

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO**

**Luara Presser Soldin**

**EFEITO DA POTENCIALIZAÇÃO DO  
ÁCIDO GLICÓLICO NA REMOÇÃO DA  
SMEAR LAYER E EROSÃO NA DENTINA  
RADICULAR**

Passo Fundo

2020

**Luara Presser Soldin**

**EFEITO DA POTENCIALIZAÇÃO DO  
ÁCIDO GLICÓLICO NA REMOÇÃO DA  
SMEAR LAYER E EROSÃO NA DENTINA  
RADICULAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da UPF, para obtenção do título de Mestre em Odontologia – Área de Concentração em Clínica Odontológica, sob orientação do prof. Dr. Douglas Cecchin e coorientação da profª. Dra. Ana Paula Farina.

Passo Fundo

2020

Folha reservada para  
Ata de aprovação da Banca Examinadora

Observação:

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

Folha reservada para  
Ficha catalográfica

Observação:

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



## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela vida, por guiar e iluminar a minha caminhada e por me proporcionar viver tantos momentos especiais.

Aos meus pais e minhas irmãs que sempre acreditaram em mim e no meu sonho. Que me fizeram acreditar que eu sempre serei capaz de conquistar tudo o que desejar e que enfrentaram comigo os momentos mais difíceis de minha caminhada, me dando força e sendo meu alicerce. Vocês são tudo pra mim!

Agradeço de forma muito especial a Universidade de Passo Fundo, que me recebeu de braços abertos. Agradeço também aos órgãos financiadores que auxiliaram com equipamentos, materiais e financeiramente para a realização desta pesquisa.

Meu orientador, Prof. Dr. Douglas Cecchin e co-orientadora Ana Paula Farina, compartilhar os seus conhecimentos comigo foi um privilégio para mim. Agradeço pela paciência, dedicação, suporte e incentivo. Por terem depositado em mim sua confiança e acreditado que eu poderia ir além. Serei eternamente grata!

Por fim, agradeço aos meus colegas de Mestrado. Vivemos fases de coração apertado, de angústias e de lágrimas. E rimos juntos, e como rimos! Desejo que sejam felizes, que tenham sucesso na vida e que sejam bravos ao buscarem os seus sonhos!

Muito obrigada!



## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS .....	6
SUMÁRIO .....	8
LISTA DE TABELAS .....	9
LISTA DE FIGURAS .....	10
LISTA DE ABREVIATURAS .....	12
RESUMO .....	13
ABSTRACT .....	15
1. INTRODUÇÃO .....	18
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	222
Preparo mecânico e Smear Layer.....	22
EDTA.....	23
Ácido Glicólico.....	27
Métodos de ativação do EDTA.....	31
<i>Irrigação ultrassônica passiva (PUI)</i> .....	31
<i>Easy Clean (EC)</i> .....	34
3. PROPOSIÇÃO .....	37
3.1 Objetivo Geral.....	37
3.2 Objetivos Específicos.....	37
<i>Hipóteses em estudo:</i> .....	37
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	39
5. RESULTADOS .....	49
6. DISCUSSÃO.....	51
7. CONCLUSÕES.....	61
REFERÊNCIAS .....	62
ANEXOS.....	69
ARTIGO.....	75

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Desvios médios e padrão ( $\pm$ DP) da porcentagem de remoção da camada de <i>smear layer</i> .....	46
<b>Tabela 2.</b> Mediana (Md) e primeiro (Q1) e terceiro (Q3) quartis dos escores de erosão.....	49

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema ilustrativo das áreas onde serão realizadas análises de limpeza do canal radicular nos diferentes grupos.....	40
<b>Figura 2.</b> Processamento da imagem no software.....	43
<b>Figura 3.</b> Imagens de MEV da ativação por <i>EasyClean</i> .....	47
<b>Figura 4.</b> Imagens de MEV da ativação por Irrigação Ultrassônica Passiva.....	48



## LISTA DE ABREVIATURAS

AG – Ácido Glicólico  
PUI – Irrigação Ultrassônica Passiva  
EC – *EasyClean*  
% – Porcentagem  
MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura  
EDTA – Ácido Etilenodiamino-tetra-acético  
AD – Água Destilada  
AC – Ácido Cítrico  
µm – Micrômetro  
NaOCl – Hipoclorito de Sódio  
CHX – Clorexidina  
Min – Minutos  
S – Segundos  
AHA's – Alfa Hidroxiácidos  
AF – Ácido fosfórico  
pH – Potencial Hidrogeniônico  
EDS – Espectroscopia de Energia Dispersiva  
AM – Ácido Maleico

## RESUMO

Objetivos: Avaliar comparativamente a influência da potencialização do ácido glicólico (AG) e do EDTA com *EasyClean* (EC) e irrigação ultrassônica passiva (PUI) na remoção da *smear layer* e erosão na dentina radicular. Métodos: Canais disto-vestibulares de 80 molares superiores foram preparados com sistema *ProTaper Next* (N=80). Após, foram fraturadas longitudinalmente para permitir a quantificação da *smear layer* criada nos terços cervical, médio e apical das raízes, usando microscopia eletrônica de varredura (MEV). Após remontar as metades das raízes fraturadas, elas foram divididas em 8 grupos de acordo com diferentes soluções de irrigação final (n=10): água destilada (AD), EDTA 17%, AG 10% e AG 17%; e técnicas de ativação de irrigantes: EC em movimento recíprocante por 3 ciclos de 20s e PUI também por 3 ciclos de 20s. Após a irrigação, as metades dos dentes foram separadas novamente para obtenção de imagens nas mesmas áreas da primeira avaliação por meio de MEV. A porcentagem de remoção de *smear layer* nas áreas irrigadas foi obtida em relação à porcentagem da área total por meio do processamento das imagens geradas no software Image J. Os dados da remoção da *smear layer* foram submetidos aos testes ANOVA e Bonferroni ( $\alpha = 0,05$ ). Os escores de erosão dentinária foram analisados pelos testes de Kruskal-Wallis e Tukey ( $\alpha = 0,05$ ). Resultados: A maior porcentagem de remoção de *smear layer* de todos os grupos foi encontrada no AG 10 e 17%

ativados com EC ( $P < 0,05$ ). Quando ativado com PUI, não houve diferença estatisticamente significativa entre EDTA 17%, AG 10% e AG 17% ( $P < 0,05$ ). As soluções de EDTA e AG em ambas as concentrações, ativadas com EC e PUI, não causaram erosão na dentina radicular. Conclusão: O AG foi eficaz para a remoção da smear layer em ambos os terços dos canais radiculares quando utilizados métodos de potencialização e não houve a ocorrência de erosão dentinária.

**Palavras-chave**

EDTA, Ácido Glicólico, Irrigação Ultrassônica Passiva, Movimento Reciprocante, *Smear Layer*.

## ABSTRACT

Objectives: to comparatively evaluate the influence of glycolic acid (AG) and EDTA potentiation with EasyClean (EC) and passive ultrasonic irrigation (PUI) in the removal of smear layer and erosion in root dentin. Methods: distal-labial canals of 80 upper molars were prepared with the ProTaper Next (N=80). Afterwards, they were longitudinally fractured to allow the quantification of the smear layer created in the cervical, middle and apical thirds of the roots, using scanning electron microscopy (SEM). After reassembling the fractured root halves, they were divided into 8 groups according to different final irrigation solutions (n=10): distilled water (AD), EDTA 17%, AG 10% and AG 17%; and irrigation activation techniques: EC in reciprocating movement for 3 cycles of 20s and PUI also for 3 cycles of 20s. After irrigation, the teeth halves were separated again to obtain images in the same areas as the first SEM evaluation. The percentage of smear layer removal in the irrigated areas was obtained in relation to the percentage of the total area by processing the generated images in the Image J software. The smear layer removal data were submitted to ANOVA and Bonferroni tests ( $\alpha = 0,05$ ). The dentin erosion scores were analyzed by Kruskal-Wallis and Tukey ( $\alpha = 0,05$ ). Results: the highest percentage of smear layer removal in all groups was found in AG 10 and 17% activated with EC ( $P < 0,05$ ). When activated with PUI, there was no statistically significant difference between EDTA 17%, AG

10% and AG 17% ( $P < 0,05$ ). The EDTA and AG solutions in both concentrations, activated with EC and PUI, did not cause erosion in the root dentin. Conclusion: the AG was effective for the smear layer removal in both thirds of the root canals when potentiation methods were used and there was no occurrence of dentin erosion.

**Key words**

EDTA, Glycolic acid, Passive Ultrasonic Irrigation, Reciprocating movement, Smear layer.



## 1. INTRODUÇÃO

O preparo químico-mecânico, utilizando instrumentos endodônticos e substâncias químicas auxiliares, resulta na formação de uma camada irregular amorfa. Essa camada denominada *smear layer* é composta por partículas inorgânicas e orgânicas, tecido pulpar, proteínas coaguladas, fluido salivar, células sanguíneas e, em casos de infecção, bactérias e fungos (Gulabivala *et al.*, 2005; Elkhataba *et al.*, 2018). A presença da *smear layer* acarreta uma série de desvantagens tais como a redução da permeabilidade dentinária (Schmidt *et al.*, 2015) e consequente dificuldade de penetração de substâncias desinfectantes nos túbulos dentinários; além disso, dificulta a adaptação dos materiais obturadores à dentina e selamento (Gulabivala *et al.*, 2005; Toyota *et al.*, 2017). Dessa forma, a remoção da camada de *smear layer* é recomendada (Dal Bello *et al.*, 2020).

O ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) é o agente quelante mais utilizado para remoção de *smear layer* (Nassar *et al.*, 2015). Ele reage com íons de cálcio presentes nos cristais de hidroxiapatita, removendo cálcio da dentina e dissolvendo *smear layer* (Çalt e Serper, 2002; Cruz-Filho *et al.*, 2011). No entanto, estudos mostram que o extravasamento apical de EDTA pode resultar em sensibilidade pós-operatória (Mohammadi *et al.*, 2013), além de reduzir a microdureza da dentina radicular, podendo causar um amolecimento da estrutura

dentínaria, desnaturar fibras de colágeno e alargar a entrada dos túbulos dentinários (Garberoglio e Becce, 1994). Outro importante fator é que o EDTA não tem se mostrado totalmente eficaz na remoção de *smear layer* principalmente no terço apical (Prado *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2014; Ballal *et al.*, 2016; Dal Bello *et al.* 2019), e também não possui efetiva ação contra o *E. faecalis* (Morgental *et al.*, 2013) e lipopolissacarídeos bacterianos (Matos *et al.*, 2019).

O AG é um ácido orgânico hidrossolúvel, inodoro e incolor, que pode ser obtido da cana-de-açúcar ou beterraba e possui um alto poder de penetração (Nardin *et al.*, 1999; Gonchoroski *et al.*, 2005; Kornhauser *et al.*, 2010). Recentemente foi demonstrado que o AG foi efetivo no condicionamento de esmalte e dentina e originou uma superfície dentinária adequada para posterior realização de procedimentos adesivos (Cecchin *et al.*, 2018; Cecchin *et al.*, 2019). Além disso, Dal Bello *et al.*, (2019) mostraram que o AG apresenta capacidade de remoção da *smear layer* semelhante ao EDTA e Ácido Cítrico (AC); no teste de citotoxicidade, o EDTA possui maiores efeitos citotóxicos em comparação com o AG. Quando utilizado por Correia (2018) como irrigante final durante o preparo de canais radiculares, o AG 17% resultou em efeitos sobre a dentina semelhantes aos causados pelo uso de 17% EDTA, assim como similar capacidade de remoção de *smear layer*. Porém, foi observado que no terço apical, assim como o EDTA, o AG não promoveu uma limpeza tão eficaz quanto nos terços cervical e médio; dessa forma a ativação do AG seria necessária para potencializar sua ação.

A agitação de soluções irrigadoras tem sido indicada como um método eficaz para melhorar sua ação, principalmente se tratando da remoção de *smear layer* no terço apical dos canais radiculares (Haapasalo

*et al.*, 2010; Schmidt *et al.*, 2015). A irrigação ultrassônica passiva (PUI) consiste no uso de um inserto acoplado e ativado por ultrassom no canal radicular preenchido com a solução irrigadora. Essa técnica tem apresentado bons resultados na remoção de *smear layer* das áreas de *istmo* e na região apical por permitir melhor dispersão e penetração dos irrigantes (Mozo *et al.* 2012; Schmidt *et al.*, 2015; Guerrero-Tanumaro *et al.*, 2015; Duque *et al.*, 2017). Caputã *et al.* (2019), relatam em revisão sistemática que os estudos avaliados concordam que a ativação pelo método PUI é mais eficaz do que a irrigação apenas com seringa em relação à remoção de detritos do interior dos canais radiculares. Também, cerca de metade dos estudos avaliados encontraram um efeito antimicrobiano maior quando utilizado PUI para ativação das substâncias químicas auxiliares.

O *EasyClean* (EC) é um instrumento plástico com tamanho de 25/04 que pode ser operado em movimento rotatório ou recíprocante, tendo como principal objetivo potencializar a ação das substâncias irrigadoras (Kato *et al.*, 2016; Duque *et al.*, 2017). Kato *et al.* (2016) testaram a efetividade de remoção de detritos da parede dos canais do EC utilizado em movimento recíprocante. Os resultados obtidos foram que, em comparação com o PUI, o EC em movimento recíprocante produziu paredes mais limpas no terço apical dos canais radiculares que o PUI.



## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### **Preparo químico-mecânico e *Smear Layer***

Entre as fases do preparo de canais radiculares, a escolha da solução irrigante que permite a neutralização bacteriana e a inativação de toxinas é fator importante para o sucesso do tratamento endodôntico (Elkhashaba *et al.*, 2018). Porém, essa etapa produz uma camada chamada *smear layer*, a partir do contato dos instrumentos endodônticos com as paredes do canal radicular. A *smear layer* consiste em uma camada localizada na superfície das paredes do canal radicular com espessura de 1 a 2  $\mu\text{m}$  sendo que a camada mais profunda está localizada nos túbulos dentinários com até 40  $\mu\text{m}$  de profundidade (Torabinejad *et al.*, 2002).

Essa camada é composta por partículas orgânicas e inorgânicas como restos de dentina e de tecido pulpar, tecido necrótico, restos de processos odontoblásticos, bactérias e fungos e seus subprodutos (Zehnder, 2006; Elkhashaba *et al.*, 2018).

Durante a instrumentação do canal radicular, a *smear layer* pode ser forçada para dentro dos túbulos dentinários servindo inclusive como nutriente às bactérias (Torabinejad *et al.*, 2002; Toyota *et al.*, 2017). Além disso, torna-se uma barreira física que impede que soluções irrigantes e materiais obturadores penetrem na dentina (Arslan *et al.*, 2016; Toyota *et al.*, 2017). A *smear layer* também pode produzir um efeito negativo na atividade antimicrobiana do hipoclorito de sódio (NaOCl) e da

clorexedina (CHX) sobre dentina quando elas são utilizadas em conjunto com instrumentos durante o preparo dos canais radiculares (Wang *et al.*, 2013).

Devido a esses fatos, é importante a irrigação com substâncias químicas que proporcionam ação sobre bactérias existentes na parede do canal, e também deve remover essa camada de *smear layer* (Torabinejad *et al.*, 2002; Hülsmann *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2013; Schmidt *et al.*, 2015).

## **EDTA**

O NaOCl é o principal irrigante utilizado durante o preparo do canal radicular. No entanto, Torabinejad *et al.* (2003) concluíram que apenas o NaOCl não é capaz de remover a *smear layer* pois ele atua somente na porção orgânica. Assim, um agente quelante capaz de agir sobre os componentes inorgânicos deve ser utilizado. De acordo com Nygaard-ostby *et al.* (1957) o EDTA é o irrigante mais indicado para produzir este efeito. Dessa forma, o mais usual entre os profissionais é o uso de NaOCl durante o preparo de canais radiculares e como irrigante final o EDTA para remoção da *smear layer* (Goldman *et al.*, 1982; Arslan *et al.*, 2016).

O EDTA é definido como um agente quelante com capacidade para realizar ligação com metais. Na odontologia, é utilizado para eliminar a *smear layer* por meio da reação com íons de cálcio presentes na dentina, formando quelatos de cálcio solúveis (Calt e Serper, 2002; Mohammadi *et al.*, 2013). Mello *et al.* (2010) apoiam o uso combinado de NaOCl (2,5%-5%) e EDTA (10%-17%) para efetiva limpeza das paredes dentinárias, contemplando a parte orgânica e a inorgânica

respectivamente. Porém, salientam a redução da microdureza dentinária e a possibilidade de erosão das paredes da dentina pelo uso de EDTA.

O EDTA reduz a microdureza da dentina e causa um amolecimento dessa estrutura pela remoção dos componentes de cálcio (Aslantas *et al.*, 2014). A redução da microdureza dentinária ocorre devido ao EDTA dissolver o conteúdo mineral presente. As mudanças nas características da dentina podem promover efeitos negativos nas áreas peri e intertubular. Como consequência, ocorre a diminuição dos valores do módulo de elasticidade e resistência a flexão dentinária, podendo causar a redução da resistência à fratura radicular (Uzunoglu *et al.*, 2012). Além disso, a redução na microdureza também pode prejudicar a adesividade dentinária (Aslantas *et al.*, 2014).

Outro fator importante a ser considerado é que durante a síntese do EDTA é liberado etilenodiamina, formaldeído e cianeto de sódio, possuindo esses compostos alto poder poluente ao ambiente (Nassar *et al.*, 2015). Já em seu processo de descarte, quando lançado nas águas, o EDTA pode afetar o balanço dos metais essenciais e não essenciais em água e organismos aquáticos, podendo contribuir para a toxicidade aquática (Sillanpää, 1997).

O EDTA é uma substância que apresenta também como fator negativo toxicidade quando em contato com tecidos, por isso o seu uso requer que se evite o extravasamento apical (Lindemann *et al.*, 1985). Foi observado que o EDTA apresentou-se citotóxico em culturas de macrófagos devido a alterações causadas por seus íons quelantes que aceleraram a apoptose dessas células. Com a alteração das funções dos macrófagos, não ocorrerá a fagocitose de células inflamatórias,

ocasionando dificuldades para que a cicatrização periapical ocorra (Amaral *et al.*, 2007).

O tempo de exposição do canal radicular ao EDTA está diretamente ligado ao poder dessa substância em causar efeitos deletérios. Mello *et al.* (2010) concluíram que a irrigação contínua com 5 ml de EDTA a 17% por 3 minutos (min) é eficiente na remoção de *smear layer*. De acordo com Saito *et al.* (2008), a irrigação com EDTA por 1 min remove melhor a camada de *smear layer* das paredes do canal radicular do que quando utilizado por 30 ou 15 segundos (s). Para Çalt e Serper (2002), seu uso não deve ultrapassar 1 min em uma concentração de 17% para evitar erosão dentinária.

Quando utilizado por 10 min o EDTA 17% reduziu a resistência à fratura dentária (Uzunoglu *et al.*, 2012), o que também foi comprovado por Turk *et al.* (2017), onde em raízes tratadas com EDTA 5% obtiveram maior resistência à fratura do que as tratadas com EDTA 17%. Outro estudo mostrou que o uso do EDTA por 2 min à 1,5% e 5% não foi efetivo na dissolução da *smear layer*, já EDTA 15% proporcionou maior dissolução e a concentração de 24% removeu quantidade significativa de *smear layer*, mostrando que a concentração utilizada de EDTA deve estar entre 15 e 24% (Blomtof *et al.*, 1997).

Quanto aos procedimentos endodônticos regenerativos, Taweewattanapaisan *et al.* (2019), investigaram os efeitos do EDTA residual na característica microscópica do coágulo sanguíneo no canal radicular, incluindo características e densidade da fibra. Seus resultados demonstraram que quando utilizado o EDTA, os íons de cálcio no sangue são quelados por EDTA residual e resultam na interrupção do processo de coagulação, deixando fibrina e plaquetas do lado de fora dos coágulos e o

seu interior composto de eritrócitos com pouca fibrina e poucas plaquetas. Além disso, pode ser observada uma deformidade de glóbulos vermelhos e aglomerados de plaquetas. O EDTA é capaz de afetar um receptor nas membranas plaquetárias, causando perda da função de ligação ao fibrinogênio. Mesmo com tempo de irrigação com EDTA reduzido de 5 min para 1 min, a densidade da fibra não mostrou diferenças nos resultados, reforçando que o EDTA residual cria um efeito extenso na formação da fibrina. Nesse estudo, o uso de EDTA seguido de solução salina não afetou a densidade das fibras, mas pode afetar a quantidade de fator de crescimento liberado pela dentina radicular. Concluindo que as características morfológicas do sangue foram afetadas pelo EDTA independente do tempo.

Quanto ao efeito das soluções de EDTA de baixa tensão superficial na resistência de união de cimento à base de resina à dentina jovem e velha de canais radiculares, o EDTA-T forneceu valores de força de união significativamente mais altos em comparação com o grupo EDTA em amostras com dentina jovem. Já nas amostras de dentina velha expostas a EDTA-T e REDTA os valores de resistência de união foram mais baixos. O AH Plus exibiu valores mais altos de resistência de união às amostras expostas ao EDTA-T em comparação com os do EDTA. Sugere-se que a adição de surfactante ao EDTA pode alterar a adesividade da dentina, melhorando a capacidade de umedecimento da solução sem aumentar seu efeito quelante (Guzel *et al.*, 2018).

O EDTA também apresenta baixa atividade antimicrobiana, o que foi comprovado pelo estudo de Morgental *et al.* (2013), onde o EDTA 17% foi testado contra *Enterococcus faecalis* e os resultados obtidos

foram de que o EDTA sozinho não produziu efeito antimicrobiano e apresentou contagem bacteriana semelhante à solução salina.

### **Ácido Glicólico**

Os Alfa Hidroxiácidos (AHA's) são ativos utilizados na dermatologia e facilmente encontradas em plantas. O AG faz parte do grupo AHA's e é um ácido orgânico hidrossolúvel, composto por apenas dois carbonos em sua estrutura molecular, possuindo a menor cadeia carbônica do grupo AHA's (Kornhauser *et al.*, 2010), possuindo baixo peso molecular, conseqüentemente dispendo de um alto poder de penetração (Marques *et al.*, 2016). O AG também foi o primeiro AHA's a ser utilizado para cuidados com a pele e foi o precursor dos biopolímeros (Kornhauser *et al.*, 2010; Koivistoinen *et al.*, 2013).

Além de sua fórmula original, o AG também pode ser polimerizado em ácido poliglicólico ou em conjunto com ácido láctico (PLGA) (Koivistoinen *et al.*, 2013). O PLGA é utilizado na produção de membranas que são utilizadas como barreiras de seletividade celular em casos de Regeneração Tecidual Guiada (Nagem-Filho *et al.*, 2006).

Outra ação do AG como cosmético é atuar como um queratolítico removendo as camadas superiores da epiderme (Couch e Howard, 2002). Também tem se mostrado eficaz para o tratamento de melasmas e sardas devido ao poder de remodelamento epidérmico e de descamação promovida pelo AG (Usuki *et al.*, 2003).

Quando utilizado para tratamento da pele envelhecida, o AG acelerou a síntese de colágeno pelos fibroblastos e queratinócitos (Okano *et al.*, 2003), o que também foi confirmado por Moon *et al.* (1999), que afirmaram que o AG possui a capacidade de modulação da síntese de

colágeno aumentando sua produção, revertendo assim o envelhecimento da pele.

Na odontologia, o AG foi testado em uma concentração de 35% como condicionador de superfícies de esmalte e dentina. Utilizando para tratamento de superfícies o AG 35%, Ácido fosfórico (AF) 35% e a água destilada (grupo controle) aplicados por 30s, foram avaliadas a microdureza dentinária por meio do teste de Knoop e a resistência adesiva à microtração em esmalte e dentina de resina composta utilizando 3 diferentes sistemas adesivos. A utilização do AG resultou em mudanças na microdureza superficial, demonstrando ser eficaz no condicionamento e menos agressivo que o AF; além disso, os valores de resistência de união ao esmalte e a dentina nos grupos condicionados com AG foi similar aos grupos condicionados com AF (Cecchin *et al.*, 2018).

No estudo de Correia (2018) o AG foi testado como irrigante final na preparação de canais radiculares na concentração de 17%, variando o Potencial Hidrogeniônico (pH) em 1,2 e 5,0. Ambos produziram resultados semelhantes ao EDTA 17% tanto na redução da microdureza quanto na remoção de *smear layer*, além de não alterar o conteúdo mineral da dentina. Esses resultados sugerem que o AG pode ser uma opção como irrigante final durante o preparo de canais radiculares.

Dal Bello *et al.* (2019), avaliaram o efeito do AG 5, 10 e 17%, EDTA 17%, e AC 10% sobre a microdureza dentinárias, rugosidade, distribuição do conteúdo mineral da dentina, remoção de *smear layer* e citotoxicidade. O AG 17% foi o agente que mais reduziu a microdureza dentinária, sugerindo que é uma substância capaz de modificar a composição mineral da dentina. Quanto à remoção da *smear layer*, as diferentes concentrações de AG apresentaram resultados semelhantes ao

EDTA e AC. Além disso, os autores concluíram que o 17% de EDTA resultou em mais efeitos citotóxicos do que AC 10% e AG 17%. O AG 17% apresentou maior valor da rugosidade superficial, sem diferença estatística de AG 5% e 10%, o que é desejável pois superfícies rugosas possibilitam uma melhora na adesão micromecânica dos materiais adesivos. Em todos os grupos não foram observadas áreas de erosão e os resultados de EDS não demonstraram alterações químicas e nenhuma formação de precipitado.

Trevelina *et al.* (2019), investigaram a eficácia de AHA's na profundidade de desmineralização, adesão de resina ao esmalte e dentina e atividade enzimática endógena da dentina. Como resultados, obtiveram que o uso de AHA's, com pouco tempo de aplicação, pode ser favorável para uniões dentárias previsíveis e estáveis. Além disso, o condicionamento superficial dos AHA's resultou em menores profundidades de desmineralização do esmalte e dentina quando comparado aos grupos controle formados pelo AF e ácido maleico (AM) e exibiram menor atividade enzimática endógena. O grupo AG atingiu valores adequados de resistência de união, estatisticamente semelhantes ao AF. Além disso, o AG formou uma camada híbrida mais fina, que se correlacionou positivamente com o aumento da capacidade de vedação das interfaces resina-dentina, confirmando a correlação positiva entre a espessura da camada híbrida e o aumento da micro-permeabilidade interfacial da dentina. Desta forma, concluíram que todos os AHA's desmineralizam o esmalte e a dentina, sendo que o condicionamento da dentina com AG resultou em resistência de união comparáveis às do AF, com a vantagem de diminuir a micro permeabilidade interfacial e induzir a menor atividade gelatinolítica da matriz dentinária.

Cecchin *et al.* (2019), avaliaram o uso da AG como condicionador de dentina para procedimentos adesivos no canal radicular, por meio de avaliação do padrão de condicionamento da AG, distribuição do conteúdo mineral da dentina do canal radicular e a resistência de união de pinos de fibra à dentina radicular utilizando diferentes sistemas adesivos. Os resultados demonstram que o AG produziu um padrão de condicionamento e uma camada híbrida interfacial semelhante à dentina radicular condicionada com AF. Ambos os ácidos favoreceram a resistência de união dos três sistemas adesivos utilizados na pesquisa, sendo que os valores de resistência de união pelo teste de *push out* e modo de falha do AG foram comparáveis aos das superfícies tratadas com AF. Dessa forma, pode-se concluir que o AG condicionou efetivamente as superfícies de dentina radicular, resultando em padrão de superfície, camada híbrida e resistência de união semelhante ao AF, sendo uma substância apropriada para procedimentos restauradores adesivos no canal radicular

Com o objetivo de determinar o tamanho das partículas de AG, a variação de pH e a tensão superficial para caracterizar o pó e as soluções de AG e examinar os efeitos do AG na desnaturação do colágeno e na resistência à flexão da dentina mineralizada, Dal Bello *et al.* (2020), realizaram seu estudo comparando os seguintes irrigantes: AD, EDTA 17%, AC 10% e 5%, AG 10% e 17%. A tensão superficial do AG foi semelhante aos grupos EDTA e AC e teve seus valores reduzidos quanto mais alta sua concentração. O AG também mostrou o maior tamanho de partículas em pó. O pH do AG mostrou ser estável nas diferentes concentrações e temperaturas avaliadas, sendo o pH do AG 5% = 2,36; AG 10% = 2,23; e AG 17% = 2,18, demonstrando ter níveis de pH ácido

(2 - 2,5) e estabilidade de pH em um período de 90 dias. Além disso, verificou-se que os efeitos sobre a relação apatita/colágeno apresentados pela AG são dependentes da concentração (Dal Bello *et al.*, 2020).

### **Métodos de potencialização das soluções irrigadoras**

A irrigação convencional passiva dos canais radiculares, utilizando somente seringa e agulha, realizando injeção de irrigante intracanal não promove uma limpeza efetiva, principalmente na área apical de canais radiculares e nas áreas de complexidade anatômica. Tornando assim necessário o uso de técnicas auxiliares que possam promover uma remoção efetiva desses debrís (Herrera *et al.*, 2013; Souza *et al.*, 2018).

Para a potencialização do EDTA vários métodos têm sido descritos, como os ultrassônicos, laser Nd:YAG, CanalBrush e ProTaper Universal (Costa Lima *et al.*; 2015), laser de diodo 808 nanométrico (Arslan *et al.*, 2016), EndoVac, SelfAdjusting File e *Easy Clean* (Silva *et al.*, 2018). Com os resultados obtidos pelos estudos, sabe-se que a potencialização do EDTA melhora sua ação e capacidade de remoção de *smear layer* (Costa Lima *et al.* 2015).

#### *Irrigação ultrassônica passiva (PUI)*

A ativação ultrassônica das soluções irrigantes tem apresentado bons resultados na remoção de *smear layer* das áreas de *istmo* e na região apical, pois permite melhor dispersão e penetração dos irrigantes. Em comparação com a irrigação tradicional de canais radiculares, a PUI demonstrou maior número de túbulos dentinários abertos do que quando utilizada irrigação convencional (Schmidt *et al.*, 2015).

A potencialização das substâncias pelo método PUI baseia-se no uso de um inserto acoplado e ativado por ultrassom no canal radicular preenchido com a solução irrigadora. Dessa forma, ocorre a indução de micro-transmissões acústicas na solução, através de ondas ultrassônicas que promovem vibração na ponteira, produzindo fluxo e cavitação por pressão hidrostática da solução irrigante, deslocando debris. A cavitação tem o propósito de formação de bolhas, aumentando a temperatura e a pressão da solução, causando ondas de impacto contra as paredes dos canais e possibilitando que a solução penetre em locais de complexidade anatômica (Mozo *et al.* 2012; Guerrero-Tanumaro *et al.*, 2015; Duque *et al.*, 2017).

O inserto *Irrisonic* é produzido com aço inoxidável e utilizado para ativação da substância irrigadora. Apresenta ponta ativa de 2mm de diâmetro e 0,01 de conicidade. Recomenda-se o uso em baixo nível de potência de 10%-20% (Helse Ultrasonic, Santa Rosa de Viterbo, SP, Brasil).

Aguiar *et al.* (2019), avaliaram o efeito da potencialização ultrassônica na resistência de união e na adaptação de tampões cervicais de MTA, MTAHP e Biodentine. Após a realização de teste de *push-out* e de análise sob microscópio confocal, os resultados obtidos foram de que a potencialização ultrassônica favoreceu a adaptação dos materiais às paredes do canal radicular, resultando em uma maior resistência de união dos materiais em comparação aos grupos em que não foi realizada potencialização ultrassônica.

Em um estudo de comparação entre a irrigação convencional e a irrigação com potencialização do EDTA, a irrigação convencional de EDTA apresentou um número maior de amostras com uma camada de

*smear* moderada, já os grupos sônico e ultrassônico apresentaram maior número de amostras com túbulos dentinários limpos e abertos. Quando os grupos foram comparados, houve uma diferença significativa entre os com potencialização e o grupo de irrigação convencional. Os resultados mostraram que a PUI e a ativação sônica removeram mais *smear layer* do que a irrigação convencional (Blank-Gonçalves *et al.*, 2011).

Recentemente, uma revisão sistemática foi realizada com o objetivo de revisar evidências sobre a limpeza e desinfecção dos canais radiculares e a cicatrização da periodontite apical quando utilizada a ativação ultrassônica do irrigante em comparação com a irrigação com seringas. A partir disso, revelou que, com base em estudos clínicos e *in vitro*, a ativação ultrassônica é capaz de promover uma desinfecção e remoção de restos de tecido duro e pulpar muito mais eficiente do que a limpeza promovida pelo uso de seringas. Quanto à cicatrização da periodontite apical, a ativação ultrassônica não promoveu melhoras significativas na taxa de cicatrização (Cãputã *et al.*, 2019).

Duque *et al.* (2017), desenvolveram uma pesquisa onde o objetivo foi comparar a eficácia de remoção de debris de dentina no canal radicular e em área de istmo pelo EC em movimento contínuo e recíprocante, PUI, sistema Endoactivator e irrigação convencional. Em ambos os grupos, os instrumentos foram posicionados a 2 mm do comprimento de trabalho dos canais radiculares. Os resultados de limpeza obtidos mostraram que a capacidade de remoção de detritos foi similar para todos os sistemas, exceto na porção dos 2 mm apicais onde o EC em rotação contínua foi mais eficiente que a irrigação convencional. O maior número de etapas de agitação aumentou a limpeza de tanto a área do canal como o istmo. Ao final das 3 agitações, o EC em rotação contínua

mostrou-se mais eficiente que a irrigação convencional a 2, 4 e 6 mm do ápice radicular. A PUI foi mais eficiente do que a irrigação convencional a 6 mm e não diferiu estatisticamente do EC em rotação contínua e movimento alternativo. Os autores concluíram que os métodos com agitação da solução irrigadora promoveram melhor limpeza do canal e do *istmo*, principalmente com o sistema EC utilizado em rotação contínua e a baixa velocidade, sendo necessário realizar 3 ciclos de agitação irrigante de 20 segundos cada para garantir uma melhor limpeza do canal e do *istmo*.

#### Easy Clean (EC)

O EC, recentemente desenvolvido, é um instrumento plástico composto por acrilonitrila-butadieno-estireno. Sua parte ativa tem o formato de uma asa de aeronave e o tamanho do dispositivo é 25/04 (Duque *et al.*, 2017).

A indicação é que seja operado em movimento recíprocante ou rotatório com a finalidade de potencializar a ação das substâncias irrigadoras. O EC limpa por meio da agitação e deslocamento mecânico dos detritos, pois a agitação ocorre ao longo de todo o comprimento do instrumento sem que haja contato com as paredes do canal. Além disso, por ser um instrumento plástico, não oferece risco de deformação do canal radicular, podendo ser inserido até o comprimento de trabalho (Kato *et al.*, 2016).

Kato *et al.* (2016), também realizaram a comparação do desempenho do EC em relação ao método PUI na remoção de detritos das paredes do canal em nível apical, onde obteve-se como resultado uma limpeza efetiva do terço apical, sendo que produziu paredes mais limpas

em relação a PUI. Dessa forma, concluiu que o método EC obteve uma melhor efetividade de remoção de detritos da parede dos canais em movimento recíprocante em comparação com o PUI.

Rodrigues *et al.* (2017), realizaram uma avaliação da eficácia da PUI e do EC na remoção de material de preenchimento residual nos casos de retratamento endodôntico. Após a instrumentação utilizando limas endodônticas, as amostras foram submetidas ao PUI por 3 ciclos de 20 s ou ao EC, também por 3 ciclos de 20 s, sendo usado em movimento rotatório. Foram geradas imagens em MEV dos terços apicais, médios e cervicais antes e após a ativação do irrigante. Os resultados demonstraram que ambas as técnicas de ativação melhoraram a remoção do material de preenchimento em todos os terços dos canais radiculares, concluindo que o EC em movimento rotatório é útil no retratamento e foi tão eficaz quanto a PUI.

Em um estudo em que o objetivo foi comparar quatro protocolos finais de irrigação utilizando os métodos PUI, EndoVac, SAF e EC na remoção de detritos de tecidos, através do uso de imagens de micro-CT, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos, sendo que o EC apresentou desempenho semelhante ao PUI. Podendo concluir que todos os protocolos finais de irrigação mostraram a mesma eficácia na remoção de detritos, demonstrando a efetividade da utilização do EC (Silva *et al.*, 2018).

Simenzo *et al.* (2017) avaliaram os efeitos erosivos da PUI em comparação com EC em movimento recíprocante na superfície dentinária do canal radicular em 3 níveis pré-determinados, sendo 3, 6 e 9mm do ápice radicular, utilizando MEV. No grupo EC, a erosão em 3mm do ápice foi significativamente maior que em 9mm. No grupo PUI não foi

observada diferença na erosão entre os níveis radiculares avaliados. Também, não houve diferença significativa entre os sistemas PUI e EC em termos de grau de erosão causada nas paredes dentinárias. Assim, pode-se concluir que as técnicas finais de irrigação testadas foram equivalentes em relação ao grau de erosão causada à superfície dentinária.

### **3. PROPOSIÇÃO**

#### **3.1. Objetivo geral**

Avaliar a influência da potencialização do AG na remoção de *smear layer* e erosão da dentina radicular.

#### **3.2. Objetivos específicos**

Avaliar a influência da potencialização do AG e do EDTA utilizando PUI e EC na remoção da *smear layer* e erosão da dentina radicular, por meio da Microscopia Eletrônica de Varredura.

##### Hipóteses em estudo:

1. O AG nas concentrações de 10 e 17% seria tão efetivo quanto o EDTA na remoção de *smear layer*.
2. O método de ativação das substâncias utilizadas EC resultaria em maior capacidade de remoção e *smear layer* do que o PUI.
3. O AG produziria menores valores de erosão dentinária, em ambas as concentrações, quando comparado ao EDTA.



## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### **Preparo de amostras**

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade de Passo Fundo (UPF) (Número do parecer: 3.059.865) (Anexo 1). Foram selecionados oitenta primeiros molares maxilares humanos doados pelo BioBanco da Faculdade de Odontologia da Universidade de Passo Fundo (N=80). Somente a raiz disto-vestibular foi utilizada, por possuir anatomia circular e apresentar menores variações anatômicas. Foram excluídos os dentes que possuíam tratamento endodôntico prévio, ápice incompleto e reabsorção intrarradicular. Tecidos moles superficiais foram removidos com uma cureta e os dentes foram congelados até sua utilização.

As raízes foram seccionadas utilizando um disco diamantado dupla-face (KG Sorensen, Barueri, SP, Brasil) sob irrigação para padronizar o comprimento de raiz em 10 mm – 12 mm. O comprimento de trabalho foi determinado no comprimento real da raiz, ou seja, no forame apical pela inserção de uma lima #10 K. Foram selecionadas apenas raízes que apresentavam diâmetro anatômico compatível com uma lima #15 K.

Foram criados sulcos longitudinais nas superfícies mesio-distal de cada raiz utilizando um disco diamantado dupla-face (KG Sorensen, Barueri, SP, Brasil), operando em baixa velocidade, tomando cuidado

para que o sulco não alcançasse a luz do canal. As raízes foram recobertas na região apical com cera odontológica como forma de evitar o extravasamento das soluções irrigadoras.

O preparo químico-mecânico foi realizado utilizando motor *Smart Plus* (Dentsply, Maillefer, Ballaigues, Suíça) com instrumentos rotatórios de níquel titânio *ProTaper Next* (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça) X1, X2, X3, X4 e X5 a uma velocidade de rotação de 300 rpm e 200 g/cm de torque, em movimento rotatório, de acordo com as recomendações do fabricante (Capar *et al.*, 2014). A cada troca de instrumento foi realizada a irrigação dos canais com 2 mL de água destilada utilizando agulhas de aço inoxidável calibre 29 (NaviTip Tips, Ultradent Products Inc., South Jordan, UT, EUA) calibradas até um comprimento de 3 mm aquém do forame apical. A sucção foi realizada usando uma cânula de metal e a patência foi realizada em cada troca de instrumento através da inserção de uma lima #10 K no comprimento de 1mm além do ápice.

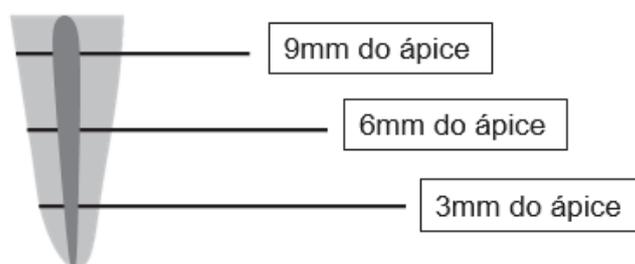
Ao final da instrumentação, os canais foram secos com pontas de papel absorvente e as raízes foram clivadas em duas metades utilizando lâmina de micrótomo posicionada manualmente nos sulcos criados anteriormente.

### **Análise Inicial em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

A avaliação em MEV foi baseada em Schmidt *et al.* (2015), sendo realizada uma avaliação inicial após a instrumentação e sem o uso do irrigante final. Três marcações na superfície externa da raiz foram realizadas com uma lâmina de bisturi número 11, perpendicular ao longo

eixo, para dividi-la em terços cervicais, médios e apicais (Figura 1). As amostras foram mantidas em estufa a 37°C por 7 dias. As amostras não necessitaram de metalização para avaliação devido ao método de obtenção de imagens desenvolvido nessa pesquisa.

A localização das marcações realizadas anteriormente foi realizada em ampliação de 300x e após, sem alterar a posição da amostra, a área coberta pela camada de *smear* em cada um dos terços foi obtida em ampliação de 1000x.



**Figura 1.** Esquema ilustrativo das áreas onde serão realizadas análises de limpeza do canal radicular nos diferentes grupos.

Estas imagens iniciais serviram para avaliar as condições das paredes do canal radicular e visualizar a camada de *smear layer* formada. Em seguida, as metades de cada dente foram unidas e fixadas com resina composta (Natural Shade, Nova DFL, Taquara, RJ, Brasil) para estabilizar as peças.

### **Divisão dos grupos experimentais**

As raízes foram divididas aleatoriamente em 8 grupos (n=10) de acordo com a substância utilizada para remoção da *smear layer* e com a

forma de ativação da substância, respectivamente: EDTA 17%, AG 10%, AG 17%; com PUI ou EC utilizado em movimento recíprocante. Dois dos grupos foram utilizados como controle negativo, onde a substância irrigadora utilizada foi AD (Quadro 1).

Quadro 1. Divisão dos grupos experimentais.

	Solução para irrigação final	Quantidade	Modo de ativação	Tempo de ativação
Grupo 1	EDTA 17%	2 mL por ciclo	PUI	3 ciclos de 20s
Grupo 2	EDTA 17%	2 mL por ciclo	EC	3 ciclos de 20s
Grupo 3	AG 17%	2 mL por ciclo	PUI	3 ciclos de 20s
Grupo 4	AG 17%	2 mL por ciclo	EC	3 ciclos de 20s
Grupo 5	AG 10%	2 mL por ciclo	PUI	3 ciclos de 20s
Grupo 6	AG 10%	2 mL por ciclo	EC	3 ciclos de 20s
Grupo 7	AD	2 mL por ciclo	PUI	3 ciclos de 20s
Grupo 8	AD	2 mL por ciclo	EC	3 ciclos de 20s

Todas as soluções foram introduzidas no canal utilizando agulhas de aço inoxidável calibre 29 (NaviTip Tips, Ultradent Products Inc., South Jordan, UT, EUA) até um comprimento de 3 mm aquém do forame apical.

Nos grupos onde a ativação foi realizada pelo método PUI, foi realizada utilizando uma ponta Irrisonic E1 (20 / taper 0,01) (Helse Indústria e Comércio, Santa Rosa de Viterbo, Brasil), posicionada 1 mm aquém do comprimento de trabalho, utilizando o ultrassom Satelec Booster (Acteon Brasil, Indaiatuba/SP, Brasil). Todas as soluções foram renovadas e ativadas por 3 ciclos de 20 segundos (Kato *et. al*, 2016), totalizando 60 mL de solução e ativação por 1 min em cada raiz. Após a utilização dos protocolos de irrigação acima mencionados, cada canal radicular foi irrigado com 5 mL de água destilada.

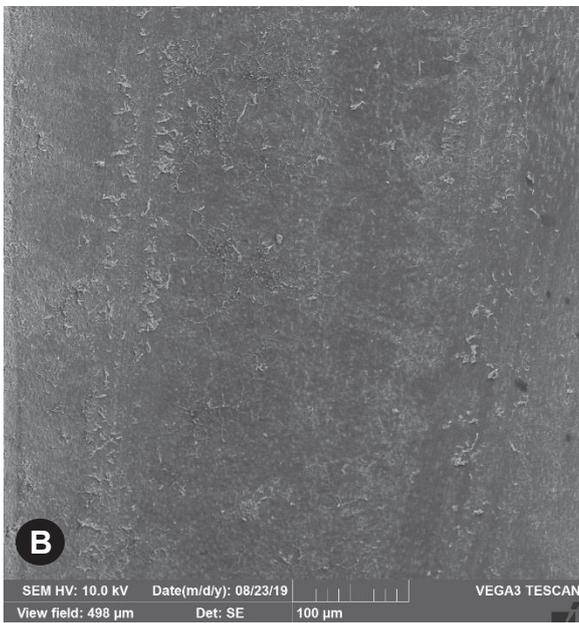
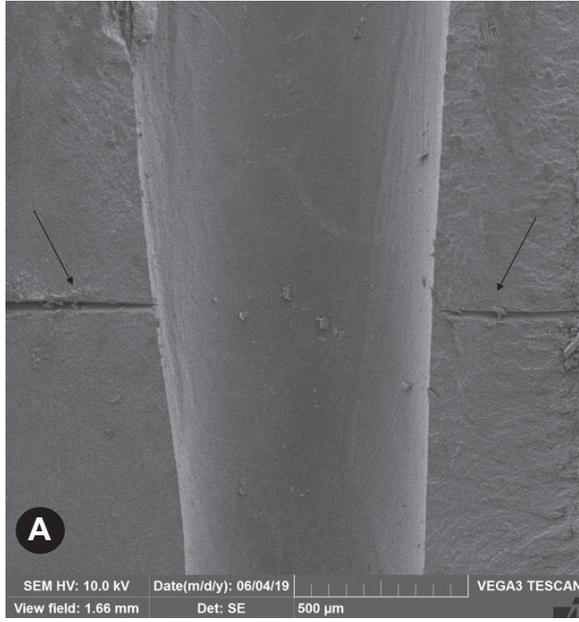
Nos grupos ativados com EC, as soluções irrigantes foram ativadas com o instrumento EC posicionada a 1 mm aquém do comprimento de trabalho com movimentos recíprocos de 180° no sentido horário, seguido de 90° no sentido anti-horário, com o motor *Smart Plus* (Kato *et. al*, 2016). Foram utilizadas as mesmas soluções, com renovação e tempo de ativação semelhantes aos citados no grupo PUI.

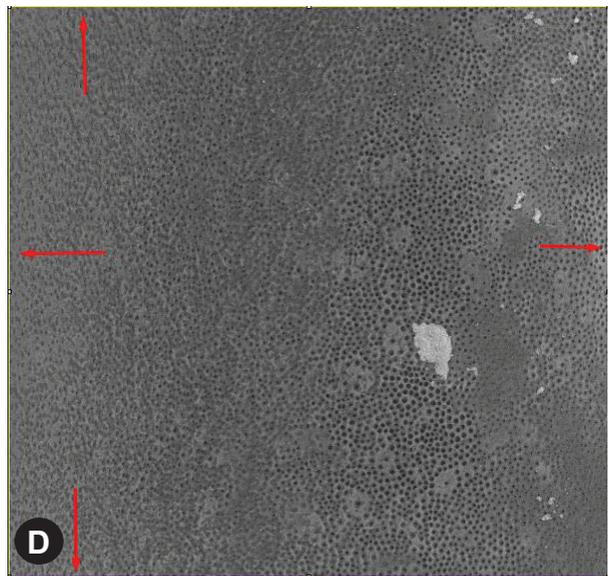
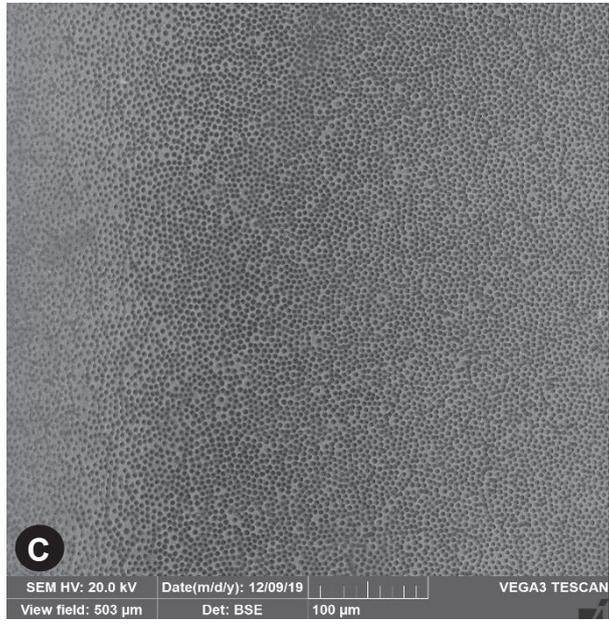
### **Análise Final em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

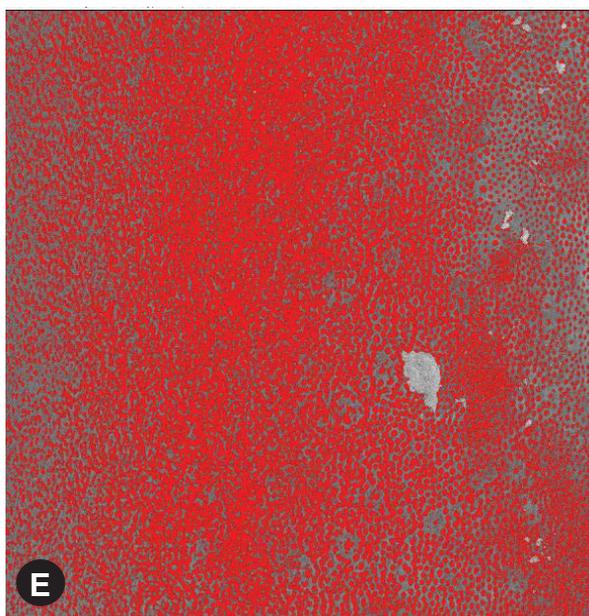
Após a irrigação com as soluções experimentais, os dentes foram secos com pontas de papel absorvente e separados novamente em suas duas metades para serem analisados por MEV. As novas imagens foram obtidas exatamente nas mesmas áreas avaliadas anteriormente (Figura 1).

### **Avaliação da camada de *smear layer***

As imagens obtidas em ampliação de 1000x foram classificadas e avaliadas utilizando-se o software Image J (versão 1.52a). O processamento da imagem nesse software está demonstrado na Figura 2. Cada imagem gerada foi convertida em um type de 8-Bites para melhor performance e análise das mesmas. Depois de convertidas, foi realizada a seleção e identificação da área total de cada imagem, sendo calibrada em mm<sup>2</sup>. Após, foi feita a identificação da remoção da *smear layer* também em mm<sup>2</sup> através da ferramenta Threshold, que de maneira automática identifica diferenças de densidade na imagem e marca os túbulos dentinários abertos em cada imagem. Esses dados foram transformados em porcentagem (%).







**Figura 2.** Processamento da imagem no software. (A) Imagem em ampliação de 300x para localização das marcas para determinar a área de avaliação. Setas pretas: ranhuras perpendiculares ao logo eixo do canal radicular feitas com lâmina de bisturi. (B) Imagem obtida do terço apical da raiz, após a instrumentação do canal radicular, mostrando a camada de *smear layer* formada em ampliação de 1000x. (C) Imagem obtida após a irrigação final em ampliação de 1000x. (D) Processamento de imagem pelo software Image J. As áreas escuras correspondem aos túbulos dentinários abertos e as flechas vermelhas estão determinando a área da imagem que será analisada. (E) Identificação dos túbulos abertos de dentina (em vermelho) pelo software Image J.

### **Avaliação da erosão dentinária radicular**

As imagens obtidas em ampliação de 1000x foram classificadas e avaliadas de acordo com Torabinejad *et al.* (2003): score 0: *smear layer* cobrindo quase toda a superfície dentinária, com

poucos ou nenhum túbulo aberto; score 1, sem erosão: todos os túbulos visivelmente normais em aparência e tamanho; score 2, erosão moderada: a dentina peritubular corroída; score 3, erosão severa: a dentina intertubular destruída e os túbulos conectados entre si.

### **Análise estatística**

A distribuição normal dos dados de remoção da *smear layer* foi confirmada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. A análise de variância foi utilizada para comparações múltiplas com diferença estatística entre os grupos ( $P < 0,0001$ ). O teste de Bonferroni foi utilizado para comparar a diferença entre os grupos ( $\alpha = 0,05$ ). Os dados foram analisados usando Stat Plus AnalystSoft Inc. versão 6.0 (Vancouver, BC, Canadá).

Dois pesquisadores independentes cegos analisaram a erosão da dentina radicular. O teste do coeficiente Kappa mostrou uma alta concordância entre os pesquisadores em relação à interpretação dos escores de erosão ( $\kappa = 0,856$ ). Os dados de erosão dentinária foram analisados pelos testes de Kruskal-Wallis e Tukey ( $\alpha = 0,05$ ), e os resultados foram apresentados em medianas e quartis (para representar a dispersão dos dados).

## 5. RESULTADOS

As médias e seus respectivos desvios-padrão das percentagens das áreas dos túbulos dentinários abertos em relação à área total da imagem são mostrados na Tabela 1. A menor percentagem de áreas de túbulos dentinários abertos foi encontrada no grupo AD, independentemente de ter sido ativado com EC ou PUI ( $P < 0,05$ ). A maior percentagem de áreas abertas dos túbulos dentinários de todos os grupos deste estudo foi encontrada no AG 10 e 17% ativados com EC ( $P < 0,05$ ).

Quando a ativação foi realizada com EC, ambas as concentrações de AG (10 e 17%) resultaram em maior porcentagem de áreas abertas dos túbulos dentinários do que EDTA 17% ( $P < 0,05$ ). As imagens representativas do uso das substâncias irrigantes ativadas com EC podem ser observadas na Figura 3.

Quando ativado com PUI, não houve diferença estatisticamente significativa entre EDTA 17%, AG 10% e AG 17% ( $P < 0,05$ ). As imagens representativas do uso das substâncias irrigantes ativadas com PUI podem ser observadas na Figura 4.

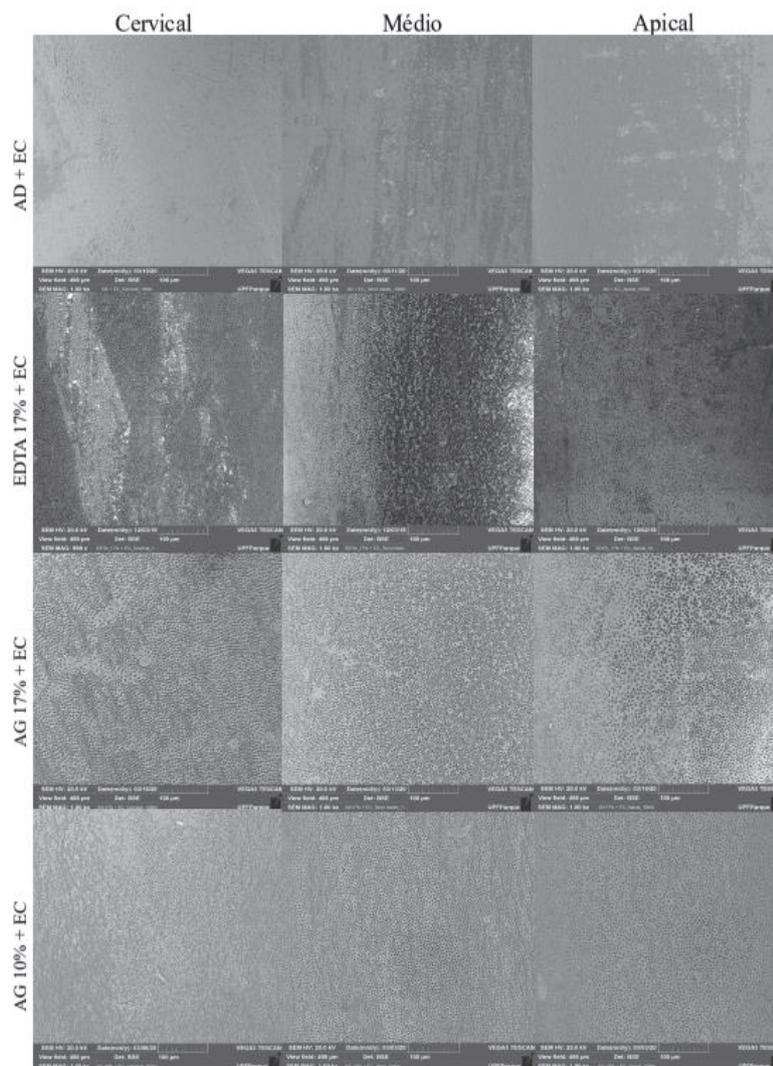
Na comparação entre os terços coronal, médio e apical, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa na maioria dos grupos ( $P > 0,05$ ), exceto no grupo EDTA 17% + EC, onde no terço apical foram encontradas percentagens menores de áreas abertas dos túbulos dentinários abertos ( $P < 0,05$ ).

**Tabela 1.** Médias e desvios-padrão ( $\pm$ DP) da porcentagem de remoção da camada de *smear layer*, de acordo com os diferentes grupos.

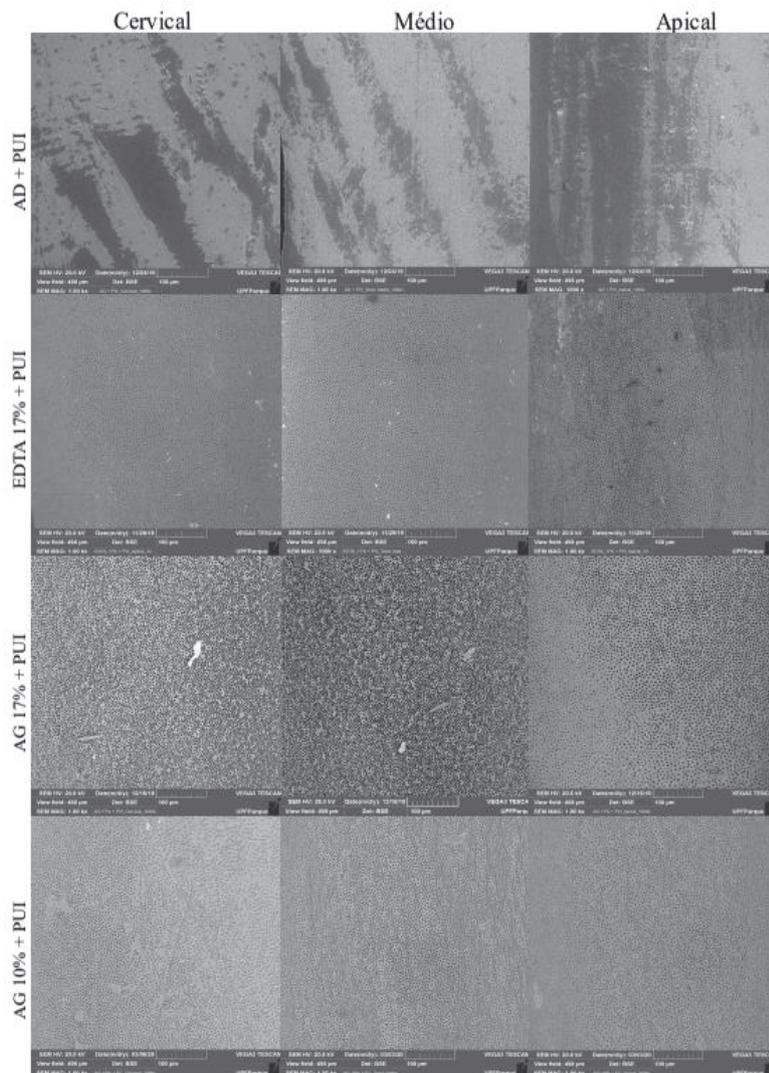
Terços radiculares/ Soluções	<i>EasyClean</i>	PUI
Coronal		
AD	13.78 (2.62) <sup>A d</sup>	14.23 (3.88) <sup>A c</sup>
EDTA 17%	56.05 (12.74) <sup>A b</sup>	51.73 (15.14) <sup>A ab</sup>
AG 17%	76.08 (15.65) <sup>A a</sup>	56.60 (11.58) <sup>B a</sup>
AG 10%	73.08 (13.17) <sup>A a</sup>	53.00 (10.76) <sup>B ab</sup>
Médio		
AD	15.02 (2.43) <sup>A d</sup>	14.54 (3.05) <sup>A c</sup>
EDTA 17%	53.16 (14.25) <sup>A b</sup>	52.36 (10.43) <sup>A ab</sup>
AG 17%	73.99 (15.95) <sup>A a</sup>	51.64 (13.14) <sup>B ab</sup>
AG 10%	71.00 (13.56) <sup>A a</sup>	56.78 (6.97) <sup>B a</sup>
Apical		
AD	9.64 (2.76) <sup>A d</sup>	10.25 (2.61) <sup>A c</sup>
EDTA 17%	38.64 (12.25) <sup>A c</sup>	45.25 (14.50) <sup>A b</sup>
AG 17%	71.69 (13.63) <sup>A a</sup>	57.17 (11.43) <sup>B a</sup>
AG 10%	74.35 (10.48) <sup>A a</sup>	55.90 (12.15) <sup>B ab</sup>

*EasyClean*, ativação recíproca usando o instrumento *EasyClean*; PUI, irrigação ultrassônica passiva; AD, água destilada; EDTA, ácido etilendiaminotetracético. AG; ácido glicólico.

\* As médias seguidas por diferentes letras minúsculas na mesma coluna e letras maiúsculas na mesma linha são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).



**Figura 3.** Imagens representativas de MEV mostrando amostras dos terços coronal, médio e apical, representando a técnica de ativação por *EasyClean* das soluções irrigantes experimentais (magnificação 1000x).



**Figura 4.** Imagens representativas de MEV mostrando amostras dos terços coronal, médio e apical, representando a técnica de ativação por Irrigação Ultrassônica Passiva das soluções irrigantes experimentais (magnificação 1000x).

Os scores de erosão para os grupos experimentais estão resumidos na Tabela 2. A AD não conseguiu remover a *smear layer*; portanto, não foi viável observar se havia erosão dentinária nesse grupo. Os scores de erosão nos demais grupos foi predominantemente 1, ou seja, não havendo erosão dentinária.

**Tabela 2.** Mediana (Md) e primeiro (Q1) e terceiro (Q3) quartis dos escores de erosão dos grupos experimentais.

GRUPO EXPERIMENTAL	CORONAL			MÉDIO			APICAL		
	Md	Q <sub>1</sub>	Q <sub>3</sub>	Md	Q <sub>1</sub>	Q <sub>3</sub>	Md	Q <sub>1</sub>	Q <sub>3</sub>
AD + EC	0.0 <sup>b</sup>	0.0	0.0	0.0 <sup>c</sup>	0.0	0.0	0.0 <sup>d</sup>	0.0	0.0
AD + PIU	0.0 <sup>b</sup>	0.0	0.0	0.0 <sup>c</sup>	0.0	0.0	0.0 <sup>d</sup>	0.0	0.0
EDTA 17% + EC	1.0 <sup>a</sup>	0.0	1.0	1.0 <sup>bc</sup>	0.0	1.0	0.0 <sup>cd</sup>	0.0	0.5
EDTA 17% + PUI	1.0 <sup>a</sup>	0.0	1.0	1.0 <sup>ab</sup>	1.0	1.0	1.0 <sup>abc</sup>	0.0	1.0
AG 17% + EC	1.0 <sup>a</sup>	1.0	1.0	1.0 <sup>a</sup>	1.0	2.0	1.0 <sup>abc</sup>	0.0	1.0
AG 17% + PUI	1.0 <sup>a</sup>	1.0	1.0	1.0 <sup>ab</sup>	0.0	1.0	1.0 <sup>ab</sup>	1.0	1.0
AG 10% + EC	1.0 <sup>a</sup>	1.0	1.0	1.0 <sup>ab</sup>	1.0	1.0	0.5 <sup>bcd</sup>	0.0	1.0
AG 10% + PUI	1.0 <sup>a</sup>	1.0	1.5	1.0 <sup>ab</sup>	1.0	1.0	1.0 <sup>abc</sup>	1.0	1.0
P valor	<0.001			<0.001			<0.001		

*EasyClean*, ativação recíproca usando o instrumento *EasyClean*; PUI, irrigação ultrassônica passiva; AD, água destilada; EDTA, ácido etilendiaminotetracético. AG; ácido glicólico.

\* As medianas seguidas de letras diferentes na mesma coluna são estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

## 6. DISCUSSÃO

A grande maioria de estudos publicados até o momento sobre a remoção de *smear layer* das paredes dentinárias, utilizou a análise de *scores* para avaliação (Mancini *et al.*, 2009; Justo *et al.*, 2014; Souza *et al.*, 2016; Arslan *et al.*, 2016). No entanto, sabe-se que muitos locais nas paredes dos canais radiculares não são tocados durante a instrumentação (Siqueira *et al.*, 2017; Thomas *et al.*, 2020). Dessa forma, nessas áreas não se pode afirmar que houve formação de *smear layer* durante a instrumentação e o processo de efeito/avaliação das substâncias podem ser imprecisos. Por isso, neste estudo, foi realizado uma avaliação antes e após o preparo dos canais por MEV, onde foi possível verificar em um local específico e pré-determinado a quantidade de *smear layer* presente antes do uso do irrigante final. Após o uso do agente irrigante, uma segunda avaliação em MEV foi realizada no mesmo local da primeira avaliação e, dessa forma, essa estratégia permite avaliar a real capacidade dos diferentes irrigantes finais em remover *smear layer* das paredes dos canais radiculares. Além disso, o uso de um software para avaliação da remoção de *smear layer* serviu para evitar o viés do observador durante o processo de avaliação (Schmidt *et al.*, 2015).

Dentre as limitações do método de pesquisa desenvolvido podemos citar o corte das amostras com lâmina de micrótomo, visto que não há como precisar que essa divisão produza metades de raiz com canal radicular idênticas. Além disso, a ampliação de 1000x em MEV pode ter sido baixa, pois uma ampliação maior permitiria uma melhor visualização

da remoção da *smear layer* e também melhor performance das imagens no software, facilitando a avaliação por meio dele. A avaliação da remoção de *smear layer* por meio do software *Image J* pode ter distorções no sentido de que irregularidades significativas na dentina podem causar dificuldades na identificação dos túbulos dentinários pelo software, pois essa identificação utiliza diferenças na escala de cinza das imagens (Schmidt *et al.*, 2015).

Estudos prévios têm mostrado a habilidade do AG em remover a *smear layer* da dentina coronária (Cecchin *et al.*, 2018) e radicular (Correia 2018; Cecchin *et al.*, 2019; Dal Bello *et al.*, 2019). No entanto, assim como o EDTA, o AG não tem mostrado capacidade de remover completamente a *smear layer* das paredes dos canais radiculares, principalmente no terço apical (Correia 2018; Dal Bello *et al.*, 2019). Por isso, o principal objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade do AG 10 e 17% em remover *smear layer* das paredes dos canais radiculares quando ativado com EC e PUI. Os resultados mostraram que o AG, em ambas as concentrações, quando ativado com EC mostrou maior capacidade de remoção da *smear layer* das paredes dos canais radiculares do que o EDTA ativado com EC. Quando ativado com PUI, o AG em ambas as concentrações apresentou similar capacidade de remoção da *smear layer* que o EDTA. Dessa forma a hipótese 1 foi aceita e a 2 parcialmente aceita.

O AG + EC em comparação com EDTA + EC produziu resultados superiores de remoção de *smear layer*. Estudos anteriores já haviam demonstrado a capacidade do AG em remover *smear layer* mesmo quando utilizado sem métodos de potencialização, sendo que os resultados produzidos foram comparáveis ao EDTA (Dal Bello *et al.*, 2019; Barcellos *et al.*, 2020). Em nossa pesquisa, quando utilizado o método de

potencialização po EC, a substância de AG teve ação ampliada e removeu mais *smear layer* do que o EDTA.

Ainda não há estudos que demonstrem o mecanismo pelo qual o AG remove a *smear layer* das paredes dentinárias. Porém, por pertencer à mesma família do AC (Alfa-hidroxiácidos –  $\alpha$ -HA), pressupõe-se que o mecanismo de ação de ambos seja semelhante. O AC é um ácido orgânico fraco, assim como o AG, e tem sido descrito que promove uma remoção eficaz da camada de *smear layer* (De-Deus *et al.*, 2006 (1); De-Deus *et al.*, 2006 (2); De-Deus *et al.*, 2008). De acordo com Yamaguchi *et al.* (1996), a ação do AC se dá através de uma reação com metais, formando um quelato solúvel não iônico, o que o torna um agente quelante. Além disso, o AC pode remover  $\text{Ca}^{2+}$  da matriz de dentina. No entanto, essa hipótese precisa ser avaliada em estudos posteriores. Já o EDTA tem seu mecanismo de ação amplamente descrito na literatura. Ele possui a propriedade de ligar-se aos íons de  $\text{Ca}^{2+}$  presentes e assim remover o componente inorgânico da dentina promovendo a dispersão da *smear layer* (Mohammadi *et al.*, 2013; Almeida *et al.*, 2016). Em nosso estudo, de um modo geral, o EDTA apresentou baixa efetividade, em torno de 50% dos túbulos dentinários abertos, ao contrário de outros estudos que mostraram boa capacidade de limpeza desta solução irrigadora (Saito *et al.*, 2008; Mello *et al.*; 2010; Pereira *et al.*, 2014). O método de avaliação deste estudo pode justificar essa diferença.

Diversas técnicas têm sido desenvolvidas e relatadas para a potencialização das soluções irrigantes (Costa Lima *et al.*; 2015; Arslan *et al.*, 2016; Kato *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2018) visando melhor penetração e potencializando os efeitos na remoção da *smear layer* presente após o preparo dos canais radiculares. O método PUI age por

indução de micro-transmissões acústicas na solução irrigadora, por meio de ondas ultrassônicas que promovem vibração, produzindo fluxo e cavitação por pressão hidrostática da solução irrigante, deslocando dessa forma os debrís que estão em íntimo contato com a dentina. Além disso, ocorre também a formação de bolhas, aumento da temperatura e da pressão da solução (Mozo *et al.* 2012; Guerrero-Tanumaro *et al.*, 2015; Duque *et al.*, 2017). Em nossa pesquisa, o AG 10 e 17% apresentaram a mesma capacidade de remover *smear layer* que o EDTA quando a ativação foi realizada pelo método PUI. Dal Bello *et al.* (2019), relataram eficácia na remoção de *smear layer* pelo AG nas concentrações de 17%, 10% e 5%, sem diferença estatística entre esses grupos e também em comparação com EDTA e AC. Dessa forma, levando em consideração os resultados demonstrados pelas concentrações mais baixas do AG, em nossa pesquisa utilizamos o AG 10% com o intuito de avaliar o seu potencial para remover *smear layer*. Os resultados semelhantes apresentados pelo AG 10% e AG 17% demonstram que, possivelmente, o AG pode ser utilizado em concentrações mais baixas sem perder sua efetividade.

De um modo geral os grupos apresentaram em torno de 50% dos túbulos dentinários abertos, que pode ser considerado uma baixa efetividade destes protocolos. Esse resultado pode estar ligado ao tempo reduzido de 1 minuto ativação, sendo que melhores resultados são alcançados com o uso de 3 a 5 minutos (Mancini *et al.*, 2017).

Já o sistema EC, possui parte ativa em formato de uma asa de aeronave (Duque *et al.*, 2017) e tem indicação para ser operado tanto em movimento recíprocante quanto rotatório. O EC age por agitação e deslocamento mecânico dos detritos, que ocorre ao longo de todo o

comprimento do instrumento (Kato *et al.*, 2016). Nesta pesquisa as amostras que receberam ativação por EC e irrigação com AG obtiveram paredes dentinárias com menor porcentagem de *smear layer* em relação ao método PUI, exceto nos grupos AD e EDTA 17%. Os resultados positivos do uso de EC já haviam sido demonstrados anteriormente por Kato *et al.* (2016), onde o método EC obteve uma melhor efetividade de remoção de detritos da parede dos canais em movimento recíprocante em comparação com o PUI.

Quando comparações da remoção de *smear layer* dos terços cervical, médio e apical foram realizadas dentro do mesmo grupo, o único protocolo de irrigação que demonstrou diferença significativa foi EDTA 17% + EC, onde no terço apical foram encontradas porcentagens mais baixas de túbulos dentinários abertos do que nos terços cervical e médio. Ballal *et al.* (2016), descreveram que, quando comparado ao uso de Qmix e ácido maleico, o EDTA foi a substância que obteve menor efetividade de remoção de *smear layer* no terço apical. O mesmo foi descrito por Pereira *et al.* (2014), onde o EDTA 17% obteve uma remoção eficiente de *smear layer* nos terços médio e cervical, mas quando avaliado o terço apical, a remoção não foi tão efetiva, sendo que a maior parte dos túbulos dentinários permaneceu obliterada.

A baixa efetividade do EDTA no terço apical está de acordo com estudos anteriores (Prado *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2014; Ballal *et al.*, 2016; Dal Bello *et al.* 2019). Esse fato pode estar relacionado ao tempo de aplicação do EDTA, pois o período ideal de uso do EDTA para que haja debridamento do canal radicular é de 15 minutos (Goldberg e Abramovich, 1977). Neste estudo, utilizamos o intervalo de 1 minuto de aplicação do EDTA afim de evitarmos a ocorrência de efeitos deletérios

aos túbulos dentinários e nas propriedades mecânicas da dentina. Outro fator que também pode estar associado à baixa efetividade do EDTA no terço apical foi descrito por Ballal *et al.*, (2016), onde o EDTA 17% neutro acaba reduzindo as proteínas minerais e não colágenas (PCNs) presentes na dentina, removendo além do cálcio livre, o cálcio que está ligado aos PCNs. No terço apical, o número de PCNs é reduzido, e dessa forma também é reduzido o grau de descalcificação produzido pelo EDTA.

O uso de substâncias irrigantes e a ativação dessas substâncias podem melhorar a capacidade de limpeza e desinfecção dos canais radiculares, no entanto, podem também originar erosão nas paredes dentinárias (Simenzo *et al.*, 2017). Essa erosão altera as características dentinárias de microdureza, permeabilidade e rugosidade, além de ter ação sobre o colágeno (Wang *et al.*, 2016), o que pode predispor o surgimento de trincas na raiz de dentes tratados endodonticamente (Simenzo *et al.*, 2017). Em nosso estudo nenhum grupo causou erosão na estrutura dentinária, sendo assim rejeitada a hipótese de que o AG produziria menores valores de erosão dentinária em ambas as concentrações quando comparado ao EDTA. Um dos fatores que pode ter influenciado esse resultado é o curto período de exposição das amostras às substâncias, que foi de 1 minuto. Esse fato está de acordo com um estudo muito citado na literatura de Çalt e Serper (2002), onde esses autores concluem que o uso do agente quelante por 1 minuto não é capaz de produzir erosão dentinária; mas quando esse uso passa para 10 minutos, ocorre uma excessiva erosão peri e intertubular, deixando claro que o efeito erosivo é tempo dependente. Baldasso *et al.* (2017), conseguiram observar erosão dentinária em sua pesquisa, porém, utilizaram o tempo de 5 minutos de exposição dos canais radiculares às substâncias testadas. Além disso,

também foi relatado que o uso de NaOCl após o agente quelante favorece a ocorrência de erosão dentinária (Wagner *et al.*, 2017), sendo que em nossa pesquisa utilizamos apenas AD após a aplicação das substâncias testadas.

Preservar as propriedades dentinárias e oferecer uma desinfecção efetiva dos canais radiculares é um dos principais objetivos da utilização de substâncias irrigadoras durante o preparo de canais radiculares. Nesse contexto, a busca por substâncias que possam suprir essas características e que apresentem menor agressividade aos tecidos tem sido proposta. Com base nos resultados desse estudo, o AG tem potencial para ser utilizado como um irrigante final. No entanto, mais pesquisas são necessárias no sentido de associar o uso do AG às substâncias irrigantes utilizadas durante o preparo dos canais – NaOCl ou CHX – e verificar a efetividade do protocolo na limpeza e desinfecção dentinária, bem como seu efeito sobre os componentes orgânicos e inorgânicos da dentina.

## 7. CONCLUSÕES

Nas condições deste estudo, verificou-se que o AG foi eficaz para a remoção da *smear layer* em ambos os terços dos canais radiculares quando utilizados métodos de potencialização, sendo que a combinação AG + EC obteve resultados superiores ao EDTA.

Além disso, foi possível observar que não houve erosão dentinária com ambas as soluções (AG e EDTA) e ambas as formas de ativação (EC e PUI).

## REFERÊNCIAS

AGUIAR, B. A.; FROTA, L. M. A.; TAGUATINGA, D. T.; VIVAN, R. R.; CAMILLERI, J.; DUARTE, M. A. H.; VASCONCELOS, B. C. Influence of ultrasonic agitation on bond strength, marginal adaptation, and tooth discoloration provided by three coronary barrier endodontic materials. *Clin Oral Invest*, v.23, n.11, p.4113-4122, 2019.

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

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

ARSLAN, D.; GUNESER, M. B.; DINCER, A. N.; KUSTARCI, A.; ER, K.; SISO, S. H. Comparison of Smear Layer Removal Ability of Qmix with Different Activation Techniques. *J Endod*, v.42, n.8, p.1279-1285, 2016.

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

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

BALLAL, N. V.; JAIN, I.; TAY, F. R. Evolution of the smear layer removal and decalcification effect of QMix, maleic acid and EDTA on root canal dentine. *J Dent*, v. 51, n.1, p.62-68, 2016.

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, p.1268-1271, 2011.

BLOMTOF, J.; BLOMLOF, L.; LINDSKOG, S. Effect of different concentrations of EDTA on smear removal and collagen exposure in periodontitis-affected root surfaces. *J Clin Periodontol*, v.24, n.8, p.534-537, 1997.

CALT S.; SERPER A. Time-dependent effects of EDTA on dentin structures. *J Endod*, v.28, n.1, p.17-19, 2002.

CAPAR, I. D.; ARSLAN, H.; AKCAY, M.; UYSAL, B. Effects of ProTaper Universal, ProTaper Next, and HyFlex Instruments on Crack Formation in Dentin. *J Endod*, v.40, n.9, p.1482-1484, 2014.

CĂPUTĂ, E. P.; RETSAS, A.; KUIJK, L.; PAZ, L. E. C.; BOUTSIUKIS, C. Ultrasonic Irrigant Activation during Root Canal Treatment: A Systematic Review. *J Endod*, v.45, n.1, p.31-44, 2019.

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

CECCHIN, D.; BRINGHENTIA, I. L.; BERNARDIA, J. B.; LEALA, L. O.; SOUZA, M. A.; BEDRAN-RUSSO, A. K.; FARINA, A. P. Alpha-hydroxy glycolic acid for root dentin etching: Morphological analysis and push out bond strength. *Int J Adhes Adhes*, v. 90, n.1, p.138-143, 2019.

CORREIA, D. P. D. Estudo do Ácido Glicólico Agente Quelante para Condicionamento da Dentina Radicular. 2018. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo.

COSTA LIMA, G. A.; AGUIAR, C. M.; CÂMARA, A. C.; ALVES, L. C.; SANTOS, F. A.; NASCIMENTO, A. E. Comparison of smear layer removal using the Nd:YAG laser, ultrasound, ProTaper Universal system, and CanalBrush methods: an in vitro study. *J Endod*, v.41, n.3, p.400-404, 2015.

COUCH, I. H.; HOWARD, P. C. Quantification of glycolic acid in cosmetic products using reversed phase high performance liquid chromatography. *Int J Cosmet, Sci*, v.24, n.2, p.89-95, 2002.

CRUZ-FILHO A. M.; SOUSA-NETO M. D.; SAVIOLI R. N.; SILVA R. G.; VANSAN L. P.; PÉCORA J. D. Effect of chelating solutions on the microhardness of root canal lumen dentin. *J Endod*, v.37, n.3, p.358-362, 2011.

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

DAL BELLO, Y.; 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*, v. 106, n.1, p.1-6, 2020.

DE-DEUS, G.; PACIORNIK, S.; MAURICIO, M. H. P. Evaluation of the effect of EDTA, EDTAC and citric acid on the microhardness of root dentine. *Int Endod J*, v.39, n.1, p.401-407, 2006 (1).

DE-DEUS, G.; PACIORNIK, S.; MAURICIO, M. H. P.; PRIOLI, R. Real-time atomic force microscopy of root dentine during demineralization when subjected to chelating agents. *Int Endod J*, v.39, n.1, p.683-692, 2006 (2).

DE-DEUS, G.; REIS, C.; FIDEL, S.; FIDEL R. A. S.; PACIORNIK, S. Longitudinal and quantitative evaluation of dentin demineralization when subjected to EDTA, EDTAC, and citric acid: a co-site digital optical microscopy study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, v.105, n.1, p.391-397, 2008.

DUQUE, J. A.; DUARTE, M. A. H.; CANALI, L. C. F.; ZANCAN, R. F.; VIVAN, R. R.; BERNARDES, R. A.; BRAMANTE, C. M. Comparative Effectiveness of new Mechanical Irrigant Agitating Devices for Debris Removal from the Canal and Isthmus of Mesial Roots of Mandibular Molars. *J Endod*, v.43, n.2, p.326-337, 2017.

ELKHASHABA, R. A. M.; KATAIAB, M. A.; KAMELC, W. H.; SHAABAND, M. Comparison of antibacterial effect and smear layer removal of herbal versus traditional irrigants – An in vitro study. *Fut. Dent. J*, v.4, n.1, p.165–169, 2018.

GARBEROGLIO R.; BECCE C. Smear layer removal by root canal irrigants. A comparative scanning electron microscopic study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, v.78, n.3, p.359-367, 1994.

GOLDBERG, F.; ABRAMOVICH, A. Analysis of the effect of EDTAC on the dentinal walls of the root canal. *J Endod*, v.3, n.1, p.101-105, 1977.

GOLDMAN, M.; GOLDMAN, L. B.; CAVALERI, R.; BOGIS, J.; LIN, P. S. The efficacy of several endodontic irrigating solutions: a scanning electron microscopic study: part 2. *J Endod*, v.8, n.11, p.487-492, 1982.

GUERREIRO-TANOMARU, J. M.; CHÁVEZ-ANDRADE, G. M.; FARIA-JÚNIOR, N. B.; WATANABE, E.; TANOMARU-FILHO, M. Effect of Passive Ultrasonic Irrigation on *Enterococcus faecalis* from Root Canals: An Ex Vivo Study. *Braz Dent J*, v.26, n.4, p.342-346, 2015.

GULABIVALA, K.; PATEL, B.; EVANS, G.; NG, Y. L. Effects of mechanical and chemical procedures on root canal surfaces. *Endod Topics*, v. 10, n.1, p.103-122, 2005.

GUZEL, C.; UZUNOGLU, E.; BUZOGLU, H. D. Effect of Low-surface Tension EDTA Solutions on the Bond Strength of Resin-based Sealer to Young and Old Root Canal Dentin. *J Endod*, v.44, n.3, p.485-488, 2018.

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

HERRERA, D. R.; SANTOS, Z. T.; TAY, L. Y.; SILVA, E. J.; LOGUERCIO, A. D.; GOMES, B. P. F. A. Efficacy of Different Final

Irrigant Activation Protocols on Smear Layer Removal by EDTA and Citric Acid. *Micros Res Tech*, v.76, n.4, p.364–369, 2013.

HÜLSMANN, M.; PETERS, O. A.; DUMMER, P. M. H. Mechanical preparation of root canals: shaping goals, techniques and means. *Endod Topics*, v.10, n.1, p.30-76, 2005.

JUSTO, A. M.; ROSA, R. A.; SANTINI, M. F.; FERREIRA, M. B. C.; PEREIRA, J. R.; DUARTE, M. A. H.; SÓ, M. V. R. Effectiveness of Final Irrigant Protocols for Debris Removal from Simulated Canal Irregularities. *J Endod*, v.40, n.12, p.2009-2014, 2014.

KATO, A. S.; CUNHA, R. S. BUENO, C. E. S.; PELEGRINE, R. A.; FONTANA, C. E.; MARTIN, A. S. Investigation of the Efficacy of Passive Ultrasonic Irrigation Versus Irrigation with Reciprocating Activation: An Environmental Scanning Electron Microscopic Study. *J Endod*, v.42, n.4, p.659-663, 2016.

KOIVISTOINEN, O. M.; KUIVANEN, J.; BARTH, D.; TURKIA, H.; PITKÄNEN, J. P.; PENTTILÄ, M.; RICHARD, P. Glycolic acid production in the engineered yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces lactis*. *Microb Cell Fac*, v.12, n.1, p.12-82, 2013.

KORNHAUSER, A.; COELHO, S. G.; HEARING, V. J. Applications of hydroxy acids: classification, mechanisms, and photoactivity. *Clin Cosmet Investig Dermatol*, v.3, n.1, p.135-142, 2010.

LINDEMANN, R. A.; HUME, W. R.; WOLCOTT, R. B. Dentin permeability and pulpal response to EDTA. *J Prosthet Dent*, v.53, n.3, p.341-343, 1985.

MANCINI, M.; ARMELLIN, E.; CASAGLIA, A.; CERRONI, L.; CIANCONI, L. A Comparative Study of Smear Layer Removal and Erosion in Apical Intraradicular Dentine With Three Irrigating Solutions: A Scanning Electron Microscopy Evaluation. *J Endod*, v.35, n.6, p.900-903, 2009.

MANCINI, M.; CERRONI, L.; IORIO, L.; DALL'ASTA, L.; CIANCONI, L. FESEM evaluation of smear layer removal using different

irrigant activation methods (EndoActivator, EndoVac, PUI and LAI). An in vitro study. *Clin Oral Invest*, v.22, n.2, p.993-999, 2017.

MARQUES, J.; TOMAZZONI, R. C.; FRANÇA, A. J. B. V. Uso do Peeling de Ácido Glicólico no Tratamento da pele Fotodanificada. 2016. Trabalho de iniciação científica (Curso Superior de Estética) – Universidade do Vale do Itajaí, Balneário Camboriú.

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. *Braz Dent J*, v.30, n.3, p.220-226, 2019.

MELLO, I.; KAMMERER, B. A.; YOSHIMOTO, D.; MACEDO, M. C. S. ANTONIAZZI, J. H. Influence of Final Rinse Technique on Ability of Ethylenediaminetetraacetic Acid of Removing Smear Layer. *J Endod*, v.36, n.3, p.512-514, 2010.

MOHAMMADI, Z.; SHALAVI, S.; JAFARZADEH, H. Ethylenediaminetetraacetic acid in endodontics. *Eur J Dent*, v.7, n.5, p.135-142, 2013.

MOON, S. E.; PARK, S. B.; AHN, H. T.; YOUN, J. I. The effect of glycolic acid on photoaged albino hairless mouse skin. *Dermatol Surg*, v.25, n.3, p.179-82, 1999.

MORONTAL, R. D.; SINGH, A.; SAPPAL, H.; KOOPER, P. M.; VIER-PELISSER, F.V.; PETERS, O. A. Dentin inhibits the antibacterial effect of new and conventional endodontic irrigants. *J Endod*, v.39, n.3, p.406-410, 2013.

MOZO, S.; LLENA, C.; FORNER, L. Review of ultrasonic irrigation in endodontics: increasing action of irrigating solutions. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, v.17, n.3, p.512-516, 2012.

NAGEM-FILHO, H.; CAMPI-JÚNIOR, L.; NAGEM, H. D.; FRANCISCONI, P. A. S. Engenharia tecidual dos biomateriais. *Innov Implant J Biomater Esthet*, v.1, n.1, p.54-62, 2006.

NASSAR, M.; HIRAISHI, N.; TAMURA, Y.; OTSUKI, M.; AOKI, K.; TAGAMI, J. Phytic Acid: An Alternative Root Canal Chelating Agent. *J Endod*, v.41, n.2, p.242–247, 2015.

NYGAARD-OSTBY B. Chelation in root canal therapy. *Odontol Tidskr*, v.65, n.1, p.3-11, 1957.

OKANO, Y.; ABE, Y.; MASAKI, H.; SANTHANAM, U.; ICHIHASHI, M.; FUNASAKA, Y. Biological effects of glycolic acid on dermal matrix metabolism mediated by dermal fibroblasts and epidermal keratinocytes. *Exp Dermatol*, v.12, n.2, p.57-63, 2003.

PEREIRA, R. S.; PEREIRA, G. S.; BARROS, C. H. S.; BORTOLOTTI, M. G. L. B.; JUNQUEIRA, J. L. C. Effect of 17% EDTA on removal of canal wall smear layer and calcium hydroxide dressing: part II. *Rev Gaúch Odontol*, v.26, n.1, p.53-58, 2014.

PRADO, M.; GUSMAN, H.; GOMES, B. P. F. A.; SIMÃO, F. A. Scanning Electron Microscopic Investigation of the Effectiveness of Phosphoric Acid in Smear Layer Removal When Compared with EDTA and Citric Acid. *J Endod*, v.37, n.2, p.255-258, 2011.

RODRIGUES, C. T.; DUARTE, M. A. H.; GUIMARÃES, B. M.; VIVAN, R. R.; BERNARDINELLI, N. Comparison of two methods of irrigant agitation in the removal of residual filling material in retreatment. *Braz Oral Res*, v.31, n.113, p.1-8, 2017.

SAITO, K.; WEBB, T. D.; IMAMURA, G. M.; GOODELL, G. G. Effect of Shortened Irrigation Times with 17% Ethylene diamine tetra-acetic acid on smear layer removal after rotary canal instrumentation. *J Endod*, v.34, n.8, p.1011-1014, 2008.

SCHMIDT, T. F.; TEIXEIRA, C. S.; FELIPPE, M. C., FELIPPE, W. T.; PASHLEY, D. H.; BORTOLUZZI, E. A. Effect of Ultrasonic Activation of Irrigants on Smear Layer Removal. *J Endod*, v.41, n.8, p.1359-1363, 2015.

SILLANPÄÄ, M. Environmental fate of EDTA and DTPA. *Environ Contam Toxicol*, v.152, n.1, p.85-111, 1997.

SILVA, E. J. N. L.; CARVALHO, C. R.; BELLADONNA, F. G.; PRADO, M. C.; LOPES, R. T.; DE-DEUS, G.; MOREIRA, E. J. L. Micro-CT evaluation of different final irrigation protocols on the removal of hard-tissue debris from isthmus-containing mesial root of mandibular molars. *Clin Oral Investig*, v.23, n.2, p.681-687, 2019.

SIMENZO, A. P.; BUENO, C. E. S.; CUNHA, R. S.; PELEGRINE, R. A.; GUIMARÃES, D.; ROCHA, P.; MARTIN, A. S.; KATO, A. S. Comparative Analysis of Dentinal Erosion after Passive Ultrasonic Irrigation versus Irrigation with Reciprocating Activation: An Environmental Scanning Electron Study. *J Endod*, v.43, n.1, p.141-146, 2017.

SIQUEIRA JR, J. F.; PÉREZ, A. R.; MARCELIANO-ALVES, M. F.; PROVENZANO, J. C.; SILVA, S. G.; PIRES, F. R.; VIEIRA, G. C. S.; RÔÇAS, I. N.; ALVES, F. R. F. What happens to unprepared root canal walls: a correlative analysis using micro-computed tomography and histology/scanning electron microscopy. *Int Endod J*, v.51, n.5, p.501-508, 2017.

SOUZA, M. A.; MOTTER, F. T.; FONTANA, T. P.; RIBEIRO, M. B.; MIYAGAKI, D. C.; CECCHIN, D. Influence of ultrasonic activation in association with different final irrigants on intracanal smear layer removal. *Braz J Oral Sci*, v.15, n.1, p.16-20, 2016.

SOUZA, M. A.; HOFFMANN, I. P.; MENCHIK, V. H. S.; ZANDONÁ, 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.42, n.2, p.1-7, 2018.

TAWEEWATTANAPAISAN, P., JANTARAT, J.; OUNJAI, P.; JANEBOODIN, K. The Effects of EDTA on Blood Clot in Regenerative Endodontic Procedures. *J Endod*, v.45, n.3, p.281-286, 2019.

THOMAS, J. P.; LYNCH, M.; PAURAZAS, S.; ASKAR, M. Micro-computed Tomographic Evaluation of the Shaping Ability of WaveOne Gold, TRUShape, EdgeCoil, and XP-3D Shaper Endodontic Files in

Single, Oval-shaped Canals: An *In Vitro* Study. *J Endod*, v.46, n.2, p.244-251, 2020.

TORABINEJAD, M.; HANDYSIDES, R.; KHADEMI, A. A.; BAKLAND, L. K. Clinical implications of the smear layer in endodontics: A review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, v.94, n.6, p.658-666, 2002.

TORABINEJAD, M.; KHADEMI, A. A.; BABAGOLI, J.; CHO, Y.; JOHNSON, W. B.; BOZHILOV, K.; KIM, J.; SHABAHANG, S. A New Solution for the Removal of the Smear Layer. *J Endod*, v.29, n.3, p.170-175, 2003.

TOYOTA, Y.; YOSHIHARA, T.; HISADA, A.; YAWAKA, Y. Removal of smear layer by various root canal irrigations in primary teeth. *Pediatr Dent*, v.27, n.1, p.8-13, 2017.

TREVELINA, L. T.; VILLANUEVA, J.; ZAMPERINI, C. A.; MATHEWA, M. T.; MATOS, A. B.; BEDRAN-RUSSO, A. K. Investigation of five-hydroxy acids for enamel and dentin etching: Demineralization depth, resin adhesion and dentin enzymatic activity. *Dent Mater*, v.35, n.1, p.900-908, 2019.

TURK, T.; KAVAL, M. E.; SARIKANAT, M.; HULSMANN M. Effect of final irrigation procedures on fracture resistance of root filled teeth: an ex vivo study. *Int Endod J*, v.50, n.8, p.799-804, 2017.

USUKI, A.; OHASHI, A.; SATO, H.; OCHIAI, Y.; ICHIHASHI, M.; FUNASAKA, Y. The inhibitory effect of glycolic acid and lactic acid on melanin synthesis in melanoma cells. *Exp Dermatol*, v.12, n.1, p.43-50, 2003.

UZUNOGLU, E.; AKTEMUR, S.; UYANIK, M. O.; DURMAZ, V.; NAGAS, E. Effect of Ethylenediaminetetraacetic Acid on Root Fracture with Respect to Concentration at Different Time Exposures. *J Endod*, v.38, n.8, p.1110-1113, 2012.

WAGNER, M. H.; DA ROSA, R. A.; DE FIGUEIREDO, J. A. P.; DUARTE, M. A. H.; PEREIRA, J. R.; SÓ, M. V. R. Final irrigation protocols may affect intraradicular dentin ultrastructure. *Clin Oral Invest*, v.21, n.1, p.2173-2182, 2017.

WANG, Z.; SHEN, Y.; HAAPASALO, M. Effect of Smear Layer against Disinfection Protocols on *Enterococcus faecalis*-infected Dentin. *J Endod*, v.39, n.11, p.1395-1400, 2013.

WANG, Z.; MAEZONO, H.; SHEN, Y.; HAAPASALO, M. Evolution of root canal dentin erosion after different irrigation methods using energy-dispersive X-ray spectroscopy. *J Endod*, v.42, n.12, p.1834-1839, 2016.

YAMAGUCHI, M.; YOSHIDA, K.; SUZUKI, R.; NAKAMURA, H. Root Canal Irrigation with Citric Acid Solution. *J Endod*, v.22, n.1, p.27-29, 1996.

ZEHNDER, M. Root Canal Irrigants. *J Endod*, v.32, n.5, p.389-398, 2006.

## **ANEXOS**

## ANEXO 1 – Parecer Comitê de Ética

UNIVERSIDADE DE PASSO  
FUNDO/ VICE-REITORIA DE  
PESQUISA E PÓS-



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** EFEITO DA ATIVAÇÃO DO EDTA E DO ÁCIDO GLICÓLICO COM IRRIGAÇÃO ULTRASSÔNICA PASSIVA E EASYCLEAN NA REMOÇÃO DA SMEAR LAYER, EROSIÃO E CONTEÚDO MINERAL DA DENTINA RADICULAR

**Pesquisador:** LUARA PRESSER SOLDIN

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 02620618.0.0000.5342

**Instituição Proponente:** FUNDACAO UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.059.865

#### Apresentação do Projeto:

O projeto foi apresentado na íntegra pelos pesquisadores.

#### Objetivo da Pesquisa:

Comparar a remoção de smear layer, a erosão dentinária e a distribuição de conteúdo mineral da dentina radicular após a ativação com PUI e EC das seguintes soluções: EDTA 17% e AG variando suas concentrações em 10% e 17%.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Esse estudo não apresenta riscos, uma vez que se trata de um estudo laboratorial, onde serão utilizados dentes provenientes de um Biobanco. Benefícios: Os resultados do presente estudo permitirão elucidar a capacidade de limpeza dos canais radiculares pelo Ácido Glicólico com diferentes métodos de ativação.

#### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A presença de smear layer nas paredes dos canais radiculares promove efeitos indesejáveis no resultado do tratamento endodôntico. Por este motivo ela deve ser removida e o ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) é a substância tradicionalmente indicada. No entanto, ele apresenta algumas características desfavoráveis, como: provocar erosão dentinária, ausência de atividade

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

Continuação do Parecer: 3.059.865

antimicrobiana e originar produtos tóxicos ao meio ambiente durante a sua síntese. Assim, o objetivo deste estudo será avaliar o efeito de dois métodos de ativação do Ácido Glicólico (AG) na sua capacidade de remoção da smear layer, erosão e distribuição do conteúdo mineral de canais radiculares. Serão selecionados oitenta primeiros molares maxilares humanos, onde somente a raiz disto-vestibular será utilizada. Todas as raízes serão submetidas à instrumentação rotatória com limas rotatórias ProTaper Next (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça). A cada troca de instrumento será realizada irrigação com 2 mL de água destilada. Logo após, as raízes serão aleatoriamente divididas em 8 grupos de acordo com a substância utilizada para remoção da smear layer e com o método de ativação da substância, respectivamente: EDTA 17%, AG 17%, AG 10%; e, com irrigação ultrassônica passiva (PUI) ou EasyClean (EC) utilizado em movimento recíprocante. Dois dos grupos serão controles, onde não serão utilizados irrigantes para remoção de smear layer, somente será feita a ativação com EC ou PUI. Em todas as raízes, após a utilização da substância irrigadora final será feita uma irrigação com 5 mL de água destilada. Após o preparo dos canais, as sessenta raízes serão clivadas no sentido longitudinal e analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) para determinar a presença ou ausência da smear layer e avaliar a distribuição de conteúdo mineral da dentina radicular. Os dados serão tabulados e submetidos à análise estatística.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Os direitos fundamentais dos participantes foram garantidos no projeto e no TCLE. 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, metodológicos e éticos.

**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.

Endereço: BR 265- Km 292 Campus I - Centro Administrativo  
Bairro: Divisão de Pesquisa / São José CEP: 99.052-900  
UF: RS Município: PASSO FUNDO  
Telefone: (54)3318-8157 E-mail: cep@upf.br

## ARTIGO SUBMETIDO

---

### **Evaluation of Smear Layer Removal and Dentin Erosion of Glycolic Acid Activated with Reciprocating Activation System and Passive Ultrasonic Irrigation**

Luara Presser Soldin, DDS, MSc, Luiza Grazioli Bacchi, DDS, Ana Paula Farina, DDS, MSc, PhD, Tauane de Souza Passos, DDS, Matheus Albino Souza, DDS, MSc, PhD, Douglas Cecchin, DDS, MSc, PhD\*

From the Department of Restorative Dentistry, College of Dentistry, University of Passo Fundo, Passo Fundo, RS, Brazil.

Address requests for reprints to Dr Douglas Cecchin, Universidade de Passo Fundo, Campus I, Faculdade de Odontologia, BR 285, Km 171, Bairro São José, Caixa Postal 611, 99052-900, Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brazil (Tel.: +55 54 3316 8402; Fax.: +55 54 3316 8403); e-mail address: [douglas@upf.br](mailto:douglas@upf.br)

#### **ABSTRACT**

**Introduction:** The objective of this study was to evaluate the efficacy of glycolic acid (GA) solution on smear layer removal and dentin erosion

using the following irrigation activation techniques: EasyClean (EC), and passive ultrasonic irrigation (PUI). **Methods:** Distobuccal root canals of 80 maxillary molars were instrumented and longitudinally fractured to permit quantification of the smear layer created in the coronal, middle, and apical thirds of the roots by Scanning Electron Microscopy (SEM). After reassembling the fractured root halves, they were divided into eight groups according to the final irrigation solution: distilled water (DW), GA 10%, GA 17%, and 17% EDTA; and, irrigation activation techniques: EC and PUI. After irrigation, SEM images of the same areas, and the percentage of opened dentinal tubules in irrigated areas with respect to the total area was obtained. The results of smear layer removal were subjected to ANOVA and Bonferroni tests ( $\alpha = 0.05$ ). Dentin erosion scores were analyzed using Kruskal-Wallis and Tukey tests ( $\alpha = 0.05$ ). **Results:** When activated with EC, both concentrations of GA (10 and 17%) resulted in the highest percentage of opened dentinal tubule areas than EDTA 17% ( $P < 0.05$ ). When activated with PUI, there were no statistically significant differences between EDTA 17%, GA 10%, and GA 17% ( $P < 0.05$ ). The EDTA and GA solutions did not cause erosion of the root dentin. **Conclusion:** GA was more effective than EDTA in removing the smear layer from the root canal walls when activated with EC.

## **KEY WORDS**

EDTA, Glycolic Acid, Passive Ultrasonic Irrigation, Reciprocating Motion, Smear layer.

## **INTRODUCTION**

The mechanical (hand or mechanical instruments) and chemical (irrigant solutions) root canal preparation results in the deposition of small particles on the root canal walls, called smear layer<sup>1</sup>. It consists of a layer of hard inorganic tissue debris and an organic part composed of vital or necrotic pulp tissue, including remnants of odontoblastic processes, blood cells, and microorganisms and their by-products<sup>2</sup>. Lester and Boyde<sup>3</sup> reported the smear layer as 'organic matter trapped within translocated inorganic dentin'. The smear layer presents a superficial portion with an average thickness of 1–2  $\mu\text{m}$ , and another portion packed inside the dentinal tubules, called the smear plug, which can reach a depth of 40  $\mu\text{m}$ <sup>4</sup>. Removal of this smear layer is recommended<sup>2,4-7</sup> because it decreases the permeability of dentin, which hinders the diffusion and action of antimicrobial agents, such as irrigating solutions and intracanal

medication<sup>2,5,6</sup>. In addition, it impairs the adaptation of filling materials to dentin and therefore compromises an adequate seal<sup>7</sup>.

Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) is the most common solution used for smear layer removal with proven efficiency in the dissolution of inorganic materials. It reacts with the calcium ions in dentin and forms soluble calcium chelates<sup>2,5,8</sup>, leading to decalcification of 20 to 30  $\mu\text{m}$  in depth. However, EDTA may cause dentin erosion, mainly when associated with sodium hypochlorite (NaOCl) during root canal preparation<sup>9-11</sup>, and additional attention must be paid to avoid extrusion of EDTA beyond apical foramen because of its cytotoxicity<sup>12,13</sup>. Environmental concerns have also led researchers to search for other alternatives to EDTA, which is not degraded in biological sewage treatment plants, and substantial inputs of EDTA from sewage are observed in many rivers and lakes<sup>14</sup>. Field studies have shown that complexation with EDTA may mobilize contaminant metal ions. Furthermore, it may avoid the precipitation of heavy metals in solution or, on the contrary, cause a dissolution effect of heavy metals adsorbed in sediments<sup>15,16</sup>. Therefore, EDTA is a direct or indirect pollutant.

Recently, it was demonstrated that glycolic acid (GA) was effective in etching enamel and dentin and originating an adequate surface

for subsequent adhesive procedures<sup>17,18</sup>. In addition, GA has the same capacity of removing the smear layer from root canal walls as EDTA and is less cytotoxic<sup>13</sup>. However, neither GA nor EDTA are able to remove the smear layer completely from dentin, particularly in the apical third, using conventional needle irrigation<sup>13,19</sup>. Thus, irrigant activation techniques such as reciprocating motion with the EasyClean instrument (EC)<sup>20,21</sup>, and passive ultrasonic irrigation (PUI)<sup>20,23</sup> have been suggested to overcome the limitations of conventional needle irrigation.

The EC instrument has a size of 25/0.04 with an aircraft wing-shaped cross section, and is manufactured from an acrylonitrile butadiene styrene plastic to provide flexibility and produce intracanal fluid movement<sup>20,22</sup>. EC provides better removal of the smear layer in the apical third, when compared to PUI<sup>20</sup>. PUI consists of transmission of acoustic energy from an oscillating file or a smooth wire to an irrigant in the root canal. The energy is conducted by means of ultrasonic waves, generating acoustic streaming and cavitation of the irrigant<sup>20-23</sup>. PUI can be an important supplement for cleaning the root canal system, and compared with conventional syringe irrigation, it withdraws more organic tissue, planktonic bacteria and smear layer from the root canal walls<sup>23</sup>.

Hence, the objectives of the present in vitro study were to evaluate the efficacy of smear layer removal from canal walls, and to assess the root canal dentin erosion after final irrigation with GA 10%, GA 17%, and EDTA 17% solutions. All solutions were active with reciprocating motion using an EC instrument or PUI. The null hypothesis was that there would be no significant differences among the irrigation solutions and techniques tested in smear layer removal and dentin erosion.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Sample preparation**

Eighty human first maxillary molars (N = 80) (Research Ethics Committee: 3.059.865) had a distal-buccal root sectioned with a double-sided diamond disc (KG Sorensen, Barueri, SP, Brazil) under irrigation to standardize the root length at 10–12 mm. The working length was determined in the apical foramen with a # 10 K file.

Longitudinal grooves were created on the mesio-distal surfaces of each root with a double-sided diamond disc, operating at low speed. The apical region was coated with dental wax to prevent overflow of the irrigating solutions.

The chemico-mechanical preparation was carried out with a Smart Plus engine (Dentsply, Maillefer, Ballaigues, Suíça) and ProTaper Next (Dentsply, Maillefer, Ballaigues, Suíça) X1, X2, X3, X4, and X5 instruments at a rotation speed of 300 rpm and 200 g/cm of torque, in a rotational movement, according to the manufacturer's recommendations.

With each instrument change, the root canals were irrigated with 2 mL of distilled water using 29 gauge stainless steel needles (NaviTip Tips, Ultradent Products Inc., South Jordan, UT, USA) up to a length of 3 mm below the apical foramen. A metal cannula was used for suction, and at each instrument change, insertion of a #10 K 1 mm file beyond the apex was used to confirm patency.

At the end of the instrumentation, the root canals were dried with absorbent paper tips, and the roots were cleaved into two halves using a microtome blade positioned manually in the previously created grooves.

#### **Initial Analysis in Scanning Electron Microscopy (SEM)**

SEM evaluation was based on the study by Schmidt et al.<sup>24</sup>, which proposed an initial evaluation after instrumentation without the usage of the final irrigant. Three markings on the external surface of the root were performed with a No. 11 scalpel blade, perpendicular to the long

axis, to divide it into cervical, middle and apical thirds at 9 mm, 6 mm, and 3 mm from the apex, respectively. The samples were kept in an oven at 37°C for seven days. The samples did not require metallization for evaluation because of the particular method of obtaining images, developed in this study.

The markings were located at 300x magnification, and later, without changing the sample position, the SEM images of area covered by the smear layer in each third were obtained at 1000x magnification.

### **Experimental groups**

The roots were randomly divided into 8 groups (n = 10) according to the solution used to remove the smear layer - distilled water (DW), GA 10%, GA 17%, and EDTA 17%, and irrigation activation techniques - EC and PUI. All solutions were introduced into the channel with 29 gauge stainless steel needles (NaviTip Tips, Ultradent Products Inc., South Jordan, UT, USA) up to 3 mm below the apical foramen.

**PUI groups:** Irrisonic E1 tip (20/0.01 taper) (Helse Indústria e Comércio, Santa Rosa de Viterbo, Brasil) was positioned 1 mm below the working length, using the Satelec Booster ultrasound (Acteon Brasil, Indaiatuba/SP, Brasil). All solutions were renewed and activated for 3

cycles of 20 s<sup>20</sup>, totaling 6 mL of solution and activation for 1 min in each root. After using the irrigation protocols, each root canal was irrigated with 5 mL of distilled water.

**EC groups:** The irrigating solutions were activated with the EC instrument positioned 1 mm below the working length with reciprocating movements of 180° clockwise, followed by 90° counterclockwise, with the Smart Plus engine<sup>20</sup>. The same solutions were used, with renewal and activation times similar to those mentioned in the PUI group.

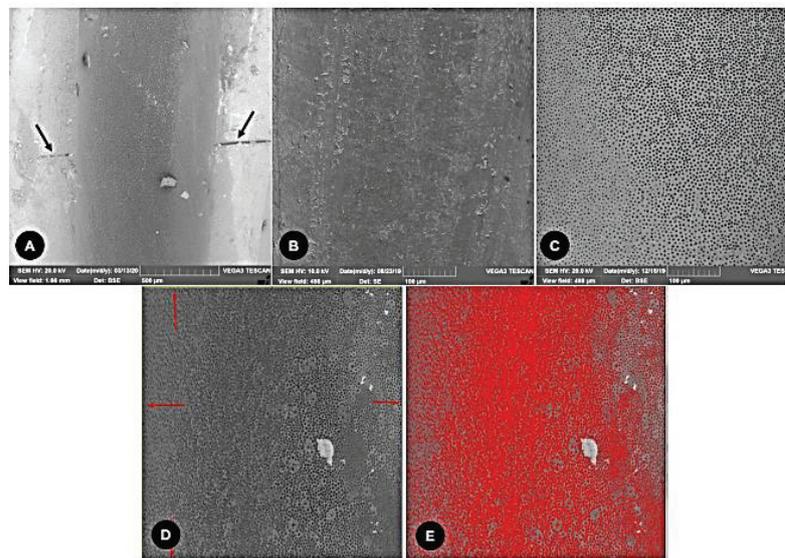
#### **Final Analysis in Scanning Electron Microscopy (SEM)**

After irrigation with the experimental solutions, the teeth were dried with absorbent paper tips and separated again into two halves to be analyzed by SEM. New images of the previously evaluated areas were obtained

#### **Smear layer evaluation**

The images obtained at 1000x magnification were classified and evaluated using the Image J software (version 1.52a). Image processing in this software is shown in Figure 1. Each image generated was converted into an 8-bit grayscale type for better performance and analysis. After

image conversion, selection and identification of the total area of each image was carried out, and calibrated in mm<sup>2</sup>. Subsequently, the smear layer was removed in mm<sup>2</sup> using the Threshold tool, which automatically identifies differences in density in the image and marks the open dentinal tubules in each image. These data were transformed into percentages (%).



**Figure 1. Image processing in the software.** (A) Image in 300x magnification to locate the marks to determine the evaluation area. Black arrows: grooves perpendicular to the axis of the root canal made with a scalpel blade. (B) Image obtained from the apical third of the root, after instrumentation of the root canal, showing the smear layer formed at 1000x magnification. (C) Image obtained after the final irrigation at 1000x magnification. (D) Image processing by Image J. software. The dark areas correspond to the open dentinal tubules and the red arrows are determining the area of the image that will be analyzed. (E) Identification of open dentinal tubules (in red) by Image J. software.

### **Evaluation of dentin erosion**

The images were classified according to the following scoring criteria for dentin erosion: score 0, smear layer covering nearly all dentin surface, with few or no open tubules; Score 1, no erosion: all open tubules without modification in appearance and size; Score 2, moderate erosion: the peritubular dentin was eroded; and Score 3, strong erosion, the intertubular dentin was affected, and the tubules were connected to each other.

### **Statistical Analysis**

Normal distribution of data for smear layer removal was confirmed by the Kolmogorov-Smirnov test. The analysis of normal variance (ANOVA) was used for multiple comparisons with a statistically significant difference between the groups ( $P < 0.0001$ ). The Bonferroni test was used to compare differences among groups ( $P = 0.05$ ). Data were analyzed using Stat Plus version 6.0 (AnalystSoft Inc., Vancouver, BC, Canada).

Two blinded independent investigators analyzed the erosion of root dentin. The kappa coefficient test showed a high agreement between the investigators regarding the interpretation of erosion scores ( $\kappa = 0.856$ ).

The dentin erosion data were analyzed with Kruskal-Wallis test and Tukey tests ( $\alpha = 0.05$ ), and the results were presented using medians and quartiles (to represent data dispersion).

## **RESULTS**

The average and standard deviations of the percentages of open dentinal tubule areas in relation to the total area of the image are shown in Table 1. The smallest percentage of opened dentinal tubule areas was found in the DW group, regardless of whether it was activated with EC or PUI ( $P < 0.05$ ) (Figure 2 and 3). The highest percentage of opened dentinal tubule areas in all groups in this study was found in 10% and 17% GA activated with EC ( $P < 0.05$ ).

When activated with EC, both the concentrations of GA (10 and 17%) resulted in the highest percentage of opened dentinal tubule areas when compared with EDTA 17% ( $P < 0.05$ ). When activated with PUI, there were no statistically significant differences between EDTA 17%, GA 10%, and GA 17% ( $P < 0.05$ ).

On comparison between the coronal, middle, and apical thirds, for opened dentinal tubule areas, no statistically significant difference was found in most groups ( $P > 0.05$ ), except for the EDTA 17% + EC group,

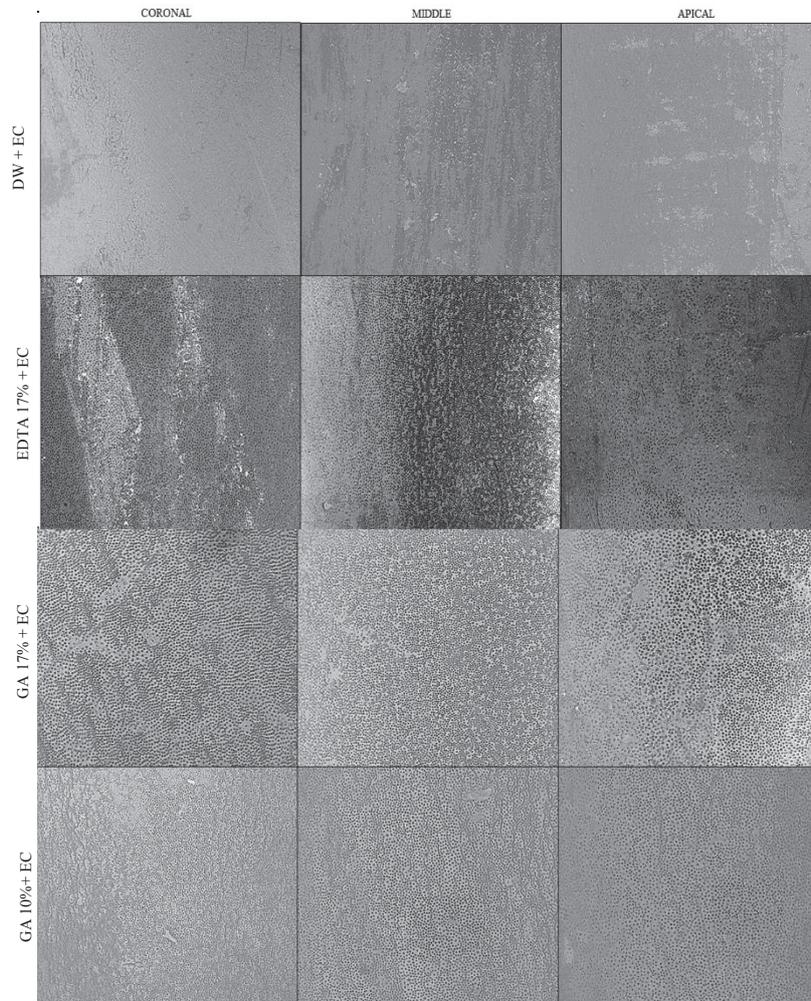
where a lower percentage of open dentinal tubule areas was observed in the apical third ( $P < 0.05$ ).

**TABLE 1.** Average and standard deviations ( $\pm$ SD) of percentage of removal of smear layer, according to different groups.

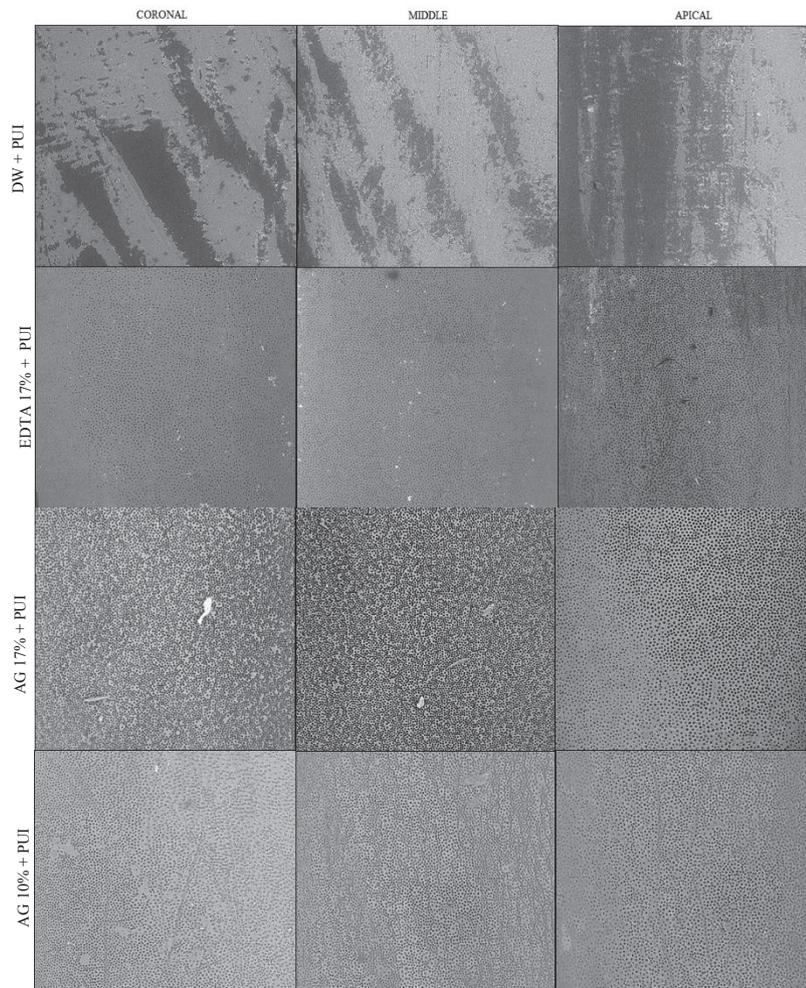
Roots Thirds/Solutions	EasyClean	PUI
Coronal		
DW	13.78 (2.62) <sup>A d</sup>	14.23 (3.88) <sup>A c</sup>
EDTA 17%	56.05 (12.74) <sup>A b</sup>	51.73 (15.14) <sup>A ab</sup>
GA 17%	76.08 (15.65) <sup>A a</sup>	56.60 (11.58) <sup>B a</sup>
GA 10%	73.08 (13.17) <sup>A a</sup>	53.00 (10.76) <sup>B ab</sup>
Middle		
DW	15.02 (2.43) <sup>A d</sup>	14.54 (3.05) <sup>A c</sup>
EDTA 17%	53.16 (14.25) <sup>A b</sup>	52.36 (10.43) <sup>A ab</sup>
GA 17%	73.99 (15.95) <sup>A a</sup>	51.64 (13.14) <sup>B ab</sup>
GA 10%	71.00 (13.56) <sup>A a</sup>	56.78 (6.97) <sup>B a</sup>
Apical		
DW	9.64 (2.76) <sup>A d</sup>	10.25 (2.61) <sup>A c</sup>
EDTA 17%	38.64 (12.25) <sup>A c</sup>	45.25 (14.50) <sup>A b</sup>
GA 17%	71.69 (13.63) <sup>A a</sup>	57.17 (11.43) <sup>B a</sup>
GA 10%	74.35 (10.48) <sup>A a</sup>	55.90 (12.15) <sup>B ab</sup>

EasyClean, reciprocating activation using EasyClean instrument; PUI, passive ultrasonic irrigation; DW, distilled water; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid. GA; glycolic acid.

\*Means followed by different lowercase letters in the same column and uppercase letters in the same row are significantly different ( $P < 0.05$ ).



**Figure 2.** Representative scanning electron microscopy (SEM) images showing samples of the coronal, middle and apical thirds, representing the EasyClean activation technique of the experimental irrigating solutions (1000x magnification).



**Figure 3.** Representative SEM images showing samples of the coronal, middle and apical thirds, representing the activation technique by Passive Ultrasonic Irrigation of experimental irrigating solutions (1000x magnification).

The erosion scores for the experimental groups are summarized in Table 2. DW could not remove the smear layer, and the dentin tubules

were obliterated; hence, it was not viable to observe whether there was dentin erosion in this group. The EDTA and GA solutions in both concentrations, activated with EC and PUI, showed a prevalence of score 1, that is, did not cause erosion in the root dentin.

**TABLE 2.** Median (Md) and first (Q<sub>1</sub>) and third (Q<sub>3</sub>) quartiles of the erosion scores of the experimental groups.

EXPERIMENTAL GROUP	CORONAL			MIDDLE			APICAL		
	Md	Q <sub>1</sub>	Q <sub>3</sub>	Md	Q <sub>1</sub>	Q <sub>3</sub>	Md	Q <sub>1</sub>	Q <sub>3</sub>
DW + EC	0.0 <sub>b</sub>	0.0	0.0	0.0 <sub>c</sub>	0.0	0.0	0.0 <sub>d</sub>	0.0	0.0
DW + PIU	0.0 <sub>b</sub>	0.0	0.0	0.0 <sub>c</sub>	0.0	0.0	0.0 <sub>d</sub>	0.0	0.0
EDTA 17% + EC	1.0 <sub>a</sub>	0.0	1.0	1.0 <sub>bc</sub>	0.0	1.0	0.0 <sub>cd</sub>	0.0	0.5
EDTA 17% + PUI	1.0 <sub>a</sub>	0.0	1.0	1.0 <sub>ab</sub>	1.0	1.0	1.0 <sub>abc</sub>	0.0	1.0
GA 17% + EC	1.0 <sup>a</sup>	1.0	1.0	1.0 <sub>a</sub>	1.0	2.0	1.0 <sub>abc</sub>	0.0	1.0
GA 17% + PUI	1.0 <sup>a</sup>	1.0	1.0	1.0 <sub>ab</sub>	0.0	1.0	1.0 <sub>ab</sub>	1.0	1.0
GA 10% + EC	1.0 <sup>a</sup>	1.0	1.0	1.0 <sub>ab</sub>	1.0	1.0	0.5 <sub>bcd</sub>	0.0	1.0
GA 10% + PUI	1.0 <sup>a</sup>	1.0	1.5	1.0 <sub>ab</sub>	1.0	1.0	1.0 <sub>abc</sub>	1.0	1.0
P value	< 0.001			< 0.001			< 0.001		

EasyClean reciprocating activation using EasyClean instrument; PUI, passive ultrasonic irrigation; DW, distilled water; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid. GA; glycolic acid.

\*Medians followed by different letters in the same column are statistically different (P < 0.05).

## DISCUSSION

Previous studies have shown the ability of GA to remove the smear layer from the coronary and root dentin<sup>13,18,19</sup>. However, similar to EDTA, GA is ineffective in complete removal of the smear layer from the

root canal walls, especially in the apical third<sup>13,19</sup>. Therefore, the main objective of this study was to evaluate the capacity of GA 10 and 17% in smear layer removal of the root canal walls when activated with EC and PUI. The results showed that GA, in both concentrations, when activated with EC showed greater ability to remove the smear layer from the root canal walls than EDTA activated with EC. When activated with PUI, GA in both concentrations demonstrated a similar efficacy in removal of the smear layer as that of EDTA. According to these results, the null hypothesis was rejected.

Previous studies have already demonstrated the ability of GA to remove the smear layer, even when used without any activation methods, and the results produced were comparable to EDTA<sup>13,19</sup>. In our study, when the EC potentiation method was used, GA had an amplified action and removed more smear layer than EDTA potentialized with PUI.

Presently, there are no studies that demonstrate the mechanism by which the GA removes the smear layer from the dentinal walls. However, because EDTA and GA belong to the same Citric Acid (CA) family ( $\alpha$ -hydroxy acids [ $\alpha$ -HA]), it is assumed that the mechanism of action of both is similar. According to Yamaguchi et al.<sup>25</sup>, CA action

occurs through a reaction with metals, forming a soluble non-ionic chelate, which makes it a chelating agent.

In our study, in general, EDTA demonstrated low efficacy around 50% of open dentinal tubules, unlike other studies that showed good cleaning capacity of this irrigating solution<sup>26,27</sup>. This difference can be justified by the evaluation method used in this study, which was carried out before and after the preparation of the channels, by SEM. It was possible to verify the amount of smear layer present before and after the use of the final irrigant, in a specific and predetermined location, allowing to evaluate the real ability to remove smear layer from the root canal walls.

Several techniques have been developed and reported for the enhancement of irrigating solutions<sup>20,21,28</sup> aiming at better penetration and potentiating the effects of removing the smear layer present after the preparation of the root canals. In our study, GA 10 and 17% had the same ability to remove the smear layer as EDTA, when the activation was carried out using the PUI method. The similar results presented by GA 10% and GA 17% demonstrate that GA can possibly be used at lower concentrations without losing its effectiveness.

In general, the groups presented around 50% of the open dentinal tubules, which can be considered as low efficacy of these protocols. This

result may be linked to the reduced activation time of 1 min, and better results can be achieved with an activation time of 3 to 5 min<sup>29</sup>.

In this study, the samples that received EC activation and GA irrigation obtained dentinal walls with a lower percentage of smear layer in comparison with the PUI method, except in the DW and EDTA 17% groups. The positive results of the use of EC have been previously demonstrated by Kato et al.<sup>20</sup>, where the EC method showed better efficacy in removing debris from the wall of the reciprocating moving channels compared to the PUI.

When comparisons of smear layer removal from the cervical, middle, and apical thirds of the root were performed within the same group, the only irrigation protocol that showed a significant difference was EDTA 17% + EC, wherein lower percentages of open dentinal tubules were found in the apical third than in the cervical and middle thirds. Ballal et al.<sup>30</sup> described that, when compared to the use of Qmix and maleic acid, EDTA was less effective in removing the smear layer in the apical third.

The use of irrigating solutions and the activation of these solutions can improve the cleaning and disinfection capacity of the root canals; however, they can also cause erosion in the dentinal walls<sup>31</sup>. In our study, none of the groups caused erosion of the dentin structure. One of

the factors that may have influenced this result is the short period of exposure (1 min) of the samples to these substances. This is in agreement with Çalt and Serper<sup>32</sup>, who concluded that the use of the chelating agent for 1 min is not capable of producing dentin erosion; however, a continuous exposure for 10 min results in excessive peri- and intertubular erosion, making it clear that the erosive effect is time-dependent. In addition, it has also been reported that the use of NaOCl after the chelating agent favors the occurrence of dentinal erosion<sup>33</sup>. In our study, we used DW only after the application of the tested substances.

Based on the results of this study, GA has the potential to be used as a final irrigant. However, more research is needed in order to associate the use of GA with the irrigating substances used during the preparation of the canals (NaOCl or Chlorhexidine), and to verify the effectiveness of the protocol in cleaning and disinfecting dentin as well as its effect on the organic components and inorganic dentin.

## **CONCLUSIONS**

Under the conditions of this study, it was found that GA was more effective than EDTA in removing the smear layer from the root canal walls, when activated with EC. Reciprocating motion with an EC

instrument enhanced the smear removal capacity of the GA solution when compared with PUI.

#### **ACKNOWLEDGMENTS**

We would like to thank Professor Márcia Borba for supporting the statistical analysis.

The authors deny any conflicts of interest related to this study. This study was funded by the Universidade de Passo Fundo (176424) and by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) (grant number 17/2551-0001 019-1). The funders had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

## REFERENCES

1. McComb D, Smith DC. A preliminary scanning electron microscopic study of root canals after endodontic procedures. *J Endod* 1975;1:238–242.
2. Violich DR, Chandler NP. The smear layer in endodontics - a review. *Int Endod J* 2010;43:2–15.
3. Lester KS, Boyde A. Scanning electron microscopy of instrumented, irrigated and filled root canals. *Br Dent J* 1977;143:359–367.
4. Mader CL, Baumgartner JC, Peters DD. Scanning electron microscopic investigation of the smeared layer on root canal walls. *J Endod* 1984;10:477–483.
5. Torabinejad M, Handysides R, Khademi AA, Bakland LK. Clinical implications of the smear layer in endodontics: a review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002;94:658–666.
6. Wang Z, Shen Y, Haapasalo M. Effect of smear layer against disinfection protocols on *Enterococcus faecalis*-infected dentin. *J Endod* 2013;39:1395–1400.

7. Shahravan A, Haghdoost AA, Adl A, Rahimi H, Shadifar F. Effect of smear layer on sealing ability of canal obturation: a systematic review and meta-analysis. *J Endod* 2007;33:96–105.
8. Zehnder M. Root canal irrigants. *J Endod* 2006;32:389–398.
9. Qian W, Shen Y, Haapasalo M. Quantitative analysis of the effect of irrigant solution sequences on dentin erosion. *J Endod* 2011;37:1437–1441.
10. Ramírez-Bommer C, Gulabivala K, Ng YL, Young A. Estimated depth of apatite and collagen degradation in human dentine by sequential exposure to sodium hypochlorite and EDTA: a quantitative FTIR study. *Int Endod J* 2018;51:469–478.
11. Antonijevic D, Milovanovic P, Brajkovic D, Ilic D, Hahn M, Amling M, et al. Microstructure and wettability of root canal dentine and root canal filling materials after different chemical irrigation. *Appl Surf Sci* 2015;355:369-78.
12. 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.

13. Bello YD, Porsch HF, Farina AP, et al. Glycolic acid as the final irrigant in endodontics: Mechanical and cytotoxic effects. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2019;100:323–329.

14. Xue H, Sigg L, Kari FG. Speciation of EDTA in natural waters: Exchange kinetics of Fe-EDTA in river water. *Environ Sci Technol* 1995;29:59–68.

15. Friedly JC, Kent DB, Davis JA. Simulation of the mobility of metal-EDTA complexes in groundwater: the influence of contaminant metals. *Environ Sci Technol* 2002;36:355–363.

16. Kent DB, Davis JA, Joye JL, Curtis GP. Influence of variable chemical conditions on EDTA-enhanced transport of metal ions in mildly acidic groundwater. *Environ Pollut* 2008;153:44–52.

17. Cecchin D, Farina AP, Vidal C, Bedran-Russo AK. A novel enamel and dentin etching protocol using  $\alpha$ -hydroxy glycolic acid: Surface Property, Etching Pattern, and Bond Strength Studies. *Oper Dent* 2018;43:101–110.

18. Cecchin D, Bringhenti IL, Bernardi JB, Leal LO, Souza MA, Bedran-Russo AK, Farina AP. Alpha-hydroxy glycolic acid for root dentin etching: Morphological analysis and push out bond strength. *Int. J. Adhes. Adhes* 2019;90:138-143.

19. Barcellos DPDC, Farina AP, Barcellos R, Souza MA, Borba M, Bedran-Russo AK, et al. Effect of a new irrigant solution containing glycolic acid on smear layer removal and chemical/mechanical properties of dentin. *Sci Rep* 2020;10:7313.

20. Kato AS, Cunha RS, da Silveira Bueno CE, Pelegrine RA, Fontana CE, de Martin AS. Investigation of the efficacy of passive ultrasonic irrigation versus irrigation with reciprocating activation: An environmental scanning electron microscopic study. *J Endod* 2016;42:659–663.

21. Silva EJNL, Carvalho CR, Belladonna FG, et al. Micro-CT evaluation of different final irrigation protocols on the removal of hard-tissue debris from isthmus-containing mesial root of mandibular molars. *Clin Oral Investig* 2019;23:681–687.

22. Virdee SS, Seymour DW, 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.

23. van der Sluis LW, Versluis M, Wu MK, Wesselink PR. Passive ultrasonic irrigation of the root canal: a review of the literature. *Int Endod J* 2007;40:415–426.

24. Schmidt TF, Teixeira CS, Felipe MC, Felipe WT, Pashley DH, Bortoluzzi EA. Effect of ultrasonic activation of irrigants on smear layer removal. *J Endod* 2015;41:1359-1363.
25. Yamaguchi M, Yoshida K, Suzuki R, Nakamura H. Root canal irrigation with citric acid solution. *J Endod* 1996;22:27-29.
26. Saito K, Webb TD, Imamura GM, Godell GG. Effect of shortened irrigation times with 17% Ethylene diamine tetra-acetic acid on smear layer removal after rotary canal instrumentation. *J Endod* 2008;34:1011-1014.
27. Mello I, Kammerer BA, Yoshimoto D, Macedo MCS, Antoniazzi JH. Influence of final rinse technique on ability of Ethylenediaminetetraacetic acid of removing smear layer. *J Endod* 2010;36:512-514.
28. Arslan D, Guneser MB, Dincer AN, Kustarci A, Er K, Siso SH. Comparison of smear layer removal ability of Qmix with different activation techniques. *J Endod* 2016;42:1279-1285.
29. Mancini M, Cerroni L, Iorio L, Dall'asta L, Cianconi L. FESEM evolution of smear layer removal using different irrigant activation methods (EndoActivator, EndoVac, PUI and LAI). An in vitro study. *Clin Oral Investig* 2018;22:993-999.

30. Ballal NV, Jain I, Tay FR. Evolution of the smear layer removal and decalcification effect of QMix, maleic acid and EDTA on root canal dentine. *J Dent* 2016;51:62-68.

31. Simenzo AP, Bueno CES, Cunha RS, Pelegrine RA, Guimarães D, Rocha P et al. Comparative analysis of dentinal erosion after passive ultrasonic irrigation versus irrigation with reciprocating activation: An environmental scanning electron study. *J Endod* 2017;43:141-146.

32. Calt S, Serper A. Time-dependent effects of EDTA on dentin structures. *J Endod*. 2002;28:17–19.

33. Wagner MH, da Rosa RA, de Figueiredo JAP, Duarte MAH, Pereira JR, Só MVR. Final irrigation protocols may affect intraradicular dentin ultrastructure. *Clin Oral Invest* 2017;21:2173-2182.