), dos níveis de infiltração nas secções representativas dos terços radiculares cervical, médio e apical em quatro medidas por secções, nas faces vestibular (V), lingual (L), mesial (M) e distal (D), dos grupos 1 a 10, após irrigação dos canais radiculares com hipoclorito de sódio a 1% e a 5%, hipoclorito de sódio a 1% e 5% + EDTA e água destilada (grupo controle).

C A S O		T E R Ç O		Tratamento																Controle			
				Controle Naocl 1%				Naocl 5%				Naocl 1% + EDTA				Naocl 5% + EDTA							
				V	L	M	D	V	L	M	D	V	L	M	D	V	L	M	D	V	L	M	D
1	C	0,50	1,13	0,67	0,55	0,47	0,57	0,45	0,50	0,52	0,46	0,40	0,50	0,37	0,36	0,37	0,33	0,31	0,32	0,40	0,33		
		0,46	0,84	0,49	0,54	0,59	0,54	0,55	0,47	0,54	0,46	0,47	0,50	0,61	0,48	0,46	0,58	0,38	0,42	0,42	0,28		
		0,79	0,85	0,16	0,62	0,57	0,57	0,50	0,57	0,73	0,65	0,51	0,66	0,36	0,27	0,32	0,26	0,35	0,32	0,35	0,32		
	M	1,01	1,36	0,37	0,77	0,58	0,48	0,46	0,39	0,59	0,52	0,46	0,55	0,22	0,18	0,22	0,17	0,31	0,23	0,32	0,35		
		1,35	1,27	0,79	0,80	0,54	0,40	0,47	0,35	0,68	0,41	0,41	0,58	0,15	0,12	0,14	0,18	0,30	0,25	0,35	0,31		
		0,77	1,21	0,73	0,66	0,61	0,44	0,44	0,87	0,11	0,43	0,17	0,34	0,14	0,19	0,19	0,21	0,22	0,23	0,23	0,22		
	A	1,40	0,97	0,75	0,60	0,74	0,43	0,52	0,52	0,50	0,37	0,32	0,41	0,12	0,11	0,14	0,23	0,18	0,10	0,12	0,07		
		1,32	1,07	0,92	0,82	0,67	0,66	0,56	0,38	0,48	0,47	0,34	0,43	0,07	0,06	0,11	0,12	0,24	0,11	0,24	0,15		
		1,58	1,22	0,61	0,84	0,75	0,10	0,15	0,31	0,43	0,35	0,32	0,39	0,12	0,05	0,07	0,08	0,22	0,12	0,22	0,11		
2	C	0,50	0,40	0,29	0,34	0,55	0,50	0,52	0,52	0,76	0,83	0,65	0,76	0,46	0,53	0,46	0,47	0,68	0,58	0,43	0,54		
		0,59	0,49	0,45	0,46	0,32	0,34	0,37	0,32	0,59	0,64	0,52	0,57	0,01	0,03	0,02	0,02	0,49	0,44	0,34	0,43		
		0,32	0,25	0,20	0,28	0,25	0,27	0,23	0,25	0,53	0,55	0,45	0,46	0,02	0,06	0,04	0,02	0,07	0,07	0,11	0,19		
	M	0,03	0,07	0,00	0,01	0,14	0,03	0,12	0,15	0,13	0,13	0,20	0,18	0,02	0,06	0,02	0,03	0,02	0,00	0,01	0,01		
		0,04	0,05	0,01	0,02	0,18	0,18	0,17	0,15	0,08	0,12	0,17	0,14	0,00	0,03	0,10	0,03	0,01	0,00	0,01	0,00		
		0,04	0,02	0,00	0,02	0,11	0,03	0,11	0,12	0,10	0,03	0,12	0,12	0,03	0,06	0,01	0,02	0,02	0,03	0,00	0,00		
	A	0,03	0,04	0,02	0,02	0,03	0,03	0,01	0,02	0,02	0,05	0,06	0,06	0,01	0,01	0,06	0,04	0,00	0,02	0,00	0,03		
		0,03	0,03	0,02	0,00	0,02	0,04	0,03	0,06	0,00	0,05	0,01	0,01	0,03	0,05	0,00	0,04	0,00	0,03	0,00	0,00		
		0,01	0,04	0,02	0,04	0,04	0,09	0,02	0,03	0,03	0,01	0,02	0,02	0,00	0,09	0,01	0,04	0,01	0,00	0,00	0,03		
3	C	0,00	0,00	0,00	0,02	0,46	0,36	0,35	0,40	0,91	0,79	0,83	0,73	0,40	0,42	0,35	0,35	0,50	0,44	0,42	0,41		
		0,01	0,00	0,01	0,02	0,81	0,52	0,58	0,60	0,66	0,53	0,55	0,53	0,51	0,38	0,46	0,47	0,58	0,56	0,48	0,43		
		0,02	0,01	0,01	0,02	0,50	0,47	0,45	0,47	0,49	0,43	0,51	0,41	0,33	0,37	0,38	0,33	0,38	0,34	0,33	0,32		
	M	0,02	0,00	0,00	0,01	0,16	0,14	0,12	0,10	0,05	0,04	0,02	0,02	0,18	0,17	0,21	0,17	0,01	0,03	0,00	0,02		
		0,01	0,00	0,02	0,03	0,12	0,10	0,06	0,12	0,04	0,04	0,01	0,0	0,20	0,22	0,20	0,18	0,00	0,04	0,09	0,07		
		0,00	0,00	0,00	0,02	0,08	0,06	0,05	0,06	0,05	0,02	0,01	0,02	0,14	0,17	0,19	0,18	0,00	0,01	0,01	0,02		
	A	0,00	0,00	0,00	0,02	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,03	0,03	0,02	0,00	0,00	0,00	0,01		
		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,00	0,02	0,01	0,04	0,04	0,04	0,04	0,00	0,00	0,01	0,03		
		0,01	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,04	0,02	0,00	0,03	0,01	0,02	0,01	0,00	0,01	0,00	0,01		

4	C	0,65 0,42 0,33 0,41	0,88 1,01 0,00 0,67	0,90 0,80 0,70 0,65	0,74 0,56 0,54 0,61	0,04 0,04 0,00 0,20
		0,65 0,47 0,42 0,18	0,97 0,91 0,45 0,75	0,89 0,82 0,77 0,69	0,57 0,14 0,47 0,57	0,53 0,45 0,37 0,58
		0,97 0,79 0,61 0,61	0,95 0,80 0,41 0,86	0,70 0,82 0,76 0,65	0,53 0,27 0,50 0,44	0,18 0,05 0,00 0,20
	M	0,01 0,08 0,07 0,19	0,02 0,01 0,01 0,01	0,44 0,71 0,58 0,55	0,46 0,23 0,42 0,46	0,02 0,00 0,03 0,06
		0,28 0,08 0,18 0,07	0,00 0,00 0,02 0,02	0,17 0,47 0,49 0,42	0,41 0,07 0,36 0,35	0,03 0,03 0,00 0,04
		0,04 0,04 0,06 0,06	0,01 0,02 0,02 0,01	0,70 0,63 0,58 0,56	0,11 0,00 0,31 0,00	0,00 0,03 0,00 0,04
	A	0,01 0,02 0,00 0,05	0,00 0,04 0,00 0,00	0,04 0,27 0,34 0,19	0,03 0,00 0,00 0,00	0,01 0,00 0,00 0,00
		0,03 0,04 0,00 0,00	0,00 0,00 0,01 0,01	0,04 0,07 0,31 0,11	0,00 0,00 0,00 0,00	0,03 0,00 0,00 0,00
		0,00 0,00 0,00 0,02	0,01 0,01 0,01 0,02	0,06 0,10 0,02 0,04	0,00 0,00 0,00 0,00	0,00 0,03 0,01 0,00
5	C	0,62 0,73 0,81 0,51	0,80 0,80 0,68 0,50	0,90 0,00 0,56 0,66	0,68 0,80 0,86 1,13	0,79 0,67 0,56 0,66
		0,59 0,75 0,71 0,61	0,87 0,86 0,56 0,62	0,89 0,34 0,62 0,68	1,05 0,93 1,31 0,95	0,60 0,64 0,56 0,58
		0,60 0,60 0,70 0,53	0,84 0,82 0,74 0,57	1,16 0,22 0,56 0,35	0,50 0,54 0,56 0,58	0,54 0,55 0,57 0,57
	M	0,54 0,00 0,60 0,09	0,61 0,59 0,43 0,33	1,11 0,10 0,48 0,40	0,37 0,27 0,37 0,37	0,48 0,51 0,43 0,46
		0,55 0,53 0,59 0,28	0,62 0,57 0,41 0,38	0,86 0,26 0,52 0,08	0,30 0,29 0,34 0,35	0,45 0,46 0,45 0,45
		0,49 0,37 0,46 0,07	0,50 0,48 0,35 0,31	0,97 0,25 0,30 0,32	0,41 0,25 0,33 0,38	0,44 0,49 0,44 0,43
	A	0,00 0,00 0,00 0,05	0,28 0,08 0,28 0,18	0,84 0,22 0,40 0,28	0,00 0,04 0,00 0,02	0,41 0,46 0,39 0,40
		0,00 0,00 0,07 0,04	0,57 0,22 0,33 0,24	0,88 0,15 0,32 0,31	0,03 0,00 0,00 0,03	0,31 0,41 0,30 0,35
		0,00 0,00 0,00 0,12	0,29 0,17 0,02 0,04	1,10 0,48 0,28 0,53	0,00 0,06 0,02 0,02	0,43 0,46 0,27 0,27
6	C	0,92 0,93 0,58 0,86	1,12 1,01 0,80 0,82	1,72 1,25 1,32 1,19	0,78 0,57 0,45 1,27	0,81 0,97 0,67 0,70
		1,07 0,95 0,62 0,74	0,83 1,10 0,67 0,73	1,59 1,24 1,34 1,20	0,45 0,39 0,42 0,57	0,95 0,98 0,81 0,59
		1,09 0,88 0,58 0,61	0,81 1,12 0,75 0,85	1,41 1,09 1,15 0,91	0,43 0,37 0,44 0,52	0,87 0,80 0,75 0,75
	M	1,16 0,89 0,55 0,14	0,93 0,80 0,59 0,62	0,68 0,50 0,51 0,43	0,17 0,24 0,28 0,38	0,75 0,71 0,67 0,68
		1,15 1,02 0,50 0,02	0,75 0,67 0,60 0,61	0,79 0,72 0,76 0,74	0,18 0,16 0,33 0,38	0,76 0,68 0,69 0,64
		1,21 1,10 0,47 1,24	0,71 0,63 0,55 0,58	0,99 0,61 0,71 0,66	0,14 0,22 0,23 0,33	0,70 0,57 0,64 0,52
	A	0,35 1,38 0,25 0,11	0,38 0,28 0,26 0,32	0,05 0,08 0,04 0,13	0,06 0,05 0,04 0,12	0,00 0,03 0,00 0,03
		0,15 0,70 0,19 0,19	0,21 0,06 0,12 0,16	0,70 0,40 0,37 0,36	0,04 0,58 0,11 0,04	0,00 0,00 0,00 0,00
		0,07 0,12 0,14 0,10	0,08 0,10 0,00 0,00	0,77 0,51 0,69 0,68	0,03 0,07 0,03 0,05	0,00 0,00 0,00 0,00

7	C	0,83 0,66 0,86 0,87	1,15 1,15 1,36 1,26	0,66 0,52 0,50 0,50	1,34 0,79 1,05 1,05	0,90 0,81 0,74 0,67
		0,64 0,67 0,75 0,80	0,94 0,86 0,77 0,83	0,45 0,47 0,59 0,58	1,00 0,72 0,74 0,79	0,88 0,73 0,79 0,64
		0,60 0,39 0,43 0,55	0,94 0,84 0,73 0,74	0,52 0,47 0,52 0,55	0,90 0,63 0,68 0,61	0,94 0,72 0,66 0,58
	M	0,60 0,34 0,61 0,37	0,26 0,69 0,44 0,20	0,60 0,48 0,39 0,48	0,88 0,50 0,51 0,47	0,77 0,67 0,59 0,60
		0,70 0,33 0,23 0,26	0,30 0,69 0,28 0,24	0,48 0,48 0,39 0,33	0,78 0,65 0,49 0,45	0,68 0,62 0,56 0,50
		0,57 0,32 0,18 0,27	0,19 0,30 0,20 0,47	0,57 0,48 0,29 0,43	0,67 0,61 0,57 0,35	0,50 0,49 0,48 0,41
	A	0,07 0,36 0,22 0,30	0,35 0,65 0,04 0,34	0,30 0,15 0,22 0,19	0,50 0,16 0,25 0,32	0,35 0,32 0,29 0,25
		0,10 0,22 0,28 0,10	0,28 0,19 0,19 0,26	0,15 0,15 0,23 0,16	0,34 0,25 0,28 0,30	0,14 0,12 0,03 0,08
		0,03 0,06 0,07 0,12	0,18 0,12 0,04 0,15	0,13 0,11 0,04 0,09	0,00 0,00 0,00 0,00	0,00 0,03 0,00 0,00
C	0,34 0,30 0,31 0,31	0,45 0,31 0,45 0,42	0,42 0,48 0,45 0,44	0,41 0,31 0,40 0,00	0,41 0,37 0,43 0,28	
	0,39 0,35 0,32 0,36	0,31 0,26 0,23 0,34	0,48 0,46 0,53 0,45	0,32 0,24 0,32 0,31	0,29 0,27 0,33 0,25	
	0,29 0,35 0,30 0,35	0,33 0,32 0,31 0,36	0,45 0,46 0,46 0,44	0,22 0,10 0,22 0,17	0,18 0,24 0,24 0,00	

8	M	0,28	0,24	0,33	0,30	0,32	0,29	0,20	0,26	0,45	0,35	0,52	0,42	0,13	0,00	0,00	0,12	0,00	0,06	0,07	0,12	
		0,36	0,18	0,27	0,32	0,44	0,24	0,26	0,33	0,60	0,78	0,53	0,43	0,16	0,00	0,11	0,21	0,23	0,00	0,16	0,15	
		0,28	0,26	0,27	0,27	0,33	0,29	0,27	0,29	0,12	0,00	0,17	0,16	0,00	0,00	0,00	0,10	0,00	0,00	0,00	0,00	
	A	0,00	0,00	0,13	0,00	0,46	0,30	0,28	0,35	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
		0,00	0,00	0,03	0,04	0,41	0,28	0,24	0,35	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
		0,05	0,00	0,00	0,00	0,27	0,13	0,12	0,13	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
	9	C	0,61	0,19	0,29	0,26	0,26	0,30	0,29	0,29	0,36	0,44	0,48	0,41	0,38	0,32	0,30	0,34	0,34	0,32	0,35	0,33
			0,10	0,09	0,05	0,04	0,30	0,31	0,30	0,28	0,23	0,45	0,41	0,50	0,29	0,27	0,26	0,28	0,24	0,00	0,00	0,18
			0,10	0,13	0,00	0,00	0,38	0,39	0,32	0,45	0,29	0,30	0,27	0,19	0,28	0,29	0,27	0,30	0,27	0,00	0,00	0,31
M		0,00	0,16	0,19	0,37	0,34	0,27	0,27	0,28	0,14	0,23	0,24	0,19	0,39	0,42	0,37	0,00	0,00	0,00	0,10	0,00	
		0,00	0,00	0,00	0,34	0,29	0,26	0,24	0,29	0,00	0,21	0,11	0,20	0,36	0,51	0,21	0,30	0,00	0,00	0,00	0,00	
		0,12	0,00	0,00	0,26	0,23	0,36	0,29	0,25	0,00	0,13	0,11	0,12	0,37	0,26	0,22	0,19	0,06	0,00	0,03	0,00	
A		0,09	0,00	0,00	0,21	0,00	0,22	0,10	0,20	0,00	0,15	0,00	0,00	0,58	0,00	0,23	0,31	0,00	0,00	0,00	0,00	
		0,11	0,00	0,14	0,00	0,12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,11	0,07	0,52	0,11	0,12	0,23	0,00	0,00	0,00	0,00	
		0,11	0,06	0,00	0,09	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,46	0,11	0,07	0,05	0,07	0,03	0,03	0,02	
10	C	0,32	0,35	0,35	0,32	0,27	0,25	0,30	0,24	0,24	0,30	0,24	0,31	0,65	0,35	0,44	0,34	0,23	0,24	0,25	0,32	
		0,35	0,38	0,36	0,31	0,32	0,29	0,30	0,35	0,30	0,24	0,25	0,27	0,25	0,19	0,22	0,22	0,25	0,16	0,24	0,29	
		0,35	0,34	0,37	0,36	0,31	0,30	0,28	0,24	0,31	0,25	0,20	0,28	0,47	0,34	0,31	0,32	0,28	0,34	0,25	0,35	
	M	0,39	0,45	0,40	0,32	0,30	0,23	0,25	0,30	0,29	0,24	0,26	0,23	0,13	0,06	0,13	0,13	0,06	0,00	0,19	0,20	
		0,57	0,63	0,60	0,49	0,23	0,26	0,30	0,23	0,34	0,31	0,40	0,30	0,07	0,02	0,15	0,19	0,07	0,00	0,22	0,25	
		0,42	0,36	0,43	0,35	0,22	0,18	0,43	0,35	0,34	0,25	0,37	0,25	0,18	0,13	0,18	0,17	0,00	0,00	0,14	0,15	
	A	0,56	0,53	0,48	0,47	0,36	0,20	0,38	0,41	0,39	0,31	0,19	0,20	0,11	0,00	0,02	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	
		0,25	0,11	0,10	0,18	2,19	0,51	0,38	0,37	0,39	0,25	0,29	0,31	0,09	0,00	0,04	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	
		0,52	0,47	0,35	0,42	0,38	0,15	0,35	0,34	0,39	0,33	0,18	0,24	0,09	0,02	0,00	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00	