

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
Faculdade de Odontologia
Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso (TCC)

Influência da ativação ultrassônica do ácido glicólico na
penetração do irrigante nos túbulos dentinários através da
microscopia confocal a laser - estudo *in vitro*

Relatório Final

Apresentado à Faculdade de Odontologia da Universidade de Passo Fundo, como requisito da disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso e para graduação no curso de Odontologia da Universidade de Passo Fundo.

Aluna: Eduarda Reuter

Orientador: Prof. Dr. Matheus Albino Souza

Passo Fundo, Setembro de 2022

Sumário

1. TÍTULO	3
2. EQUIPE EXECUTORA	3
2.1. Aluno	3
2.2. Orientador	3
3. RESUMO	3
4. PROBLEMA DE PESQUISA	4
5. JUSTIFICATIVA	4
6. REVISÃO DE LITERATURA	5
7. OBJETIVOS	9
7.1. Objetivos gerais	9
7.2. Objetivos específicos	9
8. MATERIAIS E MÉTODOS	9
9. RESULTADOS	15
10. DISCUSSÃO	15
11. CONCLUSÃO	16
12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	17
13. AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DO ALUNO	20
14. ANEXOS	21

RELATÓRIO FINAL

1. TÍTULO

Influência da ativação ultrassônica do ácido glicólico na penetração do irrigante nos túbulos dentinários através da microscopia confocal a laser - estudo *in vitro*.

2. EQUIPE EXECUTORA

2.1. Aluna

Nome: Eduarda Reuter

Matrícula: 171203

2.2. Orientador

Nome: Prof. Dr. Matheus Albino Souza

Matrícula: 8948

2.3 Mestrando

Nome: Karolina Frick Bischoff

Matricula: 132392

3. RESUMO

Este estudo tem como objetivo avaliar, *in vitro*, a influência da ativação ultrassônica do ácido glicólico na penetração do irrigante nos túbulos dentinários através da microscopia confocal a laser. Trinta pré-molares inferiores foram obtidos e a porção coronária foi seccionada para que o remanescente radicular tivesse 15 mm. Os mesmos foram instrumentados com Reciproc R25 (VDW), a lavagem final foi realizada com 5ml de soro fisiológico e secos com papel absorvente (Dentsply Maillefer), sendo que, a cada 5ml de irrigante final, teve marcação com rodamina B fluorescente isotiocianato a 0,1% em peso (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). As amostras foram divididas em 3 grupos, seguindo a irrigação final: água destilada, ácido glicólico 17% e ácido glicólico 17% + US, pelo período de 1 minuto cada protocolo. Após a finalização dos protocolos, todos os canais foram aspirados e secos com cones de papel absorvente (Dentsply Maillefer) e seccionados com 500 µm de espessura. As amostras foram examinados por um microscópio confocal a laser (Zeiss LSM-Pascal; Carl Zeiss, Goettingen, Alemanha). As

imagens digitais foram importadas para o Programa ImageJ (software ImageJ, NIH), para análise da penetração no túbulo dentinário. A análise estatística foi realizada com ANOVA e testes Post-Hoc de Tukey ($\alpha= 0,05$). Os resultados mostraram diferença estatisticamente significativa entre o grupo com o ultrassom e os demais grupos ($p<0.05$). Conclui-se que o uso da ativação ultrassônica sobre o ácido glicólico aumenta a capacidade de penetração do irrigante na dentina tubular.

Palavras-chave: ácido glicólico, ultrassom, irrigante para canal radicular.

4. PROBLEMA DE PESQUISA

Durante o preparo químico mecânico, ocorre a liberação de raspas de dentina, que associadas aos componentes orgânicos, microrganismos e substâncias químicas auxiliares, forma a camada de *smear layer* (TORABINEJAD et al., 2002). Dessa forma, o uso de protocolos de irrigação final é necessário no intuito de promover a remoção dessa camada, ao mesmo tempo em que não induza efeitos tóxicos nos tecidos adjacentes e se preserve ao máximo a estrutura dentinária.

O EDTA 17%, irrigante final mais utilizado atualmente em endodontia, possui algumas limitações, dentre as quais se incluem uma limitada ação antimicrobiana contra o biofilme de *Enterococcus faecalis* (DE ALMEIDA et al., 2016), uma reduzida ação de limpeza no terço apical de canais radiculares (KURUVILLA et al., 2015), a redução da microdureza dentinária (ASLANTAS et al., 2014) e o seu efeito tóxico quando em contato com células do tecido conjuntivo (KOLAOUZIDOU et al., 1999; BOTTON et al., 2016). Além disso, uma série de componentes tóxicos são liberados na sua produção, o que pode trazer um impacto prejudicial ao meio ambiente (SILLANPÄÄ, 1997).

5. JUSTIFICATIVA

O Ácido Glicólico vem sendo estudado como uma nova substância irrigadora dos canais radiculares, foi previamente testado no condicionamento ácido de substrato dentinário, utilizado como substituto do ácido fosfórico, se mostrando efetivo no condicionamento e resistência de união semelhante ao ácido fosfórico. Em estudos mais recentes mostrou-se também com excelente capacidade de remoção de *smear layer*, mostrando seu potencial para ser utilizado como um irrigante endodôntico (CECCHIN et al., 2018; BELLO et al., 2019). Também promove de forma efetiva a desmineralização

do esmalte e da dentina, favorecendo a adesão de materiais adesivos nestas superfícies (CECCHIN et al., 2018).

A ativação ultrassônica (US) é uma agitação mecânica de uma substância química, em contato com as paredes do canal radicular. A ação desse dispositivo ultrassônico induz turbulência hidrodinâmica nessa solução dentro do canal radicular, produzindo cavitação e bolhas que irá colidir contra as paredes. Estes elementos aumentam a temperatura e a pressão hidrostática, produzindo ondas que removem a camada de esfregaço pela irrigação contínua com dispositivo de ultrassom (RIBEIRO et al., 2012; VAN DER SLUIS et al., 2007).

No entanto, se torna justificável a busca por novas substâncias irrigadoras, associada a meios auxiliares, que possam se mostrar mais efetivos na sua capacidade de remoção de smear layer, ao mesmo tempo em que preserve a estrutura dentinária para que esta apresente condições favoráveis à adesão do material obturador.

6. REVISÃO DE LITERATURA

CECCHIN, *et al.*, em 2018, analisaram o uso de ácido glicólico como pré tratamento de superfície para restaurações. Foi-se utilizado microscópio eletrônico de varredura para observar o condicionamento do AG em tecidos duros, dois modos de aplicação (esfregando e sem esfregar) para análise da força de ligação do AG sobre dentina e esmalte e três sistemas adesivos Single Bond, One Step Plus e Scotchbond Universal. Referente aos testes, a microdureza foi analisada através da superfície do esmalte e dentina polidas antes e depois do uso de AG 35%, ácido fosfórico 35% ou água destilada por 30s, a resistência de união através do esmalte + dentina e a interação superficial e interfacial através do MEV. O uso de AG e ácido fosfórico diminuíram a microdureza do esmalte e dentina, o MEV mostrou ataque semelhante do AG e ácido fosfórico, embora a camada híbrida do AG fosse mais delgada. Na dentina, a força de união foi semelhante entre as substâncias independentemente da técnica de aplicação, porém no esmalte o AG esfregado mostrou maior resistência de união. Quanto os sistemas adesivos, o AG e ácido fosfórico juntamente com Scotchbond Universal tiveram maior resistência de união quando comparados a Single Bond e One Step Plus. Concluiu-se que o AG condicionou bem o esmalte e dentina e demonstrou resistência de união semelhante a ácido fosfórico.

BELLO, *et al.*, em 2019, analisaram “in vitro” os efeitos do ácido glicólico na microdureza, rugosidade e distribuição do conteúdo mineral na dentina, remoção da

smear layer e citotoxicidade. Foram distribuídos cem dentes em seis grupos de substâncias sendo eles: EDTA 17%, ácido cítrico 10%, AG 5%, 10% e 17% usando como grupo controle a água destilada. Utilizou-se de imagens microscópicas de varredura para análise da smear layer, espectroscopia de raios X por dispersão em energia para análise química, medidas no lúmen no canal para microdureza e rugosidade e a viabilidade celular foi feita com fibroblastos. Concluiu-se então que o ácido glicólico possui capacidade de remoção da smear layer semelhante ao EDTA e ácido cítrico, sem diferença nas concentrações e com potencial como agente endodôntico para irrigação final. Já o AG 17% possui a menor microdureza e a maior rugosidade. Quando a citotoxicidade, o AG e AC são dependentes da dose utilizada.

BELLO, *et al.*, em 2020, examinaram “in vitro”, o ácido glicólico no pó e resistência a flexão da dentina, utilizando a espectroscopia de raios X por dispersão em energia para análise química, sendo que os níveis de pH e tensão do EDTA, ácido cítrico e ácido glicólico foram avaliados em várias temperaturas e épocas. Os feixes de dentina em pó mineralizada foram submetidos a espectroscopia no infravermelho por Fourier para análise da razão apatita / colágeno e teste de flexão de 3 pontos após serem imersos por 1 minuto nas soluções descritas. Concluiu-se que o ácido glicólico pode ser uma boa opção na irrigação final radicular, já que na tensão superficial possui a maior partícula, tensão semelhante ao EDTA e ácido cítrico que diminuem quando em soluções mais concentradas. O AG também apresentou estabilidade no pH em todas as etapas e houve diminuição na relação apatita / colágeno com o aumento da concentração do AG sendo que a força de flexão não foi afetada pela mesma.

RAMACHANDRAN, *et al.*, em 2018, realizaram “in vitro” um estudo afim de avaliar a limpeza dos canais e liberação de íons de cálcio com uso de irrigantes desmineralizantes e uso de ultrassom. Foram utilizados 62 incisivos centrais divididos em grupos de acordo com os irrigantes finais: ácido cítrico 10%, ácido maleico 7%, EDTA 17%, ácido cítrico 10% com ativação US, ácido maleico 7% com ativação US, EDTA 17% com US. Os dados foram analisados em microscópio eletrônico de varredura com base na espectroscopia de emissão atômica com plasma indutivamente acoplada e quantidade de detritos. Os dados concluíram que o ácido cítrico com ativação ultrassônica liberou mais íons de cálcio e removeu o máximo de smear layer, podendo ser uma boa escolha de irrigante.

WIESSE, *et al.*, em 2018, avaliaram “in vitro” a ativação ultrassônica e sônica de dois selantes para adaptação interfacial e resistência de união push-out a dentina do canal

radicular. Foram utilizados 78 caninos irrigados com NaClO 2,5% e EDTA 17%, preenchidos com guta-percha e AH Plus ou MTA Fillapex, os mesmos foram divididos em 3 subgrupos de acordo com a ativação do selante: sem ativação, ativação sônica (NA) e ativação ultrassônica (US). Em 3 amostras de cada subgrupo foi adicionado ao selante rodamina B a 0,1%. Três fatias de 1mm foram obtidas de cada terço da raiz, a primeira e segunda fatia foram usadas para push-out e a terceira para análise da adaptação interfacial com microscópio confocal de varredura a laser (a penetração do selante também foi avaliada neste aparelho). Os resultados foram que o AH Plus possui maior push-out que o MTA Fillapex, UA possui push-out maior que NA e AS, que não mostraram diferenças entre si. O terço cervical apresentou push-out mais elevado que o terço médio e apical. Para os selantes o UA foi o material de enchimento mais homogêneo, com melhor adaptação interfacial e maior preenchimento nos túbulos. Concluiu-se que a ativação ultrassônica possui altos valores de push-out, maior penetração nos túbulos e melhor adaptação interfacial do que a ativação sônica e sem ativação. O AH Plus demonstrou maiores valores de push-out do que MTA Fillapex independente da ativação.

MATOS, *et al.*, em 2019, realizaram um estudo para comparar a eficácia do QMIX e EDTA 17% com irrigação passiva com ultrassom (PUI) ou agitação manual (MA) na redução de *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* e LPS nos canais. Utilizou-se 40 dentes humanos divididos em 4 grupos de acordo com EDTA + MA, QMiX + MA, EDTA + PUI, QMiX + PUI como protocolo de irrigação final. Os dados foram coletados nos canais antes do preparo, após instrumentação, após protocolo final de irrigação e 7 dias depois da irrigação + irrigação final. Concluiu-se que QMiX + MA e QMiX + PUI diminuem em 100% as bactérias *E. coli*, *E. faecalis* e impedem o crescimento de *E. faecalis* após os 7 dias, apresentando melhor eficácia entre os grupos. O EDTA reduziu *E. coli* mas não demonstrou redução da *E. faecalis*. O QMiX + MA ou PUI possuem melhor eficácia quando comparadas ao EDTA. O QMIX + PUI reduziram em 97,61% de LPS eliminando 100% das cepas.

SOUZA, *et al.*, em 2019, realizaram “in vitro” um estudo para analisar a ativação ultrassônica nos irrigantes finais com atividade antimicrobiana, remoção de smear layer e resistência de união. Utilizou-se 180 dentes divididos em três grupos e as amostras subdivididas em seis de acordo com cada tipo de irrigação, podendo ser com água destilada (G1), água destilada + ultrassom (G2), 17% EDTA (G3), QMiX (G4), 17% EDTA + ultrassom (G5), QMiX + ultrassom (G6). Através dos dados observou-se a atividade antimicrobiana pela contagem de unidades formadoras de colônias, remoção de

smear layer com microscópio eletrônico de varredura e teste push-out para resistência de união. A maior redução bacteriana foi registrada pelos grupos 4 e 6. Os grupos 5 e 6 apresentaram maior remoção de smear layer e os grupos 3,4,5 e 6 maior resistência de união. Por fim, o uso de ultrassom não demonstrou melhor eficiência antimicrobiana nem na resistência, porem melhorou a remoção de smear layer.

GU, *et al.*, em 2017, compararam “in vitro”, técnicas de agitação intracanal na penetração de irrigantes e selantes nos túbulos, foram utilizados pré-molares superiores preparados com limas rotativas ProTaper Next, limas NiTi (Dentsply Maillefer) até 4x (tamanho ISO 40) e hipoclorito de sódio com rodamina B para irrigação final associado a agitação convencional (seringa) como grupo controle, sônica, ultrassônica, laser Nd:YAP ou V-Clean. Os canais foram obturados com AH Plus marcado com guta-percha e isotiocianato, seccionados no ápice nos tamanhos de 2, 5 e 8mm e observados com microscópio confocal de varredura a laser. Também se utilizou dos testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney e coeficiente de Spearman para análise da relação irrigante/selante. O estudo mostrou que as agitações sônicas e ultrassônicas apresentam maior profundidade do que o grupo controle a 2mm e houve correlação da penetração dos irrigantes e selantes em todas as técnicas. Conclui-se que o laser Nd: YAP apresentou melhor desempenho comparados as outras técnicas.

MACHADO, *et al.*, em 2017 realizaram estudos afim de comparar a eficácia de soluções quelantes EDTA 17% e ácido cítrico 10% para remoção da smear layer e penetração na dentina. Utilizou-se 60 canais radiculares divididos em 4 grupos de acordo com a irrigação final: agua destilada (G1), hipoclorito de sódio (G2), EDTA 17% (G3) e ácido cítrico 10% (G4) deixando 5 amostras sem serem preenchidas para análise da remoção da smear layer. 10 amostras de cada grupo foram analisadas em microscópio confocal de varredura a laser afim de observar a penetração dos selantes. Fez-se uso também dos testes de Kruskal-Wallis, Dunn e F e Tukey para análise da remoção da smear layer e penetração dos selantes respectivamente. Concluiu-se que o G3 e G4 possuem maior remoção da smear layer e penetração de selantes quando comparados com G1 e G2. A smear layer foi mais removida no terço cervical e médio quando foram utilizadas as soluções quelantes e a penetração dos selantes aumento quando as amostras foram tratadas com ambas as soluções.

GALLER, *et al.*, em 2019, compararam “in vitro” profundidades entre os irrigantes endodônticos nos túbulos dentinários em noventa dentes extraídos preparados utilizando vários métodos de ativação, os mesmos foram divididos em seis grupos, sendo assim:

(G1) ativação dinâmica manual, (G2) Ultrassônico, (G3) Sônica, (G4) PIPS (fluxo fotoacústico induzido por fótons, (G5) SWEEPS (fluxo fotoacústico de emissão aprimorada por ondas de choque) e (G0) controle sem irrigação ou ativação final, e a irrigação final foi feita com EDTA e hipoclorito de sódio. Subsequentemente o azul de metileno foi inserido nos canais e ativado seguindo as técnicas de cada grupo. Todos os dentes preparados foram seccionados e observados em seis seções e vinte e quatro pontos, mostrando que as penetrações medianas foram de 700-900 µm para o grupo IV havendo diferença no terço apical do grupo I e os demais, já as penetrações mínimas foram maiores no terço apical no grupo IV ($P \leq 0,046$). Concluindo maiores profundidades nos terços apicais na ativação ultrassônica, sônica e induzida por laser quando comparadas a ativação dinâmica manual, em contrapartida o modo SWEEPS não apresentou aumento na penetração e o PIPS foi o método que demonstrou possuir a maior profundidade de penetração dos irrigantes na dentina radicular.

7. OBJETIVOS

7.1. Objetivos gerais

Avaliar, *in vitro*, a influência da ativação ultrassônica sobre irrigantes finais na penetração nos túbulos dentinários através da microscopia confocal a laser.

7.2. Objetivos específicos

Avaliar, *in vitro*, influência da ativação ultrassônica sobre o Ácido Glicólico 17%, na penetração nos túbulos dentinários através da microscopia confocal a laser.

8. MATERIAIS E MÉTODOS

8.1 Obtenção e preparo das amostras

Trinta pré-molares inferiores foram obtidos junto ao Biobanco da Faculdade de Odontologia da Universidade de Passo Fundo. A porção coronária foi seccionada na junção amelocementária, de modo que se obteve um remanescente radicular de 15 mm de comprimento. Uma lima tipo K #10 (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça) foi inserida no canal até que a ponta seja vista no forame apical, e o comprimento de trabalho foi estabelecido diminuindo 1mm dessa medida. Os canais radiculares foram preparados usando o sistema Reciproc R25 (VDW). As amostras foram instrumentadas nos três

terços (figura 1), e a cada terço foi interrompida a instrumentação e feita irrigação com 5ml de soro fisiológico. Após o fim da instrumentação foi realizada uma lavagem final com 5 ml de água destilada e secagem com papel absorvente (Dentsply Maillefer). O ápice foi fechado com resina composta para impedir a extrusão do irrigante durante os procedimentos de irrigação.

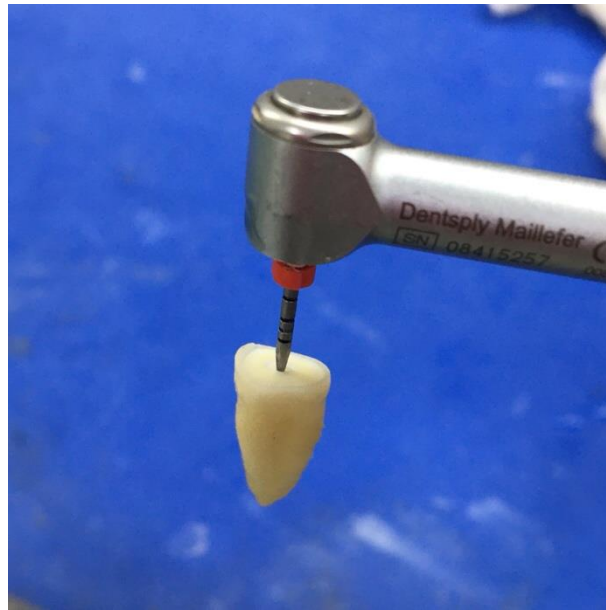


Figura 1: Instrumentação das amostras

8.2 Protocolos de irrigação final

Afim de realizar a fluorescência para ser observado na microscopia confocal de varredura a laser, cada 5 ml do irrigante final foi marcado com rodamina B fluorescente isotiocianato a 0,1% em peso (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Os irrigantes marcados foram submetidos a análise em tensiometro com o'ring método da triplicada para observar se a mistura alterava a tensão superficial (figura 2).



Figura 2: análise da tensão superficial em tensiometro

As amostras foram divididas aleatoriamente em três grupos de acordo com o protocolo final de irrigação (n = 10): G1- Água Destilada, G2 – Ácido glicólico 17% e G3 – Ácido glicólico 17% + US.

Nos grupos onde não foi realizada ativação ultrassônica, os canais radiculares foram preenchidos com 5 ml do irrigante final marcado com Rhodamine B (figura 3), que permaneceu em contato com as paredes do canal pelo período de 1 minuto. Após este período, foi realizada irrigação com 5 ml com soro fisiológico. No grupo onde foi realizada a ativação ultrassônica, os canais radiculares foram preenchidos com o irrigante final marcado com Rhodamine B, uma ponta endodôntica de aço inoxidável foi inserida dois milímetros aquém do comprimento de trabalho, em contato com o irrigante final testado, e ativada por 1 minuto (Nac Plus - Adiel, Ribeirão Preto, SP, Brasil) havendo agitação ultrassônica do mesmo (figura 4). Após este período, foi realizada irrigação com 5 ml de soro fisiológico.

Ao término dos protocolos de irrigação final, os canais radiculares de todos os grupos foram aspirados e secos com cones de papel absorvente (Dentsply Maillefer)



Figura 3: irrigação das amostras



Figura 4: agitação do irrigante com ultrassom

8.3 Observação em Microscopia confocal a laser

Ao final do protocolo de irrigação, as amostras foram seccionadas transversalmente com disco diamantado resfriado com água em baixa velocidade afim de se obter uma porção cervical, media e apical (figura 5). As superfícies das secções foram padronizadas em 500 μm de espessura, polidas com papéis abrasivos de carboneto de silício 1200, 2500 e 4000 (Struers, Westlake, OH).

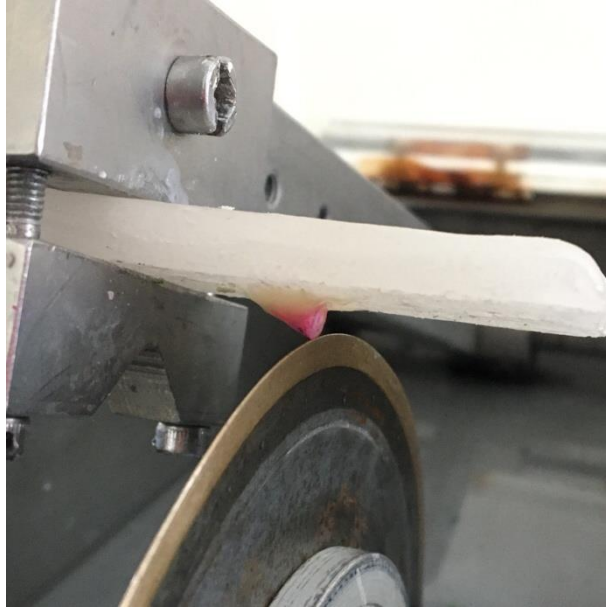


Figura 5: secção das amostras

As amostras foram montados em lâminas de vidro e examinados por um microscópio confocal a laser (Zeiss LSM-Pascal; Carl Zeiss, Goettingen, Alemanha) em $\times 10$ com um comprimento de onda de 560 a 600 nm. As imagens digitais foram importadas para o Programa ImageJ (software ImageJ, NIH) para medir a penetração do túbulo dentinário (figuras 6, 7 e 8) A profundidade de penetração máxima (μm) foi medida através da distância do orifício do túbulo na parede do canal até o ponto mais profundo de penetração ao longo do túbulo dentinário.

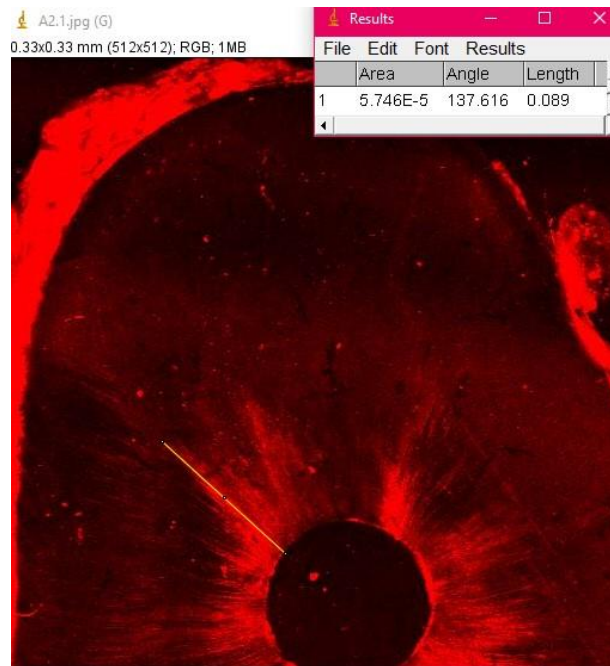


Figura 6: análise no programa imagej (agua destilada)

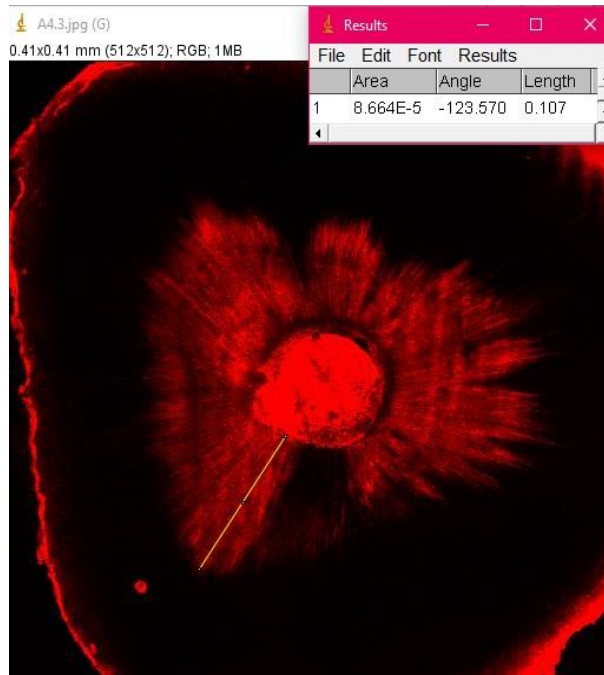


Figura 7: análise no programa imagej (GA)

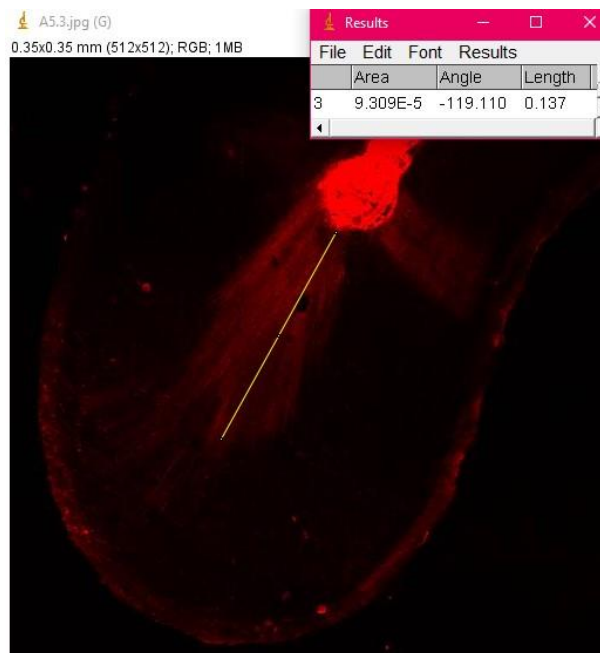


Figura 8: análise no programa imagej (GA+ US)

8.4 Análise estatística

A análise estatística foi realizada através da análise de variância (ANOVA), seguido pelo Post – Hoc de Tukey ($\alpha= 0,05$).

9. RESULTADOS

A média e desvio padrão da profundidade máxima de penetração (μm) nos túbulos dentinários radiculares dos protocolos finais de irrigação testados estão dispostos na tabela 1. Os resultados do presente estudo mostraram que não houve diferença estatisticamente entre o grupo controle de água destilada (DW) e ácido glicólico 17% (GA). Já o grupo com ultrassom (GA+US) apresentou diferença diante dos outros grupos ($p < 0,05$), sendo mais efetivo na penetração do irrigante final nos túbulos dentinários.

Table 1: Média (desvio padrão) da máxima profundidade de penetração (μm) nos túbulos dentinários dos protocolos de irrigação final testados.

Group	Maximum penetration depth (μm)
DW	92.45 (14.04) ^A
17% GA	96.22 (11.79) ^A
17% GA+US	146.08 (12.28) ^B

* Letras maiúsculas diferentes, na coluna, indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$);

** DW = água destilada; GA = ácido glicólico; US = ativação ultrassônica.

10. DISCUSSÃO

No processo de instrumentação dos canais radiculares se forma a smear layer, uma camada de microrganismos, substâncias químicas e raspas de dentina encontrada na superfície dos canais e nos túbulos dentinários devido a agitação de instrumentos, a mesma pode ser encontrada tanto superficialmente e pouco aderida, como em plugs localizados dentro dos túbulos (BELLO et al., 2019). A não remoção da smear layer está associada ao insucesso da endodontia, pois mantém as bactérias no canal e retarda a penetração dentinária de medicações e cimento obturador (TORABINEJAD et al., 2002).

A substância mais utilizada atualmente para remover esta camada é o EDTA 17%, porém o mesmo remove cálcio da dentina o que reduz a microdureza dentinária, causa erosão, possui limitada ação antimicrobiana, baixa limpeza do ápice dentário e por ser artificial possui efeito nocivo para os tecidos periapicais (SARKEES et al, 2020). Diante disso existe a necessidade de novos estudos para suprir esses impasses que podem levar o tratamento endodôntico a falha.

O ácido glicólico é uma substância usada em produtos de beleza que possui baixo peso molecular e é de natureza orgânica. BELLO et al 2019, concluiu que o GA 17% obteve maior rugosidade da superfície final que auxilia na adesão do material obturador, maior redução na microdureza superficial em comparação ao EDTA, menor efeito citotóxico e capacidade de remover a smear layer a um nível semelhante. Estudos sugerem a associação da agitação ao irrigante, a agitação nos canais desempenha um papel crítico na limpeza e desinfecção. Proporciona melhor desbridamento nos 3mm apicais e pode aumentar a penetração do irrigante (GU et al, 2017).

A microscopia confocal a laser é um dos métodos mais usados atualmente para avaliar a penetração de alguma substância nos túbulos dentinários, entretanto nesta metodologia há alguns fatores que podem influenciar a penetração do irrigante: (a) temperatura, tempo de contato e concentração do irrigante. (b) área analisada reduzida quando comparada ao espaço total do canal radicular. (c) túbulos dentinários mais calibrosos na região cervical e media. (d) subjetividade de penetração devido a diferentes interpretações de cada examinador. (e) dentes com curvaturas na raiz podem interferir na penetração do irrigante. (GU et al, 2017.; MACHADO et al, 2017)

O tempo que o irrigante final permanece em contato com a superfície dentária pode interferir na estrutura da dentina. YAMADA et al 1983, afirmou que o uso de 10 ml de EDTA 17% por alguns segundos já apresenta uma superfície essencialmente livre de detritos. Em contra ponto GOLDBERG et al 1982, mostrou que EDTAC em contato por 5 minutos resulta no desaparecimento de uma quantidade de detritos e com 15 minutos a superfície parecia mais limpa. Entretanto ÇALT et al 2002, afirma que apenas 1 minuto é o suficiente para remoção da smear layer e que quando aplicado por mais tempo possui efeitos erosivos e dissolução da dentina.

De acordo com os resultados do presente estudo a penetração nos túbulos dentinários do ácido glicólico foi próximo ao do grupo controle (água destilada). Tal resultado pode ser explicado pela semelhança no valor da tensão superficial indicada pelos testes realizados em tensiometro com o'ring utilizando método da triplicata. Segundo BELLO et al 2019, o ácido glicólico possui a característica de fácil penetração devido ao seu baixo peso molecular.

Uma seringa comum tem a capacidade de irrigar apenas 1mm mais profundo que a ponta da agulha, o que dificulta a irrigação do terço apical (GU et al, 2017). Desta forma se faz necessária a associação de outros métodos para aumentar a irrigação apical. A ativação ultrassônica compreende um dispositivo que é introduzido sem tocar nas paredes

do canal, que promove agitação mecânica de uma substância química e auxilia na sua penetração e limpeza (SOUZA et al, 2019). Os resultados apresentados mostraram que a associação do ácido glicólico 17% + US aumentou a capacidade de penetração do irrigante, tal resultado pode ser explicado pelas vibrações de alta frequência transmitidas ao longo do instrumento (BLANK-GONÇALVES L. M. et al, 2011).

Considerando os estudos apresentados o ácido glicólico 17% se mostra promissor quando comparado aos irrigantes finais utilizados atualmente na prática clínica, visando o benefício do paciente e a longevidade do dente submetido ao tratamento endodôntico. Apesar das limitações do estudo observamos que a utilização da ativação ultrassônica auxilia na penetração da substância escolhida como irrigante final, apresentando bom resultado com pouco tempo de exposição ao agente minimizando efeitos adversos na dentina tubular. Estudos complementares se tornam importantes devido as limitações apresentadas.

11. CONCLUSÃO

Diante das limitações do presente estudo, podemos concluir que a ativação ultrassônica influenciou aumentando a capacidade de penetração do ácido glicólico 17% como irrigante final na profundidade dos túbulos dentinários.

12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASLANTAS E. E.; BUZOGLU D. H.; ALTUNDASAR E.; SERPER A. Effect of EDTA, Sodium Hypochlorite, and Chlorhexidine Gluconate With or Without Surface Modifiers on Dentin Microhardness. *Journal of Endodontics*, v. 40, n. 6, p. 876-879, 2014.

BELLO Y. D., FARINA A. P., SOUZA M. A., CECCHIN D. Glycolic acid: characterization of a new final irrigant and effects on flexural strength and structural integrity of dentin. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. n.106, jan, 2020.

BELLO Y. D., PORSCH H. F., FARINA A. P. Glycolic acid as the final irrigant in endodontics: Mechanical and cytotoxic effects. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. v. 100. 2019.

BLANK-GONÇALVES L. M., NABESHIMA C. K., MARTINS G. H., MACHADO M. E. Qualitative analysis of the removal of the smear layer in the apical third of curved roots: conventional irrigation versus activation systems. *J Endod.* v.37, n.9, 2011.

BOTTON G.; PIRES C. W.; CADONÁ F. C.; MACHADO A. K.; AZZOLIN V. F.; CRUZ I. B. M.; SAGRILLO M. R.; PRAETZEL J. R. Toxicity of Irrigating Solutions and Pharmacological Associations Used in Pulpectomy of Primary Teeth. *Internacional Endodontic Journal*, v. 49, n.8, p. 746-754, 2016.

CALT S, SERPER A. Time-dependent effects of EDTA on dentin structures. *J Endod.* v. 28, n. 8, 2002.

CECCHIN D, FARINA A. P., VIDAL C., BEDRAN-RUSSOA. K. A novel enamel and dentin etching protocol using α -hydroxy glycolic acid: surface property, etching pattern, and bond strength studies. *Oper Dent.* v.1, n.43, Jan-Feb, 2018.

DE ALMEIDA J.; HOOGENKAMP M.; FELIPPE W. T.; CRIELAARD W.; VAN DER WAAL S. V. Effectiveness of EDTA and Modified Salt Solution to Detach and Kill Cells fom *Enterococcus faecalis* Biofilm. *Journal of Endodontics*, v. 42, n. 2, p. 320-3, 2016.

GALLER K. M., GRUBMULLER V., SCHLICHTING R., et al. Penetration depth of irrigants into root dentine after sonic, ultrasonic and photoacoustic activation. *Int Endod J.* v. 52, n. 8, 2019.

GOLDBERG F., SPIELBERG C., The effect of EDTAC and the variation of its working time analyzed with scanning electron microscopy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* V. 53, n. 1, 1982.

GU Y.; PERINPANAYAGAM H.; KUM D.J.W.; YOO Y-J.; JEONG J-S.; LIM S-M.; CHANG S-W.; BAEK A-H.; ZHU Q.; KUM K-Y. Effect of different agitation techniques on the penetration of irrigant and aealer into dentinal tubules. *Photomed Laser Surg.* v.2, n.35, feb, 2017.

KOULAOUZIDOU E.; MARGELOS J.; BELTES P.; KORTSARIS A. H. Cytotoxic Effects of Different Concentrations of Neutral and Alkaline EDTA Solutions Used as Root Canal Irrigants. *Journal of Endodontics*, v. 25, n. 1, p. 21-3, 1999.

KURUVILLA A.; JAGANATH B. M.; KRISHNEGOWDA S. C.; RAMACHANDRA P. K. M.; JOHNS D. A.; ABRAHAM A. A Comparative Evaluation of Smear Layer Removal by Using Edta, Etidronic Acid, and Maleic Acid as Root Canal Irrigants: An in Vitro Scanning Electron Microscopic Study. *Journal Conservative Dentistry*, v. 18, n. 3, p. 247-251, 2015.

MACHADO R., GARCIA L. D. F. R., SILVA NETO U. X., CRUZ FILHO A. M. D., SILVA R. G., VANSAN L. P. Evaluation of 17% EDTA and 10% citric acid in smear layer removal and tubular dentin sealer penetration. *Microsc Res Tech*. v. 81, n.3. 2018.

MATOS F. S., KHOURY R. D., CARVALHO C. A. T., MARTINHO F. C., BRESCIANI E., VALERA M. C. Effect of EDTA and QMIX ultrasonic activation on the reduction of microorganisms and endotoxins in ex vivo human root canals. *Brazilian Dental Journal*. v.3, n.30. jun, 2019.

RAMANCHANDRAN N., PODAR R., SINGH S., KULKARNI G., DADU S. Effect of ultrasonic activation on calcium ion quantification, smear layer removal, and canal cleaning efficacy of demineralizing irrigants. *J Conserv Dent*, v.5, n.21, sep-oct, 2018.

RIBEIRO E. M.; SILVA-SOUZA Y. T. C.; SOUZA-GABRIEL A. E.; SOUSA-NETO M. D.; LORENCETTI K. T.; SILVA S. R. C. Debris and Smear Removal in Flattened Root Canals After Use of Different Irrigant Agitation Protocols. *Microscopy Research and Technique*, v. 75, n. 6, p. 781-790, 2012.

SARKEES M., AI-MAARRAWI K. Qitosana: A natural substitute of EDTA solution for final irrigation in endodontics treatment. *Nigerian Journal of Clinical Practice*, v. 23, p. 697-703, 2020.

SILLANPÄÄ M. Environmental fate of EDTA and DTPA. Reviews of environmental contamination and toxicology, v. 152, p. 85-111, 1997.

SOUZA M. A., HOFFMANN I. P., MENCHIK V. H. S., ZANDONA J., DIAS C. T., PALHANO H. S., BERTOL C. D., ROSSATO-GRANDO L. G. Influence of ultrasonic activation using different final irrigants on antimicrobial activity, smear layer removal and bond strength of filling material. Aust Endod J. v.45, n.2, 2019.

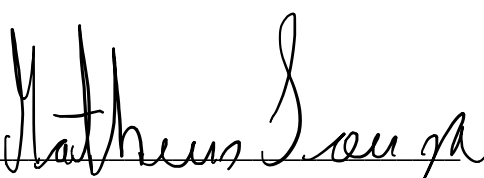
TORABINEJAD M.; HANDYSIDES R.; KHADEMI A. A.; BAKLAND L. K. Clinical implications of the smear layer in endodontics. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics, v. 94, n. 6, p. 558-566, 2002.

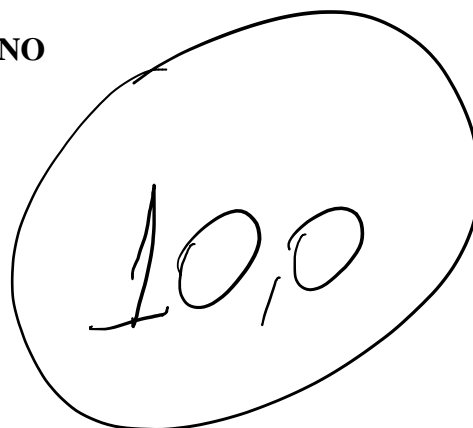
VAN DER SLUIS L. W. M.; VERSLUIS M.; WU M. K.; WESSELINK P. R. Passive Ultrasonic Irrigation of the Root Canal: A Review of the Literature. International Endodontic Journal, v. 40, n. 6, p. 415-426, 2007.

WIESSE P. E. B., SILVA SOUZA Y. T., PEREIRA R. D., ESTRELA C., DOMINGUES L. M., PÉCORÁ J. D., SOUSA-NETOM. D. Effect of ultrasonic and sonic activation of root canal sealers on the push-out bond strength and interfacial adaptation to root canal dentine. *Int Endod J.* v.1, n.51, jan, 2018.

YAMADA R. S., ARMAS A., GOLDMAN M., LIN P.S. A scanning electron microscopic comparison of a high volume final flush with several irrigating solutions: Part 3. *J Endod.* v. 9, N. 4, 1983.

13. AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DO ALUNO


Prof. Dr. Matheus A. Souza



14. ANEXOS

UNIVERSIDADE DE PASSO
FUNDO/ VICE-REITORIA DE
PESQUISA E PÓS-
GRADUAÇÃO - VRPPG/ UPF



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da influência da ativação ultrassônica do ácido glicólico 17% nas diferentes propriedades da dentina no tratamento endodôntico.

Pesquisador: karolina frick bischoff

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 39931620.9.0000.5342

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.436.756

Apresentação do Projeto:

Durante o preparo químico mecânico, ocorre a liberação de raspas de dentina, que, associadas aos componentes orgânicos, microorganismos e substâncias químicas auxiliares, forma a camada de smear layer. Dessa forma, o uso de protocolos de irrigação final são necessários, no intuito de promover a remoção dessa camada, ao mesmo tempo em que não induza efeitos tóxicos nos tecidos adjacentes e se preserve ao máximo a estrutura dentinária.

Objetivo da Pesquisa:

O estudo tem como objetivo avaliar, in vitro, a influência da irrigação final com ácido glicólico 17% associado ou não ao uso do ultrassom nas diferentes propriedades da estrutura dentária durante o tratamento endodôntico.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo os pesquisadores, a pesquisa oferece riscos mínimo pois se trata de dentes extraídos obtidos do biobanco de dentes. Como benefício para a comunidade científica e acadêmica citam o conhecimento de um novo irrigante final, que poderá ser utilizado na endodontia.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O estudo é uma pesquisa experimental laboratorial com dentes humanos e bovinos. O experimento com dentes humanos envolve a obtenção de 300 dentes unirradiculares humanos extraídos que serão utilizados para 4 diferentes testes: avaliação da microdureza dentinária,

Endereço: BR 285- Km 292 Campus I - Centro Administrativo/Reitoria 4 andar

Bairro: São José

CEP: 99.052-900

UF: RS

Município: PASSO FUNDO

Telefone: (54)3316-8157

E-mail: cep@upf.br

UNIVERSIDADE DE PASSO
FUNDO/ VICE-REITORIA DE
PESQUISA E PÓS-
GRADUAÇÃO - VRPPG/ UPF



Continuação do Parecer: 4.436.756

avaliação da resistência de união do material obturador à dentina radicular e avaliação da resistência de união do material restaurador com pino de fibra de vidro, ambos através do teste de push out, e para avaliação da penetrabilidade do irrigante através da microscopia confocal a laser.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O protocolo foi instruído e apresentado de maneira completa e adequada. Os compromissos do pesquisador e das instituições estavam presentes. O projeto foi considerado claro em seus aspectos científicos e metodológicos.

Recomendações:

Após o término da pesquisa, o CEP UPF solicita: a) A devolução dos resultados do estudo aos sujeitos da pesquisa ou a instituição que forneceu os dados; b) Enviar o relatório final da pesquisa, pela plataforma, utilizando a opção, no final da página "Enviar Notificação"+ relatório final.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto, este Comitê, de acordo com as atribuições definidas na Resolução n. 466/12, do Conselho Nacional da Saúde, Ministério da Saúde, Brasil, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa na forma como foi proposto.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1656466.pdf	29/11/2020 17:11:53		Aceito
Folha de Rosto	BRN30055C8AD81E_017180.pdf	05/11/2020 16:43:59	karolina frick bischoff	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tleausencia.docx	29/10/2020 14:55:34	karolina frick bischoff	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	tese.docx	29/10/2020 14:49:21	karolina frick bischoff	Aceito
Outros	pesqniciada.pdf	29/10/2020 14:48:15	karolina frick bischoff	Aceito
Outros	biobanco.pdf	29/10/2020 14:47:04	karolina frick bischoff	Aceito
Declaração de Instituição e	autorizacaoprevia.pdf	29/10/2020 14:46:34	karolina frick bischoff	Aceito

Endereço: BR 285- Km 292 Campus I - Centro Administrativo/Reitoria 4 andar
Bairro: São José **CEP:** 99.052-900
UF: RS **Município:** PASSO FUNDO
Telefone: (54)3316-8157 **E-mail:** cep@upf.br

UNIVERSIDADE DE PASSO
FUNDO/ VICE-REITORIA DE
PESQUISA E PÓS-
GRADUAÇÃO - VRPPG/ UPF



Continuação do Parecer: 4.436.756

Infraestrutura	autorizacaoprevia.pdf	29/10/2020 14:46:34	karolina frick bischoff	Aceito
Declaração de concordância	autorizacaopesquisa.pdf	29/10/2020 14:45:47	karolina frick bischoff	Aceito
Orçamento	ORCAMENTO.docx	29/10/2020 14:45:33	karolina frick bischoff	Aceito
Cronograma	cronograma.docx	29/10/2020 14:45:04	karolina frick bischoff	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PASSO FUNDO, 03 de Dezembro de 2020

Assinado por:
Felipe Cittolin Abal
(Coordenador(a))

Endereço: BR 285- Km 292 Campus I - Centro Administrativo/Reitoria 4 andar
Bairro: São José **CEP:** 99.052-900
UF: RS **Município:** PASSO FUNDO
Telefone: (54)3316-8157 **E-mail:** cep@upf.br

Effectiveness of ultrasonic activation over glycolic acid on the microhardness, cohesive strength, flexural strength and fracture resistance of root dentin

Running Head: The influence of ultrasonic activation over glycolic acid on root dentin.

Article Category: Original Article

Matheus Albino Souza¹, Rafaela Ricci¹, Karolina Frick Bischoff¹, Eduarda Reuter¹, Eduarda Rizzon Ferreira¹, Felipe Gomes Dallepiane¹, Laura Mezzalira Quevedo¹, Luiz Henrique Bergoli Pereira¹, Luiza Frick Bischoff¹, Mariana Gabriela Hofstetter¹, Mariana Patussi Brammer¹, Natália Miranda Bernardes¹, Juliane Bervian¹

From of ¹ School of Dentistry, University of Passo Fundo, Passo Fundo, RS, Brazil.

Corresponding Author: Matheus Albino Souza, Post-Graduate Program in Dentistry, University of Passo Fundo, BR 285/São José, Building A7, Suite 2, Zip code: 99052-900, Passo Fundo-RS-Brazil. Telephone: +55 54 3316-8402. E-mail: matheus292@yahoo.com.br or matheussouza@upf.br

Abstract

Objectives: This study evaluated the effectiveness of US over GA on the microhardness, cohesive strength, flexural strength and fracture resistance of root dentin.

Methods: The samples obtained from 140 extracted bovine teeth were distributed into four test groups: microhardness (50 teeth), cohesive strength (15 teeth), flexural strength (15 teeth) and fracture resistance (60 teeth). In all four tests, specimens were subdivided

into five groups, according to final irrigation protocols: G1: DW; G2: EDTA; G3: GA; G4: EDTA+US; G5: GA+US. After the irrigation protocols, the Vickers tester was used to evaluate the microhardness and the universal testing machine was used to evaluate the cohesive strength, flexural strength and fracture resistance of root dentin. The one-way ANOVA test and the Tukey HSD were used for multiple comparison tests in all evaluations ($\alpha=5\%$).

Results: In general, groups 2 (EDTA), 4 (EDTA+US) and 5 (GA+US) promoted the highest reduction of microhardness, being statistically different to other groups ($p<0.05$). The cohesive strength, flexural strength and fracture resistance data revealed that no differences between the groups were observed ($p>0.05$).

Conclusions: The association of GA and US results on reduction of microhardness, with no influence in the cohesive strength, flexural strength and fracture resistance of root dentin.

Clinical significance: GA + US is an alternative of final irrigation protocol.

Keywords: dentin structure, EDTA, glycolic acid, ultrasonic activation.

Introduction

Microorganisms are the main etiologic agents of pulp and periapical pathologies. Furthermore, several anatomical variables have been found within the root canal system, corresponding to spaces that are widely propitious for their colonization and proliferation (1). Thus, the chemo-mechanical preparation associated with auxiliary resources are essential to promote an effective elimination of microorganisms from root canal system. During this stage, the smear layer is produced, being composed by organic and inorganic material, bacteria and their by-products. It prevents the penetration of intracanal agents in the depth of dentinal tubules and influence the adhesion of filling materials to canal walls (2). Thus, it is mandatory the smear layer removal by using chemical agents and auxiliary resources.

Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) is a chelating agent with recognized ability to promote smear layer removal (3). At the same time, EDTA induces cytotoxic effects in the periapical tissues (4) and significant modifications in the structure and mechanical properties of root dentin (5,6). This led to the search for new alternatives for final irrigants in endodontics. Glycolic acid (GA) was initially tested in the dentistry as a surface pretreatment agent for dental restorative applications, presenting effective results in the etching of enamel and dentin surfaces (7). After this, GA revealed effectiveness for smear layer removal and lower cytotoxicity when compared to EDTA (8), as well as preservation of root dentin structure (9). In common, this chemical agents present low effectiveness to promote smear layer removal in the apical third of root canal (8,10), bringing the need to use auxiliary resources for this proposal.

Several activation techniques have been used in the endodontics to improve the effectiveness and delivery of chemical agents in the root canal system. The ultrasonic activation (US) is performed by acoustic streaming transmitted from an oscillating tip

connected at ultrasonic device. It enhances the hydrostatic pressure and temperature of irrigant solutions, inducing hydrodynamic turbulence and higher smear layer removal when compared to conventional irrigation protocols (11). Moreover, Machado et al. (12) revealed that chelating ability of irrigant solutions associated to concomitant use of US is essential to the proper filling of root canal system. In this scenario, the use of activation techniques also improve the penetration of irrigant solutions on dentin structure (8). However, the impact of this association on mechanical properties of root dentin has not yet been well elucidated in the literature, specially when GA and US are associated.

The aim of this study was to evaluate the effectiveness of US over GA on the microhardness, cohesive strength, flexural strength and fracture resistance of root dentin. The hypotheses were that this association (i) does not promote significant modification on the microhardness, (ii) cohesive strength, (iii) flexural strength and (iv) fracture resistance of root dentin.

Materials and Methods

The study was not be submitted to the Ethics Committee for the Use of Animals, due to the fact that the samples were composed of extracted bovine teeth that would be discarded. For this study, 140 bovine teeth from animals slaughtered for commercial purposes were used. All selected teeth were intact, with straight roots and formed root apex. After extraction, the teeth were cleaned with periodontal instruments, immersed in 0.9% saline and stored under refrigeration for a maximum of 3 months before use.

Microhardness

Fifty extracted bovine teeth were used for this evaluation. Dental crowns were sectioned with a diamond disc, obtaining 15-mm length roots. All roots were prepared up to the apical foramen with #45 K-files (Dentsply Sirona, Tulsa, OK, United States) and distilled water (DW) in order to remove pulp tissue and to standardize the canal diameter. Subsequently, two longitudinal grooves were made in the external root surface using a diamond disc, without reaching the canal space. Roots were split into two halves with microtome slides, totalizing 100 samples. The convex surface covered with cement was planned with a diamond drill, maintaining 2 mm thickness between the worn surface and the root canal lumen. The dentin layer between the root canal lumen and the cementum was also abraded with approximately 45° angulation to facilitate the polishing of the root canal and its visualization in the microhardness tester.

All samples were fixed in acrylic resin blocks, leaving the root dentin exposed upwards, polished with silicon carbide abrasive paper (180, 320 and 600 grit) and 0.25-mm diamond polishing paper (Metkon, Bursa, Turkey) under cooling with DW, washed with DW and dried with aspiration cannula. After this, the samples were divided into 5 groups (n=20), according to tested irrigation protocol: G1 – DW; G2 – 17% EDTA; G3 – 17% GA; G4 – 17% EDTA + US; G5 – 17% GA + US.

In groups with no US, samples were placed in plastic tubes and completely covered with 3 mL of the tested solution. The contact time was 1 minute. In groups with US, it was performed the same procedure, with the tested solution being activated by US for 1 minute. The US was performed using ultrasonic device (Nac Plus Ultrasonics, Adiel, Ribeirão Preto, SP, Brazil) and stainless-steel E1-irrisonic endodontic tip (Helse Ultrasonic, Ribeirão Preto, SP, Brazil), with active portion of 16 mm in length, 2 mm in diameter and 0.01 ISO taper. The tip was inserted into the plastic tube containing the tested solution and activated for 1 min. Scale power 1 for endodontics (10% power) was

used for US. After irrigation protocols, the samples were washed with 5 mL of DW and dried with aspiration cannula.

Microhardness was measured after irrigation protocols, by using Durascan 20 Vickers tester (HMV-2000, Shimadzu, Kyoto, Japão) at 40x magnification, 300-g load and 20-second dwell time. Three indentations were made along parallel lines to the edge of the root canal lumen, being the first 1.000 μm from the root canal entrance, and two other at distance of 200 μm from each other. The microhardness value for each specimen was obtained as the average value obtained for the three indentations.

Cohesive strength

Fifteen extracted bovine teeth were used for this evaluation. After coronal section, the roots were sectioned along the long axis of the tooth and a perpendicular cut to the long axis was performed on both halves to produce 4 fragments of root dentin. The specimens were manually cut into an hourglass shape using a cylindrical drill with a cross-sectional area of approximately 0.8 mm^2 . In total, 60 hourglass-shaped dentin samples were obtained, being distributed in the same previously described groups (n=12) and submitted to the same irrigation protocols.

Following, each specimen was fixed on a microtensile test loop with cyanoacrylate (Loctite Super Bonder; Henkel Loctite Corporation, Rocky Hill, CT, USA) and submitted to a cohesive load at 0.5 mm/min in an universal machine test (EMIC DL 2000, São José dos Pinhais, PR, Brazil). The cross-sectional area at the fracture site was measured with a digital caliper and the cohesive strength was calculated by the following formula: $\sigma = F/A$, where σ represents the maximum cohesive strength, F (N) represents the force used and A (mm^2) represents the area at the fracture site. The obtained data were expressed in megapascals (Mpa).

Flexural strength

Fifteen extracted bovine teeth were used for this evaluation. After coronal section, the roots were sectioned along the tooth long axis to produce the dentin laminae, which needed to be sanded using abrasive sandpapers with 500, 800, 1000 and 1200 grit (3 M ESPE, St. Paul, MN, USA) to obtain 60 dentin sticks in a rectangular shape (0.18 mm thick x 1.8 mm wide x 5.0 mm long). The 60 dentin sticks were distributed in the same previously described groups (n=12) and submitted to the same irrigation protocols.

The flexural strength test was performed using a miniature three-point device with a 3 mm support extension, in which each toothpick was inserted into the support span. A load was applied to the central portion of the toothpick using a universal testing machine (EMIC DL 2000) at a speed of 0.5 mm/min until the fracture occurred. The flexural strength was calculated using the formula $3 PL / 2bh^2$, where P = maximum load until the moment of fracture (N), L = distance between the support points (mm), b = sample width (mm) and h = sample height (mm). The obtained data were expressed in MPa.

Fracture resistance

Sixty extracted bovine teeth were used for this evaluation. After coronal section, 15 mm long straight roots were obtained. To standardise the roots, reference markings were made on the root surfaces using an overhead projector pen, of which the location was obtained using a digital pachymeter ruler. The first mark was made 2 mm below the uppercut, the second 2 mm above the root apex and the third mark at mid-distance between the two marks. The buccolingual diameter was 6.5 mm in the cervical third, 5.5 mm in the middle third and 4 mm in the apical third, and the mesio-distal diameter was 5.0 mm in the cervical third, 4.5 mm in the middle third and 3.5 mm in the apical third.

The root canals were scaled with the aid of a cylindrical diamond bur no. 1090 (KG Sorensen, São Paulo, SP, Brazil). During this procedure, constant measurements were performed with a digital pachymeter adapted for internal canals, until dentin walls of 1 mm thick were obtained in all roots, and DW was used to remove remnants from the root canal preparation.

The roots were embedded in acrylic resin using 1/2 inch thick and 20 mm long plastic cylindrical PVC moulds (Tigre do Brasil, Osasco, SP, Brazil), maintaining a root exposure of 3 mm to simulate the biological space. The 60 roots were distributed in the same previously described groups (n=12) and submitted to the same irrigation protocols. In groups with no US, the root canals were filled with the tested solution, until extravasation to the root canal entrance. The contact time was 1 minute. In groups with US, it was performed the same procedure, with the tested solution being activated by US for 1 minute. The US was performed, by using the same parameters, as previously described. The tip was inserted 2mm short to the root canal apex, in contact with tested solution, and activated for 1 min. After irrigation protocols, the samples were washed with 5 mL of DW and dried with aspiration cannula.

Then, the specimens were positioned in the lower part of the universal testing machine (EMIC DL 2000), and a compressive load was applied vertically to the coronal surface of the roots with a loading speed of 1 mm/ min until fracture. The load at which fracture occurred was recorded and expressed in Newtons (N).

Statistical analysis

The Kolmogorov–Smirnov test for normality was used. The one-way ANOVA test and the Tukey HSD were used for multiple comparison tests in all evaluations ($\alpha=5\%$).

All statistical analyses were performed using the Stat Plus software (Stat Plus Analyst Soft Inc. version 6.0, Vancouver, BC, Canada).

Results

The mean and standard deviation of microhardness, cohesive strength (Mpa), flexural strength (Mpa) and fracture resistance (N) are presented in Table 1.

The microhardness data showed a statistically significant difference between the groups, where the 17% EDTA, 17% EDTA + US and 17% GA + US groups had significantly reduced microhardness values when compared to the control group and 17% GA groups ($p < 0.05$). The cohesive strength, flexural strength and fracture resistance data revealed that no differences between the groups, with the tested irrigation protocols presenting similar results to control group ($p > 0.05$).

Discussion

The smear layer removal is essential during endodontic treatment, in order to promote cleaning and adhesion of filling materials to the root canal walls (2). At the same time, the use of chemical substances for this purpose induces significant changes in the dentin structure (6,9). The reduction of dentin microhardness results in a less tough and a more brittle substrate, that might precipitate fatigue crack propagation during cyclic stresses (13). The reduction of flexural strength results in a lower stress that a dental structure can be submitted before fracture (14) and the reduction of cohesive strength interferes in the hard connective tissues and elasticity modulus (15). Finally, the reduction of fracture resistance leads to propagation of cracks and erosion in peritubular and intertubular dentin (16). Then, the modification of all these mechanical properties increases the susceptibility to vertical root fracture (13). However, information is lacking

about the influence of US over GA on these properties of root dentin. For these reasons, the present study aimed to evaluate the impact of this final irrigation protocol on the mechanical properties of root dentin.

The present study proposed the evaluation of a GA-based final irrigant associated with US, comparing with EDTA, the most conventional final irrigant used in endodontics. According to previous studies, the GA revealed effectiveness in the smear layer removal, preservation of dentin structure and some advantages in relation to EDTA (8,9). At the same time, it is known that US improve the action and penetration of irrigant solutions into the dentin structure (8). But, the impact of US over GA in the mechanical properties of root dentin is unknown and not well elucidated in the literature. Çalt & Serper (17) showed that a short period time is enough to promote effective smear layer removal and long time exposure to chelating agents induces significant modification in the root dentin. Cruz-Filho et al. (18) reported that modifications in the root dentin can be observed within the first minute after application of EDTA. Thus, the final irrigation time of the tested protocols was set at 1 minute in the present study.

The effects of final irrigants on dentin microhardness can be evaluated by using different methods, being the Knoop and Vickers microhardness tester the most usual devices in this proposal. The Vickers indentation method provides higher measurement range and sensitivity when equal loads are applied in the dentin surface. In addition, indentations must be performed along parallel lines to the edge of the root canal lumen, because the microhardness values decrease close to the pulp tissue (18). Thus, the indentations from root canal entrance were performed with the Vickers microhardness tester in the present study. Regarding the another mechanical properties evaluation, all samples were prepared and all methods were performed with basis in a previous study, which evaluated the effect of GA and EDTA on dentin mechanical properties, with no

US, by testing the dentin cohesive and flexural strength, as well as the root fracture resistance, in the universal testing machine (6). According to literature, it is a commonly used method, compatible with the clinical situation and induces less stress to dentin structure (6,16,19).

According to results of present study, the EDTA group promoted a higher microhardness reduction when compared to GA group. Similar results were found in previous studies, where the use of EDTA reduced significantly the dentin microhardness (5,18,19,20). The EDTA has recognized potential to promote demineralization of the inorganic components of dentin by chelating calcium ions. Consequently, an adverse softening potential is induced on the calcified components of dentin promoting this reduction (18). At the same time, the use of US over GA improved the reduction of the dentin microhardness, when compared to using alone of GA, rejecting the first hypothesis of present study. As previously described, the US improves the the ability of irrigant solutions to penetrate into the dentin structure (8,11,12). Thus, it can be the explanation for these results.

Although there were significant differences between the tested groups, the dentin microhardness values of EDTA, EDTA+US and GA+US groups were approximately close to control and GA groups, which can reveal a superficial reduction of dentin microhardness. According to literature, it could be beneficial under clinical conditions as it would allow easier access and instrumentation a of tight root canals (20), does not inducing severe damage to dentin structure. In addition, the use of US over the tested final irrigants did not promote significant modification on the cohesive strength and flexural strength of root dentin, confirming the second and third hypotheses of present study. These results can be explained by the methodology used in the present study. The tip was inserted into the plastic tube containing the root samples and tested final irrigants. Thus,

the irrigant solutions could not be driven against the root canal walls, favoring the penetration into the root dentin. Moreover, the short time of exposure set at 1 minute could not be enough to promote depth modifications in the flexural strength and cohesive strength of root dentin, being not in accordance with results found by de Andrade Marafiga et al. (6). However, in this cited study, the EDTA and GA were used in direct contact with the sample for 5 minutes, revealing significant decreasing of these mechanical properties of root dentin.

Root fracture is a common clinical situation in everyday endodontic practice, being related to the fracture resistance of root dentin. Roots with thin dentinal walls are more prone to fracture due to the lack of adequate structural support (21). In addition, the adhesion of the filling materials to root canal walls decreases in these situations, which can result in fracture strength reduction (22). It is known that this mechanical property is directly related to some factors, including the influence of chemical substances inside the root canal. The chelating agents used for smear layer removal may alter the chemical composition of dentine, compromising the fracture resistance of root dentin (23). However, the results of present study showed that tested final irrigation protocols did not promote modifications in the fracture resistance of root dentin, even when US was used, confirming the fourth hypotheses of present study. Since previous study revealed effective smear layer removal by using GA (8), it means that association of GA+US could be an effective alternative in this proposal, at the the same time that also preserves the mechanical properties of root dentin.

The GA has significant ability to promote smear layer removal (8), being the main proposal of the final irrigants. Moreover, the small size of GA molecules and its acidic pH contributes to an effective penetration and demineralization of root dentin (9). Further this important ability, the GA presents low cytotoxicity and does not induce several

damages to dentin mechanical properties (9). These are some advantages when GA is compared to conventional final irrigants, such as EDTA. The EDTA is the most used final irrigant in the endodontic therapy, decalcifying root dentin and providing effective removal of smear layer (3). In the other side, some disadvantages were revealed when EDTA was used as final irrigant, such as low effectiveness for smear layer removal in the apical third (24), cytotoxicity (4) and induction of modifications on root dentin structure (5,6), which can compromise the success of endodontic therapy.

The association of GA and US promotes superficial reduction of microhardness and preserves the cohesive strength, flexural strength and fracture resistance of root dentin, according to results of present study. Although improvement of irrigant solution penetration in the depth of dentin structure is recognized by using the US (12), modifications on mechanical properties of root dentin were not observed in the present study. The short time of exposure to GA and cycles of US may have played a key role in these results. But, it is possible to hypothesize that a cleaner root canal wall can be obtained, with dispersed collagen, favoring the adhesion of the filling/restorative material to the root dentin. In this scenario, US is essential to obtain these results in all thirds of root canal. Thus, the present study suggest the use of GA+US as an alternative that preserves important mechanical properties of root dentin during the smear layer removal from root canal walls.

Conclusion

Under the study limitations, it was possible to conclude that the association of GA and US results on superficial reduction of root dentin microhardness and preservation of cohesive strength, flexural strength and fracture resistance of root dentin.

Compliance with Ethical Standards

Conflict of Interest: The authors have no conflict of interest.

Ethical Approval: All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed.

Funding: The work was having no financial support.

Informed consent: Informed consent is not applicable.

References

1. Matherne RP, Angelopoulos C, Kulild JC, Tira D. Use of cone-beam computed tomography to identify root canal systems in vitro. *J Endod* 2008; 34: 87–89.
2. Violich DR, Chandler NP. The smear layer in endodontics - a review. *Int Endod J* 2010; 43: 2-15.
3. Deari S, Mohn D, Zehnder M. Dentine decalcification and smear layer removal by different ethylenediaminetetraacetic acid and 1-hydroxyethane-1,1-diphosphonic acid species. *Int Endod J* 2019;52:237-243.

4. Amaral KF, Rogero MM, Fock RA, Borelli P, Gavini G. Cytotoxicity analysis of EDTA and citric acid applied on murine resident macrophages culture. *Int Endod J* 2007;40:338-343.
5. Ghisi AC, Kopper PM, Baldasso FE, Stürmer CP, Rossi-Fedele G, Steier L, Figueiredo JA, Morgental RD, Vier-Pelisser FV. Effect of super-oxidized water, sodium hypochlorite and EDTA on dentin microhardness. *Braz Dent J* 2014;25:420-424.
6. de Andrade Marafiga F, Barbosa AFA, Silva EJNL, Souza MA, Farina AP, Cecchin D. Effect of glycolic acid and EDTA on dentin mechanical properties. *Aust Endod J* 2022;48:27-31.
7. Cecchin D, Farina AP, Vidal CMP, Bedran-Russo AK. A novel enamel and dentin etching protocol using α -hydroxy glycolic acid: surface property, etching pattern, and bond strength studies. *Oper Dent* 2018; 43:101–110.
8. Bello YD, Porsch HF, Farina AP, Souza MA, Silva EJNL, Bedran-Russo AK, Cecchin D. Glycolic acid as the final irrigant in endodontics: Mechanical and cytotoxic effects. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2019; 100: 323-329.
9. Bello YD, Farina AP, Souza MA, Cecchin D. Glycolic acid: Characterization of a new final irrigant and effects on flexural strength and structural integrity of dentin. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2020; 106: 110283.
10. Nogo-Živanović D, Kanjevac T, Bjelović L, Ristić V, Tanasković I. The effect of final irrigation with MTAD, QMix, and EDTA on smear layer removal and mineral content of root canal dentin. *Microsc Res Tech.* 2019;82:923-930.
11. Virdee, S. S., Seymour, D. W., Farnell, D., Bhamra, G. & Bhakta, S. Efficacy of irrigant activation techniques in removing intracanal smear layer and debris from mature permanent teeth: a systematic review and meta-analysis. *Int. Endod J* 2018;51:605–621

12. Machado R, Cruz ATG, de Araujo BMM, Klemz AA, Klug HP, da Silva Neto UX. Tubular dentin sealer penetration after different final irrigation protocols: A confocal laser scanning microscopy study. *Microsc Res Tech* 2018;81:649-654.
13. Kruzic JJ, Ritchie RO. Fatigue of mineralized tissues: cortical bone and dentin. *J Mech Behav Biomed Mater* 2008;1:3-17.
14. Sideridou ID, Karabela MM, Bikiaris DN. Aging studies of light cured dimethacrylate-based dental resins and a resin composite in water or ethanol/water. *Dent Mater* 2007;23:1142-1149.
15. Marending M, Paque F, Fischer J, Zehnder M. Impact of irrigant sequence on mechanical properties of human root dentin. *J Endod* 2007; 33:1325–1328.
16. Uzunoglu E, Yilmaz Z, Erdogan O, Görduysus M. Final irrigation regimens affect fracture resistance values of root-filled teeth. *J Endod* 2016;42:493–495.
17. Çalt S, Serper A. Time-dependent effects of EDTA on dentin structures. *J Endod* 2002; 28: 17-19.
18. Cruz-Filho AM, Sousa-Neto MD, Savioli RN, Silva RG, Vansan LP, Pecora JD. Effect of chelating solutions on the microhardness of root canal lumen dentin. *J Endod* 2011;37:358-362.
19. Pedersen ND, Uzunoglu-Özyürek E, Dogan Buzoglu H. Influence of different irrigation protocols on microhardness and flexural strength values of young and aged crown dentin. *Gerodontology* 2020;37:53-58.
20. Zapparolli D, Saquy PC, Cruz-Filho AM. Effect of sodium hypochlorite and EDTA irrigation, individually and in alternation, on dentin microhardness at the furcation area of mandibular molars. *Braz Dent J* 2012;23:654-658.
21. Cobankara FK, Adanr N, Belli S. Evaluation of the influence as smear layer on the apical and coronal sealing ability of two sealers. *J Endod* 2004;30:406–409.

22. De-Deus G, Souza EM, Barino B, Maia J, Zamolyi RQ, Reis C, Kfir A. The self-adjusting file optimizes debridement quality in oval-shaped root canals. *J Endod* 2011;37:701–705.
23. Torabinejad M, Khademi A, Babagol J, Cho Y, Johnson WB, Bozhilov K, Kim J, Shabahang S. A new solution for the removal of the smear layer. *J Endod* 2003;29:170–175.
24. Kuruvilla A, Jaganath BM, Krishnegowda SC, Ramachandra PK, Johns DA, Abraham A. A comparative evaluation of smear layer removal by using edta, etidronic acid, and maleic acid as root canal irrigants: An in vitro scanning electron microscopic study. *J Conserv Dent* 2015;18:247-251.