

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo à Universidade Federal de Goiás – UFG a disponibilizar gratuitamente através da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações – BDTD/UFG, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: **Dissertação** **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor(a):	Alessandro Moreira Freire		
RG:	6085385398	CPF:	80965512053
E-mail:	freirejava@yahoo.com.br		
Afiliação:	Sandoval Aquino Silva freire e Lélia Lúcia Moreira Freire		
Título:	Potencial antimicrobiano de diferentes protocolos de irrigação em canais radiculares infectados		
Palavras-chave:	Enterococcus faecalis, Hipoclorito de sódio, Ultrassom		
Título em outra língua:	Potential antimicrobial different irrigation protocols infected root canals		
Palavras-chave em outra língua:	Enterococcus faecalis, Sodium hypochlorite, Ultrasonics		
Área de concentração:	Clínicas odontológicas		
Número de páginas:	64	Data defesa:	19/03/2015
Programa de Pós-Graduação:	Faculdade de Odontologia		
Orientador(a):	João Batista de Souza		
CPF:		E-mail:	Jbs.ufg@gmail.com
Co-orientador(a):	Carlos Estrela		
CPF:		E-mail:	Estrela3@terra.com.br
Agência de fomento:		Sigla:	
País:		UF:	
		CNPJ:	

3. Informações de acesso ao documento:

Liberação para publicação?¹ total parcial

Em caso de publicação parcial, assinale as permissões:

Capítulos. Especifique: _____

Outras restrições: _____

Havendo concordância com a publicação eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF desbloqueado da tese ou dissertação, o qual será bloqueado antes de ser inserido na Biblioteca Digital.

O Sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua publicação serão bloqueados através dos procedimentos de segurança (criptografia e para não permitir cópia e extração de conteúdo) usando o padrão do Acrobat Writer.



Assinatura do(a) autor(a)

Data: 08 / 04 / 2015

¹ Em caso de restrição, esta poderá ser mantida por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Todo resumo e metadados ficarão sempre disponibilizados.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

ALESSANDRO MOREIRA FREIRE

**Potencial Antimicrobiano de Diferentes Protocolos
de Irrigação em Canais Radiculares Infectados**

Goiânia
2015

ALESSANDRO MOREIRA FREIRE

**Potencial Antimicrobiano de Diferentes Protocolos de Irrigação em
Canais Radiculares Infectados**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás para obtenção de título de Mestre em Odontologia, área de Concentração Clínica Odontológica.

Linha de pesquisa: Perspectiva em Odontologia Clínica.

Orientador: Prof. Dr. João Batista de Souza

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Estrela

Goiânia

2015

Ficha catalográfica elaborada automaticamente
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob orientação do Sibi/UFG.

Moreira Freire, Alessandro

Potencial antimicrobiano de diferentes protocolos de irrigação em
canais radiculares infectados [manuscrito] / Alessandro Moreira
Freire. - 2015.

LXIV, 64 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. João Batista de Souza; co-orientador Carlos
Estrela.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Faculdade
de Odontologia (FO) , Programa de Pós-Graduação em Odontologia,
Goiânia, 2015.

Bibliografia. Anexos.

Inclui siglas, abreviaturas, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Enterococcus faecalis. 2. Hipoclorito de sódio . 3. Ultrassom. I.
Batista de Souza, João , orient. II. Estrela, Carlos , co-orient. III. Título.

BANCA EXAMINADORA DE DISSERTAÇÃO

Aluno: Alessandro Moreira Freire

Orientador: Prof. Dr. João Batista de Souza

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Estrela

Membros:

1. Prof. Dr. João Batista de Souza (Presidente)

2. Prof. Dr. Daniel de Almeida Decúrcio

3. Prof^a. Dra. Cyntia Rodrigues de Araújo Estrela

Suplente:

1. Prof. Dr. Álvaro Henrique Borges

2. Prof. Dr. Rhonan Ferreira da Silva

Alessandro Moreira Freire


Potencial antimicrobiano de diferentes protocolos de irrigação em canais radiculares infectados.

Dissertação defendida e aprovada em 19/03/2015, pela Banca Examinadora constituída por:


Prof. Dr. João Batista de Souza
Presidente da Banca



Prof. Dr. Daniel de Almeida Decúrcio
Membro da Banca



Prof. Dr.ª Cyntia Rodrigues de Araújo Estrela
Membro da Banca



Prof. Dr. Carlos Estrela
Membro da Banca

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família Érica e Arthur, aos meus pais, Sandoval e Lélia, e aos meus irmãos, Fabiano e Thiago pelo amor, pela dedicação, incentivo e apoio em todas as etapas da minha vida. Obrigado por tudo que vocês fazem por mim.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, por me conceder sabedoria nas escolhas dos melhores caminhos, coragem e força para nunca desistir e proteção para me amparar.

Aos meus pais, Sandoval e Lélia por terem me dado educação, amor e sempre me deram forças para eu continuar seguindo na constante busca pelo conhecimento.

À minha esposa Érica que é o esteio da minha família, o alicerce que sustenta todos os momentos de dificuldade e que teve um papel fundamental na construção desse trabalho.

Ao meu filho Arthur que é o motivo maior para o meu crescimento como pai, cidadão e profissional e assim ser um exemplo para ele.

Aos meus irmãos Fabiano e Thiago, eternos companheiros e melhores amigos, sempre prontos para ajudar.

Ao meu sogro Moacyr, sogra Alba e cunhado Bruno pelo incentivo e apoio em todos os meus projetos.

Em especial, ao meu co-orientador Prof. Carlos Estrela, pelo exemplo de amor à profissão, disciplina e dedicação como pai, professor e pesquisador. Obrigado meu mestre e mentor, tudo o que sou como profissional devo a ti.

Ao meu orientador Prof. João Batista de Souza pelo carinho e atenção e por ter destinado parte de seu tempo para correções e considerações pertinentes ao meu trabalho.

À Prof.^a. Ana Helena Alves G. de Alencar que além da sua dedicação e competência, destina atenção especial nas revisões e sugestões.

Aos meus amigos e Professores Daniel Decúrcio e Júlio Almeida que são minha referência na docência.

À Prof^a Denise Ramos, companheira incansável, pesquisadora detalhista e disciplinada, a qual eu devo muita gratidão por tudo que aprendi nesses últimos meses. Sem você esse projeto seria inviável.

Aos amigos Juliano, Giulliano, Vinícius, Roberto e Diego que me ajudaram muito na concretização desse trabalho.

À minha Administradora e ASB Lúcia Morais, sempre solícita para ajudar em todos os momentos.

Aos colegas do Programa de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás que compartilharam comigo excelentes momentos de descontração, aprendizado e crescimento pessoal e profissional.

Ao Programa de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás, em especial à Prof^a. Luciane Ribeiro de Rezende Sucasas da Costa que concentra todo seu esforço para que esse programa seja de excelência.

Aos professores docentes do Programa de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás que com muito empenho, preocuparam-se em transmitir seus conhecimentos para formação de novos mestres.

À Gláucia que diante do dever de assessorar todas as atividades concernentes ao Programa de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás, sempre nos tratou de maneira respeitosa e atendeu nossas necessidades.

Aos meus amigos de longa data, que de alguma forma, contribuíram neste processo de conquista e superação.

RESUMO

O objetivo desse trabalho foi comparar o efeito antibacteriano de protocolos de irrigação (pressão positiva, negativa e ultrassônica passiva), utilizando hipoclorito de sódio a 2,5%, associados ao preparo do canal radicular com instrumentos de níquel-titânio. Quinze incisivos centrais superiores extraídos foram selecionados e os canais radiculares preparados, inoculados com *E. faecalis* e incubados a 37°C por sessenta dias. Os dentes foram aleatoriamente divididos em 5 grupos: Grupo 1- Preparo automatizado do canal radicular (PACR) e irrigação com pressão negativa (IPN) com hipoclorito de sódio a 2,5%; Grupo 2- (PACR) e irrigação com pressão positiva (IPP) com hipoclorito de sódio a 2,5%; Grupo 3- (PACR) e irrigação ultrassônica passiva (PUI) com hipoclorito de sódio a 2,5%. Grupos 4 e 5- Controles positivo e negativo, respectivamente. A redução bacteriana foi avaliada em três dentes de cada grupo utilizando cultura. Na cultura microbiana as amostras foram coletadas dos canais radiculares e imersas em 7 mL de Lethen Broth (LB) seguido por incubação a 37°C por um período de 48 horas. O crescimento bacteriano foi analisado pela turbidez do meio de cultura seguido por espectrofotometria UV. A média e o desvio padrão da coleta inicial, coleta de 20 minutos e coleta de 72 horas foram obtidos. A diferença entre os grupos foi avaliada pelo teste ANOVA para medidas repetidas, post hoc Bonferroni. Foram considerados significativos valores de $p < 0,05$. A análise antibacteriana dos protocolos de irrigação, com hipoclorito de sódio 2,5% não demonstrou efetividade em dentina infectada por *Enterococcus Faecalis* em 60 dias, porém houve redução bacteriana em todos os grupos avaliados.

Palavras-chave: *Enterococcus faecalis*, Hipoclorito de Sódio, Ultrassom.

ABSTRACT

The aim of this study was to compare the antibacterial effect of irrigation protocols (positive, negative and passive ultrasonic pressure) using sodium hypochlorite 2.5% associated with root canal preparation with nickel-titanium instruments. Fifteen extracted maxillary central incisors were selected and root canals prepared, inoculated with *E. faecalis* and incubated at 37°C for sixty days. The teeth were randomly divided into 5 groups: Group 1 - automated root canal preparation (PACR) and irrigation with negative pressure (IPN) with sodium hypochlorite 2.5%; Group 2 - PARC irrigation and positive pressure (IPP) with sodium hypochlorite 2.5%; Group 3- PARC and passive ultrasonic irrigation (PUI) with sodium hypochlorite 2.5%. Groups 4 and 5 - positive and negative controls, respectively. Bacterial reduction was assessed in each group of three teeth using culture. In microbial culture, samples were taken from the root canals and immersed in 7 mL of Lethen Broth (LB) followed by incubation at 37 ° C for a period of 48 hours. The bacterial growth was assessed by turbidity of the culture medium followed by UV spectrophotometry. The average and standard deviation of the initial collection, 20 minutes collection and 72 hours collection were obtained. The difference between groups was evaluated by ANOVA for repeated measures, post hoc Bonferroni. Significance level was $p < 0.05$. The antibacterial analysis of irrigation protocols with 2.5% sodium hypochlorite has not been effective in infected dentin by *Enterococcus faecalis* in 60 days, but there was bacterial reduction in all groups evaluated.

Keywords: *Enterococcus faecalis*, Sodium Hypochlorite, Ultrasonics.

Lista de Ilustrações

Figura 1 – A) Raiz acoplada ao fundo do Eppendorf. B) Vista superior do interior da montagem. C) Plataforma montada.	15
Figura 2 – Foto ilustrativa do sistema EndoVac. A. Dispositivo acoplado a bomba de sucção; B. Ponta Master; C. Microcânula; D. Dispositivo digital de titânio; E. Macrocânula; F. Peça de mão em titânio	18
Figura 3 – Esquema do preparo dos grupos referente ao sistema EndoVac	18
Figura 4 – Esquema do preparo dos grupos referente ao modelo convencional de irrigação	19
Figura 5 – Esquema do preparo dos grupos referente ao sistema de irrigação ultrassônica passiva(PUI).....	20
Figura 6 –Foto ilustrativa do ultrassom utilizado para acionar a ponta Irrisonic (PUI)	20

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Média e desvio padrão dos valores de análises das densidades ópticas associadas ao número de bactérias obtidos na coleta inicial, decorridos 20 min. e 72 h.	23
Tabela 2 – Eficácia antimicrobiana dos protocolos de irrigação em canais radiculares humanos infectados por <i>E. faecalis</i>	23

Lista de Abreviaturas e Siglas

ATCC	American type culture collection
B.H.I	Brain Hearth infusion
E.D.T.A	Acido etilenodiamino tetra-acetico
<i>E.Faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
L.B.	Letheen Broth
NaOCL	Hipoclorito de Sódio
P.A.C.R.	Preparo automatizado do canal radicular
I.P.P.	Irrigação por pressão positiva
I.P.N.	Irrigação por pressão negativa
P.U.I.	Irrigação ultrassonica passiva
mm	Milímetros
mL	Mililitros
s	Seguntos
n	Numero de amostras
min	Minutos
h	Horas

Sumário

1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVOS	13
2.1 OBJETIVOS GERAL	13
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3 METODOLOGIA	14
4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	22
5 RESULTADOS	23
6 DISCUSSÃO	24
7 CONCLUSÃO	29
REFERENCIAS	30
ANEXO	34
ANEXO A – EXTRATO SAP	36
ANEXO B – PUBLICAÇÃO	39
ANEXO C – HINDAWI PUBLISHING CORPORATION - THE SCIENTIFIC WORLD JOURNAL	41
ANEXO D – POTENTIAL ANTIMICROBIAL OF DIFFERENT IRRIGATION PROTOCOLS IN INFECTED ROOT CANALS	46

1. INTRODUÇÃO

O sucesso do tratamento das infecções endodônticas depende de vários procedimentos que incluem a sanificação e a modelagem dos canais radiculares (Nair *et al.*, 2005; Estrela *et al.*, 2014). O ambiente do canal radicular favorece a colonização e conseqüentemente a formação de um denso biofilme resistente aos antimicrobianos e, muitas vezes, inacessíveis aos instrumentos e irrigantes endodônticos (Estrela *et al.*, 2009; Wilson, 1996; Zehnder, 2006). A complexidade anatômica do canal radicular é um dos grandes desafios durante a instrumentação, o processo de desinfecção e eliminação do biofilme bacteriano. Estruturada em biofilme, a bactéria é menos susceptível aos agentes antimicrobianos do que a sua forma planctônica, portanto a escolha de uma solução irrigadora eficaz é fundamental (Wilson, 1996).

O tratamento endodôntico, principalmente de canais infectados, necessita de uma solução irrigadora que apresente uma série de propriedades que auxiliem o profissional no preparo e desinfecção dos canais radiculares, tais como: facilitar a ação do instrumento endodôntico; alterar o pH do meio; controlar uma possível infecção em caso de pulpectomia; neutralizar o conteúdo presente nas infecções endodônticas; remover matéria orgânica (restos pulpares) e inorgânica (detritos, raspas dentinárias) da cavidade pulpar, permitir uma ação direta e intensa do agente antimicrobiano com a microbiota endodôntica, apresentar compatibilidade biológica com os tecidos periapicais (Estrela *et al.*, 2004).

O hipoclorito de sódio pertence ao grupo dos compostos halogenados, sendo que seu emprego em Odontologia iniciou-se em 1792, quando foi produzido pela primeira vez e recebeu o nome de Água de Javele (Estrela *et al.*, 2004). A solução é usada como irrigante na endodontia desde 1920 por apresentar propriedades fundamentais como um largo espectro de ação, efeito antimicrobiano (contra esporos e vírus) e dissolução de matéria orgânica vital ou necrótica (Zehnder, 2006). No entanto sua interação com a dentina pode levar à perda na imunorreatividade do colágeno tipo I, levando ao comprometimento de sua estrutura (Haapasalo *et al.*, 2007).

O mecanismo de ação do hipoclorito de sódio causa alterações biossintéticas no metabolismo celular e destruição de fosfolipídios, formação de cloraminas que

interferem no metabolismo celular, ação oxidativa com inativação enzimática irreversível na bactéria e degradação ácida de lipídios e gorduras (Estrela *et al.*, 2002). Porém a efetividade do irrigante depende fundamentalmente do contato direto com os microorganismos, o volume do irrigante, o tempo de ação e o protocolo de irrigação (Estrela *et al.*, 2003; Zhender, 2006; Haapasalo *et al.*, 2010).

A irrigação do canal radicular deve manter um equilíbrio entre a efetividade e a segurança. O protocolo tradicional é realizado levando-se o irrigante ao interior do canal por meio de seringas conectadas a agulhas de diferentes modelos. A ponta dessa agulha é colocada a 2 ou 3 mm do comprimento de trabalho e o irrigante é liberado de acordo com a pressão exercida pelo operador no êmbolo da seringa. No entanto, se a agulha for colocada travada na porção apical ou se a pressão sobre a seringa não for cuidadosamente controlada, a chance de extrusão dessa solução aumenta, podendo resultar em um grave acidente (Hockett *et al.*, 2008).

Recentemente, o uso de protocolos de irrigação com pressão negativa tem sido relatado apresentando resultados superiores aos da pressão positiva. Esses sistemas são apresentados como uma maneira mais segura e efetiva de irrigação, alcançando melhor controle microbiano quando comparados aos tradicionais (Haapasalo *et al.*, 2010; Hockett *et al.*, 2008; Nielsen & Baumgartner, 2007).

O EndoVac (Discus Dental, Culver City, CA) é comercializado como um sistema de irrigação com pressão negativa que combina uma ponta *master* que leva o irrigante à cavidade de acesso enquanto uma macro e uma microcânula levam a mesma solução para o interior do canal radicular e tiram por meio da mangueira de sucção. O sistema é ligado a uma bomba de sucção de alta potência, a qual possibilita o fluxo do líquido em pressão negativa. Há evidências de que, comparado ao sistema tradicional de irrigação com agulha, o EndoVac está consideravelmente menos relacionado com o extravasamento de solução para a região periapical e além disso, o fluxo reverso de irrigante promove uma melhor limpeza da porção apical do canal radicular no comprimento de trabalho e com reduzido nível de dor pós-operatória (Gondim *et al.*, 2010; Haapasalo *et al.*, 2010).

Devido à uma complexa anatomia interna, mesmo com o uso de instrumentos rotatórios com variadas flexibilidades e conicidades e com o emprego dos mais variados agentes irrigantes, estudos ainda mostram que existem diversas superfícies e áreas irregulares no sistema de canais radiculares que continuam sem limpeza, e consequentemente contam com a presença de debris e bactérias (Peters *et al.*,

2001). Vários estudos *in vivo* e *in vitro* têm mostrado então, a irrigação ultrassônica como importante coadjuvante para a remoção de debris de áreas que o instrumento rotatório ou a irrigação passiva não tem alcançado (Goodman *et al.*, 1985; Gustarts *et al.*, 2005; Van Der Sluis *et al.*, 2007).

Apesar dos resultados promissores da pressão negativa na sanificação do canal radicular apresentados até o momento, poucos estudos foram desenvolvidos em relação à ação do sistema EndoVac sobre o biofilme. O alto índice de insucesso nos casos de tratamentos endodônticos de dentes infectados, em torno de 40% (Pinheiro *et al.*, 2003), nos estimula na busca de estratégias de sanificação de canais radiculares tão eficazes quanto seguros para os tecidos que circundam o canal radicular.

Portanto o objetivo deste trabalho foi comparar o efeito antibacteriano de protocolos de irrigação (pressão positiva, negativa e ultrassônica passiva), utilizando hipoclorito de sódio a 2,5%, associados ao preparo do canal radicular com instrumentos de níquel-titânio.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAL

Comparar o efeito antibacteriano de protocolos de irrigação (pressão positiva, negativa e ultrassônica passiva), utilizando hipoclorito de sódio a 2,5%, associados ao preparo do canal radicular com instrumentos de níquel-titânio.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1)** Observar se o uso do protocolo de irrigação negativa com o hipoclorito de sódio a 2,5% pode levar a uma redução bacteriana.

- 2)** Verificar se a irrigação ultrassônica passiva tem efetividade na redução bacteriana em análise por densidade óptica em espectrofotometria.

3. METODOLOGIA

O estudo teve início após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás (C.A.A.E. nº 19811113.0.0000.5083).

Preparo dos dentes

Quinze dentes humanos anteriores superiores unirradiculares extraídos e cedidos por pacientes, maiores de 18 anos, atendidos na Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás e com indicação de exodontia por motivo periodontal ou protético foram selecionados para o estudo. Foram excluídos dentes com obliteração do canal radicular e com dilaceração da raiz. Os dentes extraídos foram acondicionados em frasco contendo solução de timol 0,2%. Após remoção deste meio, foram imersos em hipoclorito de sódio 5% (Fitofarma, Lt. 20442, Goiânia, GO, Brasil) por 30 minutos para remoção de tecidos orgânicos. Foram realizadas radiografias periapicais dos dentes nos sentidos vestibulo-lingual e próximo-proximal, utilizando-se filme radiográfico (Eastman Kodak Comp., USA) para confirmar presença de um único canal e ausência de variações anatômicas.

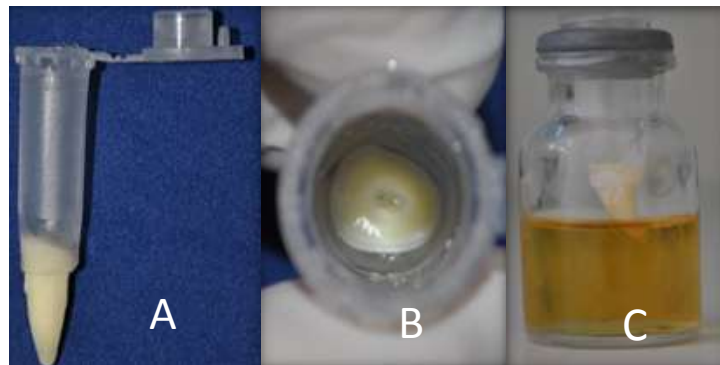
Foram preparadas cavidades de acesso padrão e a patência do canal foi alcançada com lima tipo K-flex #15 (Maillefer, Ballaigues, Switzerland), comprovado pela visualização direta da ponta da lima no forame apical. O diâmetro anatômico dos canais foi padronizado a partir do preparo inicial com limas tipo K-flex #15 e #20 (Maillefer, Ballaigues, Switzerland). O preparo dos terços cervical e médio foi realizado com os instrumentos #25.10/#25.08/#25.06 e #25.04. O terço apical foi instrumentado com os instrumentos BioRace na sequência #35.04 e #40.04 sendo cada um utilizado em apenas cinco canais radiculares. Os canais radiculares foram irrigados com 3 mL de NaOCl 2,5% a cada troca de lima.

Posterior ao preparo do canal radicular, sob contínuo jato de ar/água, as coroas foram removidas com broca laminada Endo-Z (Maillefer, Ballaigues, Switzerland) em alta rotação, num ângulo de 90° com o longo eixo do dente, e os comprimentos radiculares padronizados em 16 mm. Os canais foram secados com cones de papel absorvente e preenchidos com EDTA 17% (pH 7.2 – Fórmula e Ação, São Paulo, SP, Brasil) por 3 minutos para remoção da *smear layer*. Os dentes foram autoclavados por 30 minutos a 120° C.

Delineamento

Os dentes foram montados em uma plataforma experimental de forma a permitir a inoculação do marcador biológico. A porção coronária do canal radicular de cada dente foi conectada a um tubo Eppendorf de polipropileno de 1,5mL (Cral, São Paulo, SP, Brasil) que teve o fundo removido para adaptação da porção cervical da raiz (ilustração A da figura 1). Um adesivo cianoacrilato (Super Bonder, Itapevi, SP, Brasil) foi utilizado para prevenir infiltração na conexão, que ainda foi inteiramente coberta com duas camadas de esmalte de unha (Max Factor, Cosmetics and Fragrances, London, UK). Os espécimes (dentes acoplados com os tubos de polipropileno) foram esterilizados em hipoclorito de sódio 5% por 30 minutos. Posteriormente, cada dente foi acoplado a um frasco de 20mL contendo 10mL do meio de cultura (BHI) de forma que a porção apical da raiz permanecesse submersa durante todo o período de inoculação (ilustração C da figura 1). Para assegurar a esterilização, o aparato teste foi incubado a 37°C por 24 horas. Decorrido o período, nenhum crescimento bacteriano foi observado.

Figura 1 – A) Raiz acoplada ao fundo do Eppendorf. B) Vista superior do interior da montagem. C) Plataforma montada.



Indicador biológico

Foi utilizada uma cepa referência de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) obtida da *American Type Culture Collection*. A cepa bacteriana foi inoculada em 7 mL de infusão cérebro coração (BHI; Difco Laboratories, Detroit, Mi, USA) e incubada a 37°C por 24 horas. Vinte e quatro horas antes da inoculação dos dentes, as bactérias foram novamente cultivadas, na superfície do ágar infusão cérebro coração (BHI; Difco Laboratories), seguindo as mesmas condições de incubação. O inóculo bacteriano foi obtido pela resuspensão das células em solução salina em uma concentração final de aproximadamente 3×10^8 células mL⁻¹, ajustada para o padrão turbidez 1 de McFarland.

Para contaminação das amostras, 5 mL do BHI esterilizado foram misturados a 5 mL da suspensão bacteriana, e o grupo experimental e controle positivo foram inoculados com *E. faecalis* por 60 dias, usando seringas esterilizadas com volume suficiente para preencher o canal radicular. Este procedimento foi repetido a cada 72 horas, sempre utilizando cultura pura com 24 horas de preparo e ajustada ao padrão 1 de McFarland. Os dentes foram mantidos em estufa microbiológica a 37°C.

Após o período de formação do biofilme, os canais foram secados e preenchidos com água destilada. Pontas de papel esterilizadas n. 40 (Tanari, Tanariman Indústria Ltda., Manacaru, AM, Brasil) foram introduzidas dentro do canal radicular e mantidas por 3 minutos para coleta da amostra. Cada amostra foi coletada utilizando três pontas de papel. As pontas foram individualmente imersas em 7 mL de BHI adicionado com neutralizantes [(Tween 80 e tiosulfato de sódio (P.A., Laboratório Art, Campinas, SP, Brasil)] em concentrações apropriadas, seguida pela incubação a 37°C por 48 horas. Depois de verificado o crescimento bacteriano, os grupos experimentais foram preparados.

Inicialmente, as raízes foram removidas das plataformas, tiveram seus forames vedados com resina acrílica e, posteriormente, foram aleatoriamente divididas em três grupos experimentais e dois grupos controle, cada grupo com três raízes preparadas (n=3), de acordo com a técnica de irrigação testada, da seguinte forma:

Grupo 1: Preparo automatizado do canal radicular (PACR) + Irrigação com pressão negativa (IPN) + Hipoclorito de sódio 2,5%;

Grupo 2: PACR + Irrigação com pressão positiva (IPP) + Hipoclorito de sódio 2,5%;

Grupo 3: PACR + Irrigação ultrassônica passiva (PUI) + Hipoclorito de sódio 2,5%;

Grupo 4: Controle negativo;

Grupo 5: Controle positivo.

Os grupos experimentais foram preparados com o sistema RaCe (FKG Dentaire, Swiss Dental Products, La Chaux-de-Fonds, Swiss) na sequência #45.02, #50.04, #55.02 e #60.02 sendo cada um utilizado em apenas cinco canais.

No grupo 1 o sistema EndoVac (Discus Dental, Culier City, CA, USA) foi utilizado de acordo com as recomendações do fabricante. A irrigação foi realizada durante todo o preparo com a ponta master do dispositivo acoplada à seringa, ligada a um sistema de sucção a vácuo. Uma irrigação inicial com 10 mL da solução testada foi realizada com a ponta master posicionada na entrada do canal radicular antes e após instrumentação com a Race #45.02. Após a instrumentação com a Race #50.02 e #55.02, a irrigação foi realizada utilizando-se a macrocânula. A macrocânula, com calibre ISO n. 55 e conicidade 02 foi acoplada à peça de mão em titânio e posicionada no comprimento 10,5mm permanecendo por 30 segundos com irrigação contínua promovida pela seringa de irrigação do sistema. Após instrumentação com a Race #60.02, a irrigação foi realizada utilizando-se a microcânula, com diâmetro 0,32mm acoplada a uma peça digital de titânio, colocada no comprimento de trabalho e mantida em posição por 6 segundos, recuada 2mm e mantida nesta posição por mais 6 segundos, mais 6 segundos no comprimento de trabalho. O tempo descrito em todas as fases de irrigação é indicado pelo fabricante, e após a finalização de cada fase é marcado e anotado o volume de irrigante utilizado. O sistema EndoVac está ilustrado na figura 2. Após o preparo, o canal radicular foi secado com ponta de papel absorvente n. 60 esterilizada e o ciclo da microcânula foi realizado com EDTA 17% que foi mantido no canal por um período de 3 minutos. Posteriormente, um ciclo final foi realizado com a solução testada.

Figura 2 – Foto ilustrativa do sistema EndoVac. A. Dispositivo acoplado a bomba de sucção; B. Ponta Master; C. Microcânula; D. Dispositivo digital de titânio; E. Macrocanula; F. Peça de mão em titânio.

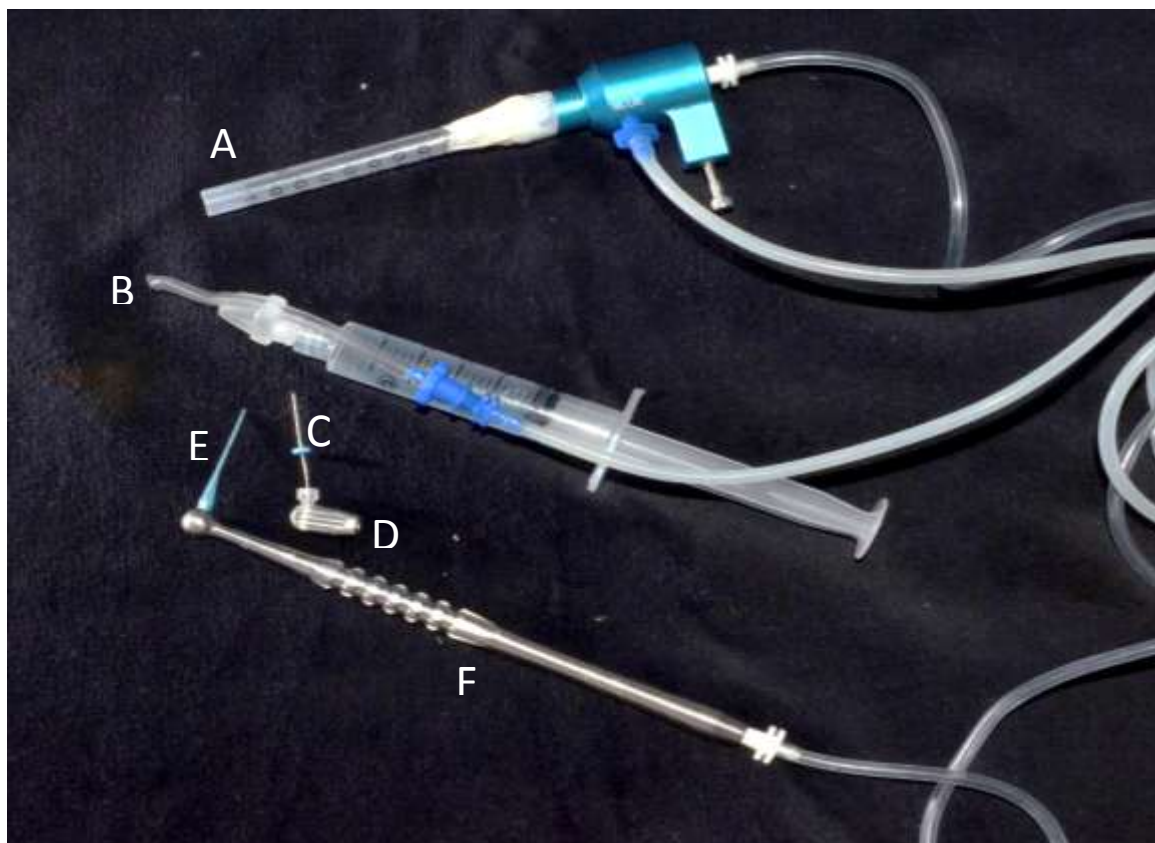
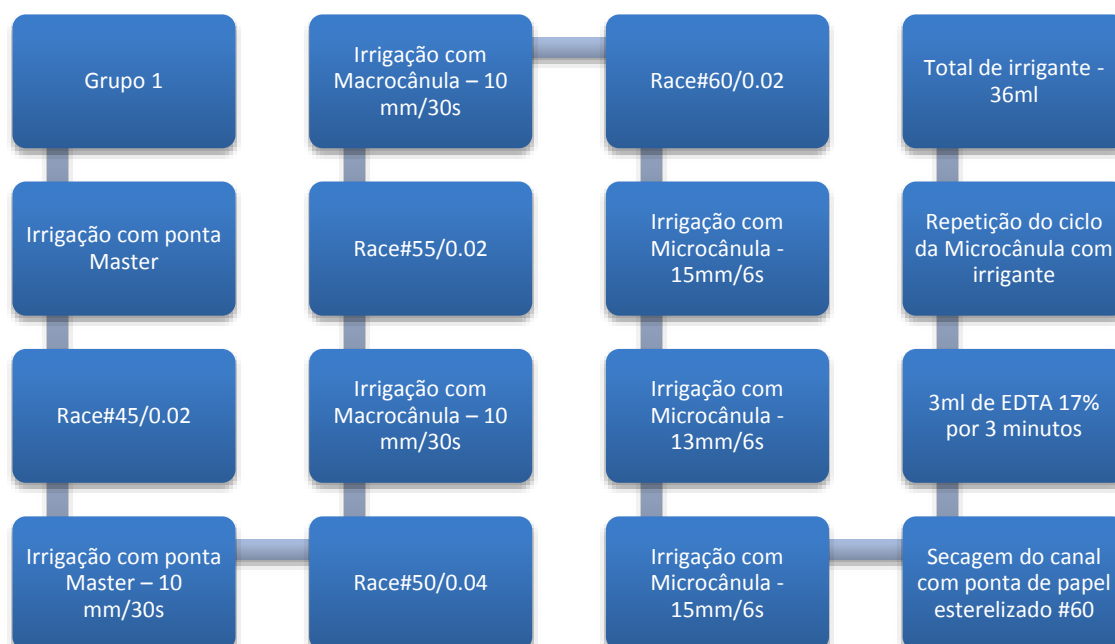


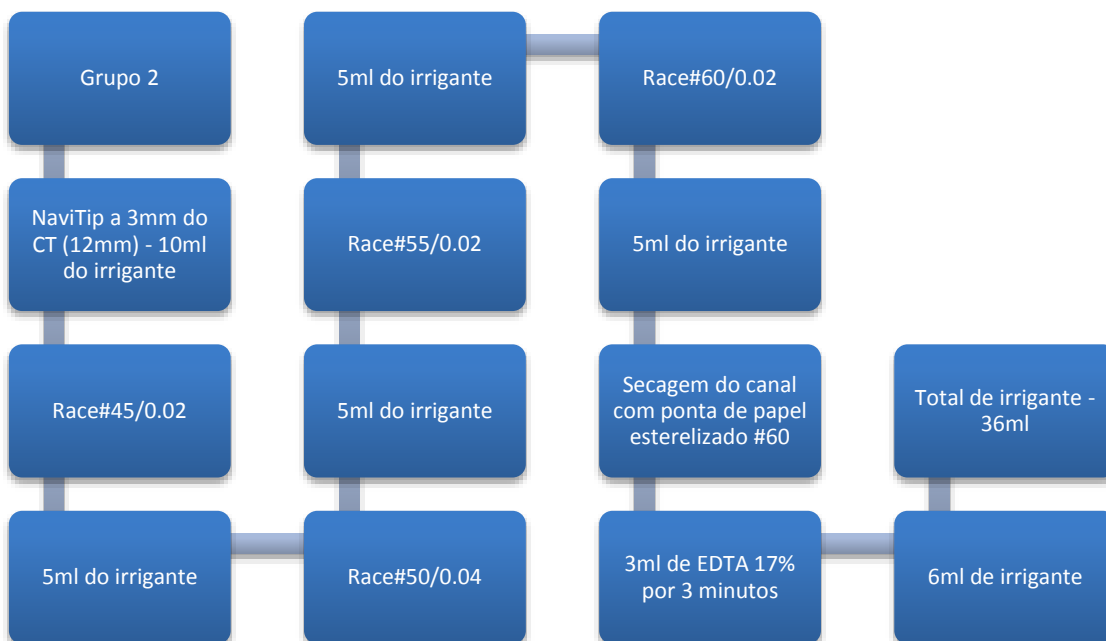
Figura 3 – Esquema do preparo dos grupos referente ao sistema EndoVac.



Após o preparo da primeira amostra foi verificado que um total de 36 mL de hipoclorito de sódio 2,5% foi utilizado e esse volume foi mantido para todos os protocolos subsequentes, como mostra a figura 3.

No grupo 2 a irrigação convencional foi realizada com seringa Ultradent 5mL e cânula de irrigação Navitips (Ultradent Products Inc. 505 West 10200, South, South Jordan, UT 84095) com diâmetro de 0,30mm posicionada em 12mm. Após o preparo, o canal radicular foi seco com ponta de papel absorvente #60 esterilizada e irrigado com 3 mL de EDTA 17% mantido sob agitação com um instrumento lentulo (Maillefer, Ballaigues, Switzerland) acionado a motor de baixa rotação por 1 minuto, e mantido em repouso por 2 minutos, completando um total de 3 minutos. Após esse período, o canal foi irrigado com a solução teste.

Figura 4 – Esquema do preparo dos grupos referente ao modelo convencional de irrigação.



No grupo 3 os canais radiculares foram preparados da mesma maneira do grupo de irrigação convencional. No entanto, na irrigação posterior ao último instrumento, a solução foi agitada pela ponta ultrassônica E1-Irrisonic (Helse Dental Technology, Santa Rosa de Viterbo-SP, Brasil), acoplada ao Ultrassom EMS Piezon Master 200 (EMS, São Bernardo do Campo-SP, Brazil), ajustada à potência de 20%. A ponta ultrassônica foi posicionada no comprimento de trabalho e ativada por 30 segundos com o cuidado de não tocar as paredes do canal radicular. Os canais foram secados com pontas de papel absorventes e irrigados com 3ml de EDTA 17%

que foi agitado por 30 segundos com a ponta ultrassônica e mantido em repouso 2 minutos e 30 segundos, totalizando um tempo de 3 minutos, após o qual o canal foi novamente irrigado com a solução de hipoclorito de sódio 2,5%.

Figura 5 – Esquema do preparo dos grupos referente ao sistema de irrigação ultrassônica passiva(PUI).

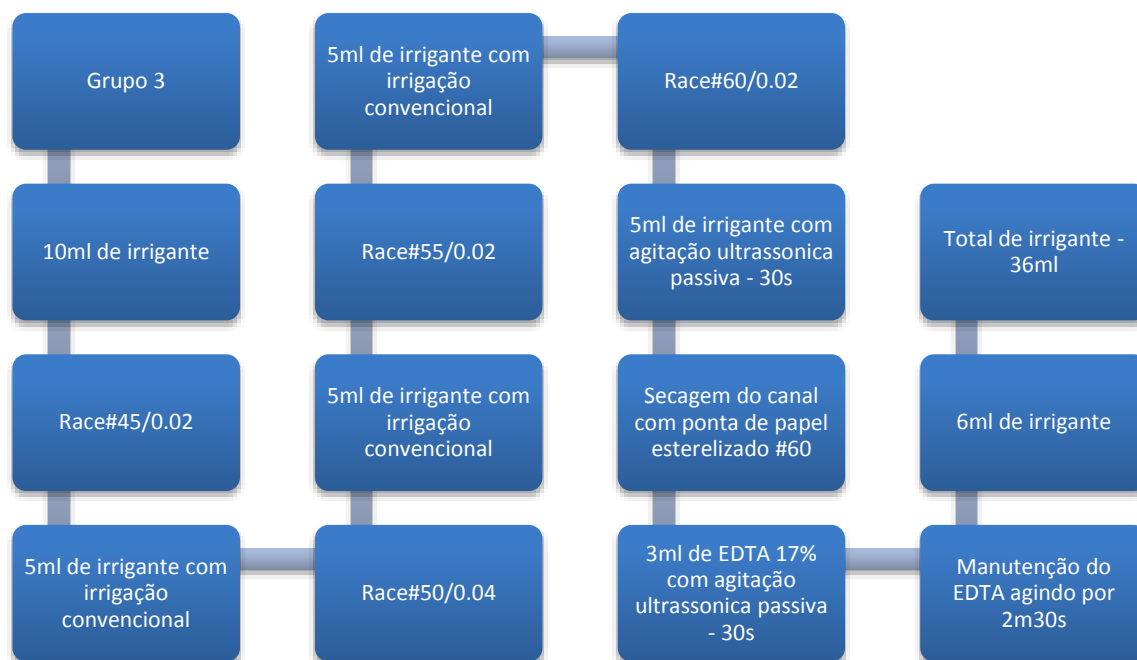


Figura 6 – Foto ilustrativa do ultrassom utilizado para acionar a ponta Irrisonic (PUI).



O grupo 4, controle positivo, foi utilizado para verificar a viabilidade bacteriana em todo o experimento e o controle negativo, grupo 5, o efeito da esterilização das amostras. Desta forma, durante um período de 60 dias de contaminação dos canais radiculares, três dentes não contaminados foram deixados incubados a 37°C, como um controle asséptico, e três dentes foram contaminados com *E. faecalis*, em condições atmosféricas similares às descritas anteriormente.

Após o preparo, todos os dentes foram submetidos à coleta microbiológica. Os canais radiculares foram secados e preenchidos com água destilada esterilizada e cada amostra foi coletada utilizando três pontas de papel absorvente as quais foram imersas em 7 mL de BHI, adicionado de neutralizantes [(Tween 80 e tiosulfato de sódio (P.A., Laboratório Art, Campinas, SP, Brasil)] em concentrações apropriadas, seguida pela incubação a 37°C por 48 horas. Decorridas 72 horas, nova coleta foi realizada de maneira idêntica à descrita previamente.

O crescimento bacteriano foi verificado pela análise visual da turbidez do meio de cultura e então analisada sob espectrofotometria UV em períodos de 20 minutos e 72 horas. Posterior à avaliação das mudanças do meio de cultura, um inóculo de 0,1 mL obtido do meio foi transferido para 7mL de BHI e subsequentemente incubado a 37°C por 48 horas. A coloração Gram da cultura BHI foi usada para verificação da contaminação por *E. faecalis*. Todas as coletas foram realizadas sob condições assépticas. As análises estatísticas dos dados foram feitas pela Análise de Variância (ANOVA), para avaliar diferenças significantes entre os grupos. O nível de significância foi 5%.

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A média e o desvio padrão da coleta inicial, coleta de 20 minutos e coleta de 72 horas foram obtidos. A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. A diferença entre os grupos foi avaliada pelo teste ANOVA para medidas repetidas, post hoc Bonferroni. Foram considerados significativos valores de $p < 0,05$. A análise estatística foi realizada utilizando o software Statistical Package for the Social Sciences, versão 20 (SPSS, Chicago, IL).

5. RESULTADOS

Os resultados estão descritos na tabela 2. A análise antibacteriana dos protocolos de irrigação (pressão positiva, pressão negativa, ultrassônica passiva), com hipoclorito de sódio 2,5% não demonstrou efetividade em dentina infectada por *Enterococcus Faecalis* em 60 dias.

Tabela 1 – Média e desvio padrão dos valores de análises das densidades ópticas associadas ao número de bactérias obtidos na coleta inicial, decorridos 20 min. e 72 h.

	Coleta inicial	Coleta imediata (20 min)	Coleta de 72 h	*
	$\bar{X} \pm S$	$\bar{X} \pm S$	$\bar{X} \pm S$	
1	0,277 ± 0,007 ^a	0,078 ± 0,134 ^b	0,018 ± 0,026 ^b	,000
2	0,291 ± 0,063 ^a	0,000 ± 0,000 ^b	0,127 ± 0,194 ^{ab}	,046
3	0,258 ± 0,076 ^a	0,000 ± 0,000 ^b	0,009 ± 0,009 ^b	,004

\bar{X} : média. S: desvio padrão. *ANOVA para medidas repetidas, *post hoc* Bonferroni. Letras iguais nas linhas indicam diferença não significativa ($p > 0,05$). Letras diferentes nas linhas indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

Tabela 2 – Eficácia antimicrobiana dos protocolos de irrigação em canais radiculares humanos infectados por *E. faecalis*.

Protocolo	20 min	Média/SD da densidade ótica do meio	72 h	Média/SD da densidade ótica do meio
G1	+ - -	0,078 ± 0,134 ^b	- - -	0,018 ± 0,026 ^b
G2	- - -	0,000 ± 0,000 ^b	+ - -	0,127 ± 0,194 ^{ab}
G3	- - -	0,000 ± 0,000 ^b	- - -	0,009 ± 0,009 ^b

6. DISCUSSÃO

Os protocolos de irrigação utilizados com hipoclorito de sódio 2,5% (pressão positiva, pressão negativa, ultrassônica passiva) em canais radiculares infectados com *Enterococcus faecalis* por 60 dias não eliminaram completamente as bactérias, contudo verificou-se redução em todos os grupos avaliados.

O *E. faecalis* apresenta capacidade de sobreviver e crescer nos túbulos dentinários e reinfetar canais radiculares obturados. A espécie tem a habilidade de invadir túbulos dentinários e aderir ao colágeno tipo 1 imobilizado na presença do *serum* humano. Love (2001) mostrou que a invasão dentinária pelo *E. faecalis* foi reduzida na presença do *serum*, mas não inibida, e a adesão ao colágeno foi reforçada. O fator de virulência da bactéria na falha do dente tratado endodonticamente pode estar relacionada à sua habilidade de manter a capacidade de invadir túbulos dentinários e aderir ao colágeno na presença de *serum* humano. O *E. faecalis* também tem a habilidade de se adaptar a mudanças ambientais do canal radicular após o tratamento endodôntico e permanecer como um patógeno no sistema de canais radiculares tornando a sua eliminação difícil, estando assim relacionado com as infecções secundárias, (Buck *et al.*, 2001; Portenier *et al.*, 2003; Sedgley *et al.*, 2005; Estrela *et al.*, 2007; Duggan, Sedgley, 2007; Estrela *et al.*, 2009), e por esses motivos é que a espécie foi selecionada como referência para o estudo.

Estrela *et al.*,(2009) realizaram estudo *in vitro* com a proposta de desenvolver um biofilme padrão viável para estudos em estratégias antimicrobianas. Foi obtido um modelo de biofilme na dentina radicular humana com 60 dias de desenvolvimento sob baixa oxigenação e ambiente rico em nutriente. Concluíram que tal modelo parece ser viável para os estudos que visam criar estratégias antimicrobianas, e permitir um satisfatório tempo de colonização de espécies microbianas selecionadas com propriedades de virulência e aderência.

No presente estudo dentes humanos extraídos foram utilizados para simular o ambiente clínico (Love 2001; Peters *et al.*, 2001; Vivacqua-Gomes *et al.*, 2005). A dentina foi o substrato primário utilizado para a adesão bacteriana, e sua interação com os irrigantes vem sendo mostrada (Buck *et al.*, 2001; Portenier *et al.*, 2003; Estrela *et al.*, 2007; Haapasalo *et al.*,2007; Estrela *et al.*, 2009). Durante o experimento, não houve a intenção de criar um sistema aberto ou fechado do forame

apical, pois não havia a intenção de avaliar a diferença de limpeza entre os terços. O principal objetivo foi avaliar a habilidade de eliminar o *E. faecalis* do canal radicular pelos três protocolos.

Dentre os protocolos de irrigação utilizados optou-se pela irrigação com pressão negativa, pressão positiva e irrigação ultrassônica passiva. O sistema com pressão positiva é o mais utilizado em função da sua simplicidade (Miller, Baumgartner; 2010), além de ser considerado o protocolo tradicional que leva o irrigante ao interior do canal por meio de seringas conectadas a agulhas de diferentes modelos. A ponta dessa agulha é colocada a 3 mm do comprimento de trabalho e o irrigante é liberado de acordo com a pressão exercida pelo operador no êmbolo da seringa, realizando movimentos curtos de vaivém respeitando o limite máximo de penetração da agulha em 13 mm (Hocket *et al.*, 2008; Desai, Himel, 2009; Brito *et al.*, 2009; Gondim Jr *et al.*, 2010; Miller, Baumgartner, 2010).

O protocolo de irrigação com pressão negativa utiliza um sistema de sucção de alta potência, o que permite irrigação com elevado volume de solução irrigante. Tem sido mostrado que este sistema introduz um fluxo de irrigante mais profundamente no canal radicular, o qual favorece melhor limpeza comparada ao protocolo de irrigação convencional (Nielsen, Baumgartner, 2007). Porém, observa-se que o protocolo de irrigação com pressão negativa (sistema Endovac) utilizado no presente estudo apresentou falha na adaptação da ponta master com a seringa usada para levar o irrigante ao interior do canal.

Pawar *et al.* (2012) desenvolveram um estudo clínico prospectivo, randomizado, controlado, para determinar se o uso da irrigação com EndoVac era mais eficiente comparada com a agulha padrão de irrigação na obtenção de canais a partir dos quais as bactérias não pudessem ser cultivadas. Os resultados mostraram que a eficácia antimicrobiana da irrigação com EndoVac foi comparável com a da irrigação padrão.

A irrigação ultrassônica pode ser um importante aliado para a remoção de debris de áreas em que o instrumento rotatório ou a irrigação ativa ou passiva não tenha tido acesso, sendo utilizada após a instrumentação e em casos de retratamento endodôntico. A solução é agitada por uma ponta ultrassônica acoplada ao Ultrassom (Goodman *et al.*, 1985; Gustarts *et al.*, 2005; Van Der Sluis *et al.*, 2007; Zuolo *et al.*, 2009). Para Van Der Sluis *et al.*, (2007), o termo “passiva” não é adequado para identificar o processo, uma vez que de fato ela é ativa. Na verdade,

este termo está relacionado a uma ação sem corte da lima ultrassônica ativada. Durante a PUI o instrumento não é movimentado, pois o mesmo é mantido livre sem se ajustar às paredes do canal radicular. Townsend e Maki (2009), em estudo *in vitro*, concluíram que a ativação ultrassônica foi significativamente mais eficaz na remoção de microorganismos no canal radicular quando comparada à irrigação com agulha e seringa e ao sistema EndoVac® (Discus Dental, Culver, CA, EUA).

A seleção racional dos irrigantes, o volume e o fluxo adequado ao longo das paredes do canal radicular é fundamental ao processo de sanificação (Siqueira *et al.*, 2002; Zehnder, 2006; Estrela *et al.*, 2007; Hsieh *et al.*, 2007; Tay *et al.*, 2010; Susin *et al.*, 2010; De Gregorio *et al.*, 2010; Case *et al.*, 2012; Estrela *et al.*, 2012). O volume do irrigante está diretamente relacionado à efetividade de desinfecção do canal radicular (Sedgley *et al.*, 2005; Susin *et al.*, 2010; Howard *et al.*, 2011), mas poucos estudos descreveram qual o volume que pode ser levado quando comparados pressão positiva e pressão negativa (Brunson *et al.*, 2010). No presente estudo, essa variável foi padronizada, sendo que o mesmo volume de irrigante foi utilizado para todos os grupos experimentais, de acordo com estudos prévios de Shin *et al.* (2010) e Mitchell *et al.* (2010).

O hipoclorito de sódio vem sendo usado há décadas e apresenta capacidade antibacteriana (Estrela *et al.*, 2002, 2003; Zehnder, 2006; Haapasalo *et al.*, 2010; Case *et al.*, 2012). Alguns cuidados devem ser tomados na seleção do hipoclorito de sódio. A solução foi preparada pouco tempo antes da sua utilização na concentração de 2,5%. Zou *et al.*, (2010) avaliaram o efeito da concentração, tempo de exposição e temperatura na penetração do hipoclorito de sódio nos túbulos dentinários. A menor penetração (77µm) foi medida após incubação com NaOCl 1% por 2 minutos à temperatura ambiente. A maior penetração (300µm) foi obtida com NaOCl 6% por 20 minutos à 45°C. Após a penetração inicial durante os primeiros 2 minutos, a profundidade de penetração dobrou durante os próximos 18 minutos de exposição. A temperatura teve um modesto efeito dentro de cada grupo na profundidade de penetração e, na maior parte dos casos, não foi estatisticamente significativa. A profundidade de penetração aumentou com o aumento da concentração do hipoclorito, mas as diferenças foram pequenas. Dentro do mesmo tempo em cada grupo, a profundidade de penetração com NaOCl 1% foi aproximadamente 50%-80% do valor da solução a 6%.

O mecanismo de ação antimicrobiana do hipoclorito de sódio foi previamente discutido por Estrela *et al.* (2002). Entre as reações químicas que se desenvolvem entre o tecido orgânico e o hipoclorito de sódio, verificam-se as reações de saponificação, de neutralização de aminoácidos e de cloraminação. O hipoclorito de sódio também expressa sua efetividade antimicrobiana a partir do elevado pH da solução (ação de íons hidroxila). O elevado pH do hipoclorito de sódio interfere na integridade da membrana citoplasmática, alterações biossintéticas no metabolismo celular e degradação fosfolipídica observada com a peroxidação lipídica. Observa-se que o hipoclorito de sódio atua como solvente de matéria orgânica e de gordura, transformando esses ácidos graxos (óleos e gorduras) em sais de ácidos graxos (sabão) e glicerol (álcool), o que reduz a tensão superficial da solução remanescente (explicada na reação de saponificação). O hipoclorito de sódio (hidróxido de sódio) neutraliza aminoácidos formando água e sal (interpretada na reação de neutralização de aminoácidos) e degrada ácidos graxos. Com a saída dos íons hidroxila ocorre a redução do pH da solução remanescente. O ácido hipocloroso, quando em contato com a matéria orgânica age como solvente, libera cloro nascente que em contato com proteínas do grupo amina, forma as cloraminas (reação de cloraminação). O ácido hipocloroso (HOCl-) e os íons hipoclorito (OCl-) tem a capacidade de hidrolisar e degradar aminoácidos. A reação de cloraminação entre o cloro e o grupamento amina (NH₂) dos aminoácidos, com a formação de cloraminas interfere no metabolismo celular. O cloro (oxidante forte) apresenta ação antimicrobiana através da inibição enzimática bacteriana, a partir da oxidação irreversível dos grupos SH (grupo sulfidríla) de enzimas bacterianas essenciais. Em síntese, o elevado pH do hipoclorito de sódio interfere na integridade da membrana citoplasmática, promove alterações biossintéticas com inibição enzimática irreversível (ação oxidante). Com a formação de cloraminas ocorre interferência no metabolismo celular, com oxidação irreversível do grupo sulfidríla (SH) de enzimas bacterianas (cisteína). A dissolução de tecidos orgânicos pode ser verificada na reação de saponificação quando o hipoclorito de sódio degrada ácidos graxos e lipídios, resultando em sabão e glicerol.

O EDTA foi utilizado ao final do processo de irrigação, pois auxilia na remoção da smear layer, o que potencializa o efeito antibacteriano do hipoclorito de sódio (Khademi *et al.*, 2006; Estrela *et al.*, 2007; De Gregorio *et al.*, 2010).

Dentre as limitações do presente estudo, o biofilme utilizado foi de monoespécie, sendo que a microbiota do canal radicular é polimicrobiana. Os dentes utilizados foram incisivos centrais superiores, cujos canais radiculares têm um expressivo diâmetro anatômico em comparação com outros grupos dentários. O maior desafio dos profissionais é levar o irrigante em todas as superfícies do canal radicular, em um volume apropriado e intervalo de tempo que neutralize bactérias e ajude os instrumentos a romper o biofilme, considerando a complexidade das morfologias em todos os grupos dentários.

O avanço da tecnologia resulta em diversas inovações que facilitam a limpeza do canal radicular e podem melhorar a taxa de sucesso do tratamento endodôntico. No entanto, a relação custo-benefício deve ser cuidadosamente analisada. Pesquisas adicionais devem ser realizadas para definir novas diretrizes para o tratamento das infecções endodônticas.

7. CONCLUSÃO

Baseado na metodologia utilizada e considerando as limitações do estudo pôde-se concluir que o emprego de irrigação em pressão positiva, pressão negativa e irrigação ultrassônica passiva, tendo como irrigante o hipoclorito de sódio a 2,5% não demonstrou total eliminação de bactéria posterior à coleta de 72 horas, porém houve diminuição na quantidade de bactérias em todos os protocolos de irrigação testados.

8. REFERENCIAS

1. BRITO, P.R. et al. Comparison of the effectiveness of three irrigation techniques in reducing intracanal *Enterococcus faecalis* populations: an in vitro study. **J. Endod.**, v.35, n.10, p.1422-7, oct. 2009.
2. BRUNSON, M. et al. Effect of apical preparation size and preparation taper on irrigant volume delivered by using negative pressure irrigation system. **J. Endod.**, v.36, n.4, p.721-4, apr. 2010.
3. BUCK, R.A. et al. Effectiveness of three endodontic irrigants at various tubular depths in human dentin. **J. Endod.**, v.27, n.3, p.206-8, mar. 2001.
4. CASE, P.D. et al. Treatment of root canal biofilms of *Enterococcus faecalis* with ozone gas and passive ultrasound activation. **J. Endod.**, v.38, n.4, p.523-6, apr. 2012.
5. De GREGORIO, C. et al. Efficacy of different irrigation and activation systems on the penetration of sodium hypochlorite into simulated lateral canals and up to working length: an in vitro study. **J. Endod.**, v.36, n.7, p.1216-21, jul. 2010.
6. DESAI, P.; HIMEL, V. Comparative safety of various intracanal irrigation systems. **J. Endod.**, v.35, n.4, p.545-9, apr.2009.
7. DUGGAN, J.M.; SEDGLEY, C.M. Biofilm formation of oral and endodontic *Enterococcus faecalis*. **J. Endod.**, v.33, n.7, p.815-8, jul. 2007.
8. ESTRELA, C. et al. Mechanism of action of sodium hypochlorite. **Braz. Dent. J.**, v.13, n.2, p. 113-7, 2002.
9. ESTRELA, C.R. et al. Control of microorganisms in vitro by endodontic irrigants. **Braz. Dent. J.**, v.14, n.3, p.187-92, 2003.
10. ESTRELA, C.; PECORA, J.D. Hipoclorito de Sódio. In: ESTRELA,C. et al. **Ciência Endodôntica**. v.1. São Paulo: Artes Médicas, 2004. cap.11, p.415-456.
11. ESTRELA, C. et al. Antimicrobial efficacy of ozonated water, gaseous ozone, sodium hypochlorite and chlorhexidine in infected human root canals. **Int. Endod. J.**, v.40, n. 2, p.85-93, feb. 2007.
12. ESTRELA, C. et al. Antibacterial efficacy of intracanal medicaments on bacterial biofilm: a critical review. **J. Appl. Oral Sci.**, v.17, n.1, p.1-7, feb. 2009.
13. ESTRELA, C. et al. A model system to study antimicrobial strategies in endodontic biofilms. **J. Appl. Oral Sci.**, v.17, n.2, p.87-91, mar-apr. 2009.
14. ESTRELA, C. et al. A preliminary study of the antibacterial potential of cetylpyridinium chloride in root canals infected by *E. faecalis*. **Braz. Dent. J.**, v.36, n.6, p.645-53, 2012.


15. ESTRELA, C. et al. Characterization of successful root canal treatment. **Braz. Dent. J.**, v.25, p.3-11, jan-feb. 2014.
16. GONDIM, E. Jr. et al. Postoperative pain after the application of two different irrigation devices in a prospective randomized clinical trial. **J. Endod.**, v.36, n. 8, p.1295-301, aug. 2010.
17. GOODMAN, A. et al. An in vitro comparison of the efficacy of the step-back technique versus a step-back ultrasonic technique in human mandibular molars. **J. Endod.**, v. 11, n.6, p.249-56, jun. 1985.
18. GUSTARTS, R. et al. In vivo debridement efficacy of ultrasonic irrigation following hand-rotary instrumentation in human mandibular molars. **J. Endod.**, v.31, n.3, p.166-70, mar. 2005.
19. HAAPASALO, M. et al. Effects of dentin on the antimicrobial properties of endodontic medicaments. **Endod. J.**, v.33, n.8, p.917-25, aug. 2007.
20. HAAPASALO, M. et al. Irrigation in endodontics. **Dent. Clin. North. Am.** v.54, n.2, p.291-312, apr. 2010.
21. HOCKETT, J.L. et al. Antimicrobial efficacy of two irrigation techniques in tapered and nontapered canal preparations: an in vitro study. **J. Endod.**, v.34, n.11, p.1374-7. Nov. 2008.
22. HOWARD, R.K. et al. Comparison of debris removal with three different irrigation techniques. **J. Endod.**, v.37, n.9, p.1301-5, sep. 2011.
23. HSIEH, Y.D. et al. Dynamic recording of irrigating fluid distribution in root canals using thermal image analysis. **Int. Endod. J.**, v.40, n.1, p.11-7, jan. 2007.
24. KHADEMI, A. et al. Determination of the minimum instrumentation size for penetration of irrigants to the apical third of root canal systems. **Endod. J.**, v.32, n.5, p.417-20, may 2006.
25. LOVE, R.M. *Enterococcus faecalis* – a mechanism for its role in endodontic failure. **Int. Endod. J.**, v.34, n.5, p.399-405, jul. 2001.
26. MILLER, T.A.; BAUMGARTNER, J.C. Comparison of the antimicrobial efficacy of irrigation using the EndoVac to endodontic needle delivery. **J. Endod.**, v.36, n.3, p.509-11, mar. 2010.
27. MITCHELL, R.P. et al. Comparison of apical extrusion of NaOCl using the EndoVac or needle irrigation of root canals. **J. Endod.**, v.6, n.2, p.338-41, feb. 2010.
28. NAIR, P.N. et al. Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after "one-visit" endodontic treatment. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 99, n.2, p.231-52, feb. 2005.
29. NIELSEN, B.A.; CRAIG BAUMGARTNER, J. Comparison of the EndoVac system to needle irrigation of root canals. **J. Endod.**, v.33, n.5, p.611-5, may 2007.

30. PAWAR, R. et al. Influence of an Apical Negative Pressure Irrigation System on Bacterial Elimination during Endodontic Therapy: A Prospective Randomized Clinical Study. **J. Endod.**, v.38, n.9, p.1177-81, sep. 2012.
31. PETERS, O.A. et al. Effects of four Ni-Ti preparation techniques on root canal geometry assessed by micro computed tomography. **Int. Endod. J.**, v.33, n.3, p.221-30, apr. 2001.
32. PINHEIRO, E.T. et al. Microorganisms from canals of root –filled teeth with periapical lesions. **Int. Endod. J.**, v.33, n.1, p.1-11, jan. 2003.
33. PORTENIER, I. Enterococcus faecalis– the root canal survivor and ‘star’ in post-treatment disease. **Endod. T.**, v.6, n.1, p.135-59, nov. 2003.
34. SEDGLEY, C.M. et al. Influence of irrigant needle depth in removing bioluminescent bacteria inoculated into instrumented root canals using real-time imaging in vitro. **Int. Endod. J.**, v.38, n.2, p.97-104, feb. 2005.
35. SEDGLEY, C.M. et al. Survival of Enterococcus faecalis in root canals ex vivo. **Int. Endod. J.**, v.38, n.10, p.735-42, oct. 2005.
36. SHIN, S-J. et al. Comparison of the cleaning efficacy of a new apical negative pressure irrigating system with conventional irrigation needles in the root canals. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v.109, n.3, p.479-84, mar. 2010.
37. SIQUEIRA, J.F. et al. Efficacy of instrumentation techniques and irrigation regimens in reducing the bacterial population within root canals. **J. Endod.**, v.28, n.3, p.181-84, mar. 2002.
38. SUSIN, L. et al. Canal and isthmus debridement efficacies of two irrigant agitation techniques in a closed system. **Int. Endod. J.**, v.43, n.12, p.1077-90, dec. 2010.
39. TAY, F.R. et al. Effect of Vapor Lock on Root Canal Debridement by Using a Side-vented Needle for Positive-pressure Irrigant Delivery. **J. Endod.**, v.36, n.4, p.745-50, apr. 2010.
40. TOWNSEND C., MAKI J. An in vitro comparison of new irrigation and agitation techniques to ultrasonic agitation in removing bacteria from a simulated root canal. **J. Endod.**, v. 35, p. 1040-1043, 2009.
41. VAN DER SLUIS, L.W. Passive ultrasonic irrigation of the root canal: a review of the literature. **Int. End. J.**, v.40, n.6, p.415-25, jun. 2007.
42. VIVACQUA-GOMES, N. et al. Recovery of *Enterococcus faecalis* after single-or multiple-visit root canal treatments carried out in infected teeth *ex vivo*. **Int. Endod. J.**, v.38, n.10, p.697-704, oct. 2005.
43. WILSON, M. et al. Susceptibility of oral bacterial biofilms to antimicrobial agents. **J. Med. Microbiol.**, v.44, n.2, p.79-87, feb.1996.

44. ZEHNDER, M. Root canal irrigants. **J. Endod.** v.32, n.5, p.389-98, may 2006.
45. ZOU, L. et al. Penetration of sodium hypochlorite into dentin. **J. Endod.**, v.36, n.5, p.793-6, may 2010.
46. ZUOLO, M.L. Retreatment efficacy of gutta-percha removal using a clinical microscope and ultrasonic instruments:part I-an ex vivo study. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v.108, n.1, p.59-62, jul. 2009.

ANEXO

ANEXO A – EXTRATO SAP

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS							
Sistema de Acompanhamento de Pesquisas							
EXTRATO DO PROJETO DE PESQUISA							
IDENTIFICAÇÃO DO PROJETO							
Carga Horária	Data de início	Data de Finalização	Número				
230	10/08/2013	10/08/2014	039848				
Palavra Chave 1	Palavra Chave 2	Palavra Chave 3					
ENTEROCOCCUS FAECALIS	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARR	IRRIGAÇÃO					
Unidade / Órgão	Situação						
FD - FACULDADE DE ODONTOLOGIA	Em Preenchimento						
Título							
EFEITO ANTIMICROBIANO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS DE AMÔNIO QUARTERNÁRIO UTILIZADOS EM PROTOCOLOS DE IRRIGAÇÃO DE CANAIS RADICULARES INFECTADOS POR E. FAECALIS							
COORDENAÇÃO							
Matrícula UFG	Nome do(s) Coordenador(s)						
238810	CARLOS ESTRELA						
Pesquisador CNPQ	Categoria Pesq. CNPQ	Unidade Coordenador(s)					
Não		FACULDADE DE ODONTOLOGIA					
Vínculos - COM VÍNCULO(S)							
Vinculado a um Programa de Pós-Graduação da UFG							
Nome: PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA							
Área de Concentração: CLÍNICA ODONTOLÓGICA							
Linhas de Pesquisa							
Vinculado a um Programa de Pós-Graduação de Outra Instituição							
Instituição:							
Nome do Programa:							
Vinculado a um Grupo de Pesquisa do CNPq							
Nome da instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS							
Nome do Grupo: BIOLOGIA ORAL							
ÁREAS DO CONHECIMENTO							
Princ.	Grande Área	Área					
	Sub-Área	Especialidade					
Sim	CIÊNCIAS DA SAÚDE	ODONTOLOGIA					
	ENDODONTIA	ENDODONTIA					
PARTICIPANTES - SERVIDORES							
Tipo	C.P.F.	Categoria	Nome				
	Lotação	Início	Fim				
COORDENADOR(A)	307.051.091-87	DOCENTE	CARLOS ESTRELA				
	FD	10/08/2013	10/08/2014				
PARTICIPANTE	348.047.811-53	DOCENTE	ANA HELENA CUNHALVES DE ALENCAR				
	UFG	10/08/2013	10/08/2014				
PARTICIPANTE	914.394.331-85	DOCENTE	DANIEL DE ALMEIDA DECURCIO				
	FD	10/08/2013	10/08/2014				
PARTICIPANTES - ESTUDANTES							
Tipo	Matric.	Ano	Nível	C.P.F.	Nome	Início	Final
			Instituição				
INI	20130801	8	SISTEMIO SENSU	80985512053	ALESSANDRO MOURIRA FREIRE	08/10/2014	
			FACULDADE DE ODONTOLOGIA				
INI	20130264	8	SISTEMIO SENSU	77048626191	DENISE RAMOS SILVEIRA ALVES		
			FACULDADE DE ODONTOLOGIA				
PARTICIPANTES - EXTERNOS							
CPF/Passap.	Grande Área	Titulação		Nome			
	Instituição	Início		Fim			
FINANCIADORES							
Nome / Razão Social	Valor	Situação	Tipo	Outro Financiamento	Edital		

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
Sistema de Acompanhamento de Pesquisas
EXTRATO DO PROJETO DE PESQUISA.



PRODUÇÃO

Descrição Produção Intelectual

Ano Base

Quantidade

Resumo do Projeto

O objetivo deste trabalho é comparar efeito antibacteriano do cloreto de benzalcônio 10% e do cloreto de cetilpiridínio 0,05% e 0,1% em diferentes protocolos de sanificação em canais radiculares infectados. Sesenta e quatro incisivos centrais superiores extraídos serão preparados e inoculados com *S. faecalis* por sessenta dias. Os dentes serão aleatoriamente divididos em 10 grupos de acordo com o protocolo testado, como segue: Grupo 1. Preparo automatizado do canal radicular (PACR) e irrigação com pressão positiva (IPP) com cloreto de cetilpiridínio 0,05%; Grupo 2. Preparo automatizado do canal radicular e irrigação com pressão positiva com cloreto de cetilpiridínio 0,1%; Grupo 3. Preparo automatizado do canal radicular e irrigação com pressão positiva com cloreto de benzalcônio 10%; Grupo 4. Preparo automatizado do canal radicular e irrigação com pressão positiva com hipoclorito de sódio 2,5%; Grupo 5. Preparo automatizado do canal radicular e irrigação com pressão negativa (IPN) com cloreto de cetilpiridínio 0,05%; Grupo 6. Preparo automatizado do canal radicular e irrigação com pressão negativa com cloreto de cetilpiridínio 0,1%; Grupo 7. Preparo automatizado do canal radicular e irrigação com pressão negativa com cloreto de benzalcônio 10%; Grupo 8. Preparo automatizado do canal radicular e irrigação com pressão negativa com hipoclorito de sódio 2,5%; Grupos 9 e 10. Controles negativo e positivo. Cinco dentes de cada grupo serão avaliados usando cultura. As amostras dos canais radiculares infectados serão coletadas e imersas em T m.L de Leifson Broth (LB) seguido por incubação a 37°C por um período de 48 horas. O crescimento bacteriano será analisado pela turbidez do meio de cultura seguido por espectrofotometria UV. Três dentes de cada grupo serão avaliados por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Análise de Variância será usada para análise estatística. O nível de significância será de 5%.

Data de Aprovação: ____/____/____

CARLOS ESTRELA
Coordenador(a)

Responsável pela Unidade/Orgão

ANEXO B – PUBLICAÇÃO

Artigo:

Potencial Antimicrobiano de Diferentes Protocolos de Irrigação em Canais Radiculares Infectados

Autores:

Alessandro Moreira FREIRE, DDS, MSc

Daniel de Almeida DECURCIO, DDS, MSc, PhD

Carlos ESTRELA, DDS, MSc, PhD

João Batista de SOUZA, DDS, MSc, PhD

Revista:

The Scientific World Journal

POTENTIAL ANTIMICROBIAL OF DIFFERENT IRRIGATION PROTOCOLS IN INFECTED ROOT CANALS

ALESSANDRO MOREIRA FREIRE, DDS, MSc

Graduate Student (Master's Degree), School of Dentistry, Federal University of Goiás, Goiânia, GO, Brazil;

DANIEL DE ALMEIDA DECURCIO, DDS, MSc, PhD

Professor of Endodontics, Department of Oral Science, Federal University of Goiás, Goiânia, GO, Brazil;

CARLOS ESTRELA, DDS, MSc, PhD

Chairman and Professor of Endodontics, School of Dentistry, Federal University of Goiás, Goiânia, GO, Brazil.

JOÃO BATISTA DE SOUZA, DDS, MSc, PhD

Professor of Dentistry, Department of Preventive and Restorative Dentistry, Federal University of Goiás, Goiânia, GO, Brazil;

Correspondence and offprint requests to:**Professor JOÃO BATISTA DE SOUZA**

Federal University of Goiás, Department of Preventive and Restorative Dentistry,

Praça Universitária s/n, Setor Universitário

CEP 74605-220, Goiânia, GO, Brazil.

E-mail address: jbs.ufg@gmail.com

ANEXO C – HINDAWI PUBLISHING CORPORATION - THE SCIENTIFIC WORLD JOURNAL

Author Guidelines

Submission

Manuscripts should be submitted by one of the authors of the manuscript through the online Manuscript Tracking System. Regardless of the source of the word-processing tool, only electronic PDF (.pdf) or Word (.doc, .docx, .rtf) files can be submitted through the MTS. There is no page limit. Only online submissions are accepted to facilitate rapid publication and minimize administrative costs. Submissions by anyone other than one of the authors will not be accepted. The submitting author takes responsibility for the paper during submission and peer review. If for some technical reason submission through the MTS is not possible, the author can contact tswj@hindawi.com for support.

Terms of Submission

Papers must be submitted on the understanding that they have not been published elsewhere and are not currently under consideration by another journal published by Hindawi or any other publisher. The submitting author is responsible for ensuring that the article's publication has been approved by all the other coauthors. It is also the authors' responsibility to ensure that the articles emanating from a particular institution are submitted with the approval of the necessary institution. Only an acknowledgment from the editorial office officially establishes the date of receipt. Further correspondence and proofs will be sent to the author(s) before publication unless otherwise indicated. It is a condition of submission of a paper that the authors permit editing of the paper for readability. All enquiries concerning the publication of accepted papers should be addressed to tswj@hindawi.com.

Peer Review

All manuscripts are subject to peer review and are expected to meet standards of academic excellence. Submissions will be considered by an editor and "if not rejected right away" by peer-reviewers, whose identities will remain anonymous to the authors.

Microarray Data Submission

For any article that includes microarray data, this data should be deposited in an appropriate database such as Gene Expression Omnibus (GEO) or Array Express, and an entry name or accession number must be included in the manuscript prior to its publication. Microarray data should be MIAME compliant. During the reviewing process, submitting authors are committed to provide the editor and the reviewers handling his/her manuscript with the login information by which they can access this information in the database.

Concurrent Submissions

In order to ensure sufficient diversity within the authorship of the journal, authors will be limited to having two manuscripts under review at any point in time. If an author already has two manuscripts under review in the journal, he or she will need to wait until the review process of at least one of these manuscripts is complete before submitting another manuscript for consideration. This policy does not apply to Editorials or other non-peer reviewed manuscript types.

Article Processing Charges

The Scientific World Journal is an open access journal. Open access charges allow publishers to make the published material available for free to all interested online visitors. For more details about the article processing charges of The Scientific World Journal , please visit the Article Processing Charges information page.

Units of Measurement

Units of measurement should be presented simply and concisely using System International (SI) units.

Title and Authorship Information

The following information should be included

Paper title

Full author names

Full institutional mailing addresses

Email addresses

Abstract

The manuscript should contain an abstract. The abstract should be self-contained and citation-free and should not exceed 200 words.

Introduction

This section should be succinct, with no subheadings.

Materials and Methods

This part should contain sufficient detail so that all procedures can be repeated. It can be divided into subsections if several methods are described.

Results and Discussion

This section may each be divided by subheadings or may be combined.

Conclusions

This should clearly explain the main conclusions of the work highlighting its importance and relevance.

Acknowledgments

All acknowledgments (if any) should be included at the very end of the paper before the references and may include supporting grants, presentations, and so forth.

References

Authors are responsible for ensuring that the information in each reference is complete and accurate. All references must be numbered consecutively and citations of references in text should be identified using numbers in square brackets (e.g., “as discussed by Smith [9]”; “as discussed elsewhere [9, 10]”). All references should be cited within the text; otherwise, these references will be automatically removed.

Preparation of Figures

Upon submission of an article, authors are supposed to include all figures and tables in the PDF file of the manuscript. Figures and tables should not be submitted in separate files. If the article is accepted, authors will be asked to provide the source files of the figures. Each figure should be supplied in a separate electronic file. All figures should be cited in the paper in a consecutive order. Figures should be supplied in either vector art formats (Illustrator, EPS, WMF, FreeHand, CorelDraw,

PowerPoint, Excel, etc.) or bitmap formats (Photoshop, TIFF, GIF, JPEG, etc.). Bitmap images should be of 300 dpi resolution at least unless the resolution is intentionally set to a lower level for scientific reasons. If a bitmap image has labels, the image and labels should be embedded in separate layers.

Preparation of Tables

Tables should be cited consecutively in the text. Every table must have a descriptive title and if numerical measurements are given, the units should be included in the column heading. Vertical rules should not be used.

Proofs

Corrected proofs must be returned to the publisher within 2-3 days of receipt. The publisher will do everything possible to ensure prompt publication. It will therefore be appreciated if the manuscripts and figures conform from the outset to the style of the journal.

Copyright

Open Access authors retain the copyrights of their papers, and all open access articles are distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium, provided that the original work is properly cited.

The use of general descriptive names, trade names, trademarks, and so forth in this publication, even if not specifically identified, does not imply that these names are not protected by the relevant laws and regulations.

While the advice and information in this journal are believed to be true and accurate on the date of its going to press, neither the authors, the editors, nor the publisher can accept any legal responsibility for any errors or omissions that may be made. The publisher makes no warranty, express or implied, with respect to the material contained herein.

Disclosure Policy

A competing interest exists when professional judgment concerning the validity of research is influenced by a secondary interest, such as financial gain. We require that our authors reveal any possible conflict of interests in their submitted manuscripts.

If there is no conflict of interests, authors should state that “The author(s) declare(s) that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.”

Clinical Study

When publishing clinical studies, Hindawi aims to comply with the recommendations of the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) on trials registration. Therefore, authors are requested to register the clinical trial presented in the manuscript in a public trials registry and include the trial registration number at the end of the abstract. Trials initiated after July 1, 2005 must be registered prospectively before patient recruitment has begun. For trials initiated before July 1, 2005, the trial must be registered before submission.

ANEXO D – POTENTIAL ANTIMICROBIAL OF DIFFERENT IRRIGATION PROTOCOLS IN INFECTED ROOT CANALS.

1 INTRODUCTION

Successful treatment of endodontic infections depends on several procedures including sanitization and shaping of root canals (Nair et al., 2005; Estrela et al 2014). The environment favors the colonization of the root canal and therefore the formation of a dense biofilm resistant to antimicrobials and often inaccessible to endodontic instruments and irrigating (Wilson, 1996; Zehnder 2006; Estrela et al, 2009). The anatomical complexity of the root canal is a major challenge for the instrumentation, the disinfection process and elimination of bacterial biofilms. Structured biofilm bacterial is less susceptible to antimicrobial agents than their planktonic form, so the choice of an effective irrigating solution is basic (Wilson, 1996).

Root canal treatment, especially of infected channels, you need a irrigating solution put forward a number of properties that assist the professional in preparing and disinfecting root canals, such as: facilitating the action of the endodontic instrument; changing the pH of the medium; control a possible infection in case of pulpectomy; neutralize this content in endodontic infections; remove organic matter (pulp residues) and inorganic (debris, dentinal shavings) of the pulp cavity, allowing a direct and intense action of the antimicrobial agent with the endodontic microbiota present biological compatibility with the periapical tissues (Estrela et al., 2004).

Sodium hypochlorite belongs to the group of halogenated compounds, and their use in dentistry began in 1792, when it was first produced and received the Javele Water name (Estrela et al., 2004). The solution is used as irrigating in endodontics from 1920 to present fundamental properties as a broad spectrum of action, antimicrobial effect (against spores and viruses) and dissolution of vital organic matter or necrotic (Zehnder, 2006). However its interaction with dentin can lead to loss in type I collagen immunoreactivity leading to compromises of its structure (Haapasalo et al., 2007).

The mechanism of action of sodium hypochlorite causes biosynthetic alterations in cellular metabolism and phospholipid destruction, chloramines formation that interfere with cellular metabolism, oxidative action with inactivation

irreversible enzyme in bacteria and acid degradation of lipids and fats (Estrela et al. 2002). But the effectiveness of irrigating fundamentally depends on direct contact with the microorganisms, the irrigator volume, the time of action and the irrigation protocol (Estrela et al. 2003; Zhender, 2006; Haapasalo et al., 2010).

The irrigation of the root canal must maintain a balance between effectiveness and safety. The traditional protocol is carried out taking the irrigating the interior channel through the syringe needle connected to different models. The tip of this needle is placed to 2 or 3 mm of working length and irrigant is released according to the pressure exerted by the operator on the plunger of the syringe. However, if the needle is placed in the apical portion locked or if the pressure on the syringe is not carefully controlled, the chance of extrusion of the solution increases, which may result in a serious accident (Hockett et al., 2008).

Recently, the use of negative pressure irrigation protocols have been reported to show results superior to the positive pressure. These systems are presented as a safe and effective way of irrigation, reaching best microbial control when compared to traditional (Haapasalo et al, 2010;. Hockett et al, 2008;. Nielsen & Baumgartner, 2007).

The EndoVac (Discus Dental, Culver City, CA) is marketed as a negative pressure irrigation system that combines a master irrigator tip that leads the access cavity while a macro and a microcannula take the same solution into the root canal and draw through the suction hose. The system is connected to a high-power suction pump, which allows the flow of fluid under negative pressure. There is evidence that, compared to traditional irrigation system with a needle, the EndoVac is considerably less related to extravasation solution periapical region and further, the reverse flow of irrigant promotes better cleaning of the apical portion of the root canal length work and a low level of post-operative pain (Gondim et al, 2010;. Haapasalo et al., 2010).

Due to a complex internal anatomy, even with the use of rotary instruments with various flexibilities and tapers and with the use of various irrigation agents, studies also show that there are several surfaces and uneven areas in the root canal system that still without cleaning, and therefore rely on the presence of debris and bacteria (Peters et al., 2001). Several in vivo and in vitro studies have shown then, ultrasonic irrigation as an important adjunct to remove areas of debris that the rotating device or passive irrigation has not reached (Goodman et al, 1985;. Gustarts et al., 2005; Van Der Sluis et al., 2007).

Despite the promising results of the negative pressure in the sanitization of the root canal presented to date, few studies have been developed in relation to the action of EndoVac system on the biofilm. The high failure rate in cases of endodontic treatment of infected teeth, around 40% (Pineiro et al., 2003), encourages us in the pursuit of sanitation strategies of root canals as effective as safe for the tissues surrounding the channel root.

Therefore the aim of this study was to compare the antibacterial effect of irrigation protocols (positive pressure, negative and passive ultrasonic), using sodium hypochlorite 2.5% associated with root canal preparation with nickel-titanium instruments.

2 OBJECTIVES

2.1 General Objectives

Compare the antibacterial effect of irrigation protocols (positive pressure, negative and passive ultrasonic), utilizing sodium hypochlorite 2.5% associated with root canal preparation with nickel-titanium instruments.

2.2 Specific Objectives

- 1) Observe the use of negative irrigation protocol with sodium hypochlorite at 2.5% can lead to a bacterial reduction.
- 2) Make sure the passive ultrasonic irrigation has effectiveness in bacterial reduction in analysis by optical density in spectrophotometry.

3 METHODOLOGY

The study started after approval by the Ethics Committee of the Federal University of Goiás (CAAE No 19811113.0.0000.5083).

Preparation of teeth

Fifteen previous single-rooted extracted human teeth and transferred by patients, upper then 18 years, attended the School of Dentistry, Federal University of

Goiás and extraction indication for periodontal reason or prosthetic were selected for the study. Teeth were excluded obliteration of the root canal and disruption of the root. The teeth were packed in flasks containing thymol solution 0.2%. After removal of this medium, were immersed in 5% sodium hypochlorite (Fitofarma, Lt. 20442, Goiânia, GO, Brazil) for 30 minutes to remove organic tissues. Periapical radiographs of the teeth were made in buccolingual directions and near-proximal, using radiographic film (Eastman Kodak Comp., USA) to confirm the presence of a single channel and no anatomical variations.

Standard access cavities and the patency of the canal were prepared was achieved with K file-flex # 15 (Maillefer, Ballaigues, Switzerland), confirmed by direct visualization of the file tip at the apical foramen. The anatomical diameter of the channels was standardized from the initial preparation with K files-flex # 15 and # 20 (Maillefer, Ballaigues, Switzerland). The preparation of the cervical and middle thirds was performed with instruments # 25.10 / 25.08 # / # 25.06 and # 25.04. The apical third was instrumented with BioRace instruments owing # 35.04 and # 40.04 each being used in just five root canals. Root canals were irrigated with 3 mL of 2.5% NaOCl every file exchange.

After the root canal preparation under continuous jet of air / water, the crowns were removed with laminated drill Endo-Z (Maillefer, Ballaigues, Switzerland) at high speed at an angle of 90° with the long axis of the tooth, and standardized root lengths 16 mm. The canals were dried with absorbent paper points and filled with 17% EDTA (pH 7.2 – Fórmula e Ação, São Paulo, SP, Brazil) for 3 minutes to remove the smear layer. The teeth were autoclaved for 30 minutes at 120° C.

Design

Teeth were mounted on an experimental platform to allow inoculation of the biological marker. The coronal portion of the root canal of each tooth was connected to a 1.5 mL Eppendorf tube of polypropylene (Cral, São Paulo, SP, Brazil) had the background removed for adjustment of the cervical portion of the root (illustration A of Figure 1). Cyanoacrylate adhesive (Super Bonder, Itapevi, SP, Brazil) was used to prevent infiltration of the connection, which was still entirely covered with two layers of nail polish (Max Factor Cosmetics and Fragrances, London, UK). The specimens (teeth engaged with polypropylene tubes) were sterilized in 5% sodium hypochlorite for 30 minutes. Subsequently, each tooth was attached to a 20 mL flask containing

10 ml of culture medium (BHI) so that the apical portion of the root remain submerged throughout the feeding period (illustrated in figure 1 C). To ensure the sterilization, the test apparatus was incubated for 24 hours at 37°C. After this period, no bacterial growth was observed.

Biological indicator

A reference strains of *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) obtained from American Type Culture Collection was used. The bacterial strain was inoculated into 7 ml of brain heart infusion (BHI; Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) and incubated for 24 hours at 37°C. Twenty-four hours before inoculation of the teeth, the bacteria were again grown on the surface of brain heart infusion agar (BHI; Difco Laboratories) following the same incubation conditions. The bacterial inoculum was obtained by resuspending the cells in saline in a final concentration of approximately $3 \times 10^8 \text{ ml}^{-1}$ cells adjusted to 1 McFarland turbidity standard.

For contamination of the samples 5 ml of sterile BHI broth were mixed with 5 ml of the bacterial suspension and experimental group and positive control were inoculated with *E. faecalis* for 60 days using sterile syringes with a sufficient volume to fill the root canal. This procedure was repeated every 72 hours, always using pure culture with 24 hours of preparation and set the standard 1 McFarland. The teeth were kept in a microbiological incubator at 37°C.

After the period of formation of the biofilm, the canals were dried and filled with distilled water. Sterile paper points n.40 (Tanari, Tanariman Industry Ltda., Manacaru, AM, Brazil) were introduced into the root canal and maintained for 3 minutes to sample collection. Each sample was collected using three paper points. The tips were individually immersed in 7 ml of BHI with added neutralizing [(Tween 80 and sodium thiosulfate (PA Art Laboratory, Campinas, Brazil)] at appropriate concentrations followed by incubation at 37°C for 48 hours. After the finding of bacterial growth, the experimental groups were prepared.

Initially, the roots were removed from the platforms, had their foramina sealed with acrylic resin and then were randomly divided into three experimental groups and two control groups, each group with three roots prepared ($n = 3$), according to the technique of irrigation tested as follows:

Group 1: Automated Root canal preparation (RCAP) + Irrigation with negative pressure (IPN) + Sodium hypochlorite 2.5%;

Group 2: RCAP + Irrigation positive pressure (IPP) + Sodium hypochlorite 2.5%;

Group 3: RCAP + passive ultrasonic irrigation (PUI) + Sodium hypochlorite 2.5%;

Group 4: negative control;

Group 5: Positive Control.

The experimental groups were prepared with RaCe system (FKG Dentaire, Swiss Dental Products, La Chaux-de-Fonds, Swiss) following # 45.02, 50.04 #, # 55.02 and # 60.02 each being used in only five channels.

In group 1 the system EndoVac (Discus Dental Culier City, CA, USA) was used according to manufacturer's recommendations. The irrigation was performed during the preparation with the master device coupled to the tip of the syringe connected to a vacuum suction system. An initial irrigation with 10 ml of the tested solution was done with the master positioned at the entrance end of the root canal before and after instrumentation with Race # 45.02. After instrumentation with Race # 50.02 and # 55.02, irrigation was performed using the macrocânula. The macrocânula with ISO caliber n. 55 and taper 02 is coupled to the handpiece and positioned titanium 10.5mm in length during 30 seconds with continuous irrigation system promoted by irrigation syringe. After instrumentation with Race # 60.02, irrigation was performed using the microcannula with diâmetro 0.32 mm coupled to a digital piece of titanium placed in the working length and held in position 6 seconds, and held in the retracted position 2mm for over 6 seconds plus 6 seconds working length. The time described in all stages of irrigation is indicated by the manufacturer, and after the completion of each phase is marked and annotated the volume of irrigant used. The EndoVac system is illustrated in Figure 3. After preparation, the root canal was dried with paper tip n. 60 and microcannula sterile cycle was carried out with 17% EDTA which was maintained on the channel for a period of 3 minutes. Followed by a final cycle was performed with the test solution.

After preparing the first sample was found that a total of 36 mL of 2.5% sodium hypochlorite was used and this volume was maintained for all subsequent protocols, as shown in Figure 4.

In group 2 the conventional irrigation was performed with 5 ml syringe Ultradent and Navitips irrigation cannula (Ultradent Products Inc. 505 West 10200, South, South Jordan, UT 84095) with a diameter of 0.30 mm set to 12mm. After

preparation, the root canal was blotted dry sterile tip 60 and irrigated with 3 ml of 17% EDTA kept under stirring with a lentulo instrument (Maillefer, Ballaigues, Switzerland) driven at low speed motor for 1 minute, and maintained at rest for 2 minutes completing a total of 3 minutes. After this period, the canal was irrigated with the test solution.

In group 3 the root canals were prepared in the same manner as conventional irrigation group. However, later in irrigation the last instrument, the solution was stirred by the ultrasonic tip E1-Irrisonic (Helse Dental Technology, Saint Rose of Viterbo-SP, Brazil), coupled to the Ultrasound EMS Piezon Master 200 (EMS, Sao Bernardo do Campo- SP, Brazil), adjusted to 20% power. The ultrasonic tip was positioned in the length of work and on for 30 seconds with care not to touch the walls of the root canal. The channels were dried with absorbent paper points and irrigated with 3 ml 17% EDTA which was stirred for 30 seconds with ultrasonic tip and kept at rest 2 minutes and 30 seconds, with a total time of 3 minutes after which the channel was again flooded with the sodium hypochlorite solution at 2.5%.

Group 4, a positive control, was used to assess bacterial viability throughout the experiment and the negative control, Group 5, the effect of sterilization of the samples. Thus, during a period of 60 days of infection the root canal three teeth were left uncontaminated incubated at 37°C as an aseptic control, and three teeth were infected with *E. faecalis* in similar conditions to those described above atmospheric.

After preparation, all teeth were subjected to microbiological sampling. The root canals were dried and filled with sterile distilled water and each sample was collected using three absorbent paper points which were immersed in 7 ml of BHI added neutralizing [(Tween 80 and sodium thiosulfate (PA Art Laboratory, Campinas, Brazil)] at appropriate concentrations followed by incubation at 37°C for 48 hours. After 72 hours a second test was performed in the same manner as described previously.

Bacterial growth was checked by visual examination of turbidity of the culture medium and then examined under UV spectrophotometry at times of 20 minutes and 72 hours. Subsequent evaluation of changes of the culture medium, an inoculum of 0.1 ml of the medium obtained was transferred to 7 ml of BHI and subsequently incubated for 48 hours at 37°C. The Gram stain of BHI culture was used to check contamination by *E. faecalis*. All samples were performed under aseptic conditions.

Statistical analyzes of the data were made by analysis of variance (ANOVA) to evaluate significant differences between groups. The significance level was 5%.

4 STATISTICAL ANALYSIS

The mean and standard deviation of the initial collection, 20 minutes collecting and gathering 72 hours were obtained. Data normality was assessed using the Kolmogorov-Smirnov test. The difference between groups was evaluated by ANOVA for repeated measures, post hoc Bonferroni. The significance level was $p < 0.05$. Statistical analysis was performed using the Statistical Package for Social Sciences software, version 20 (SPSS, Chicago, IL).

5 RESULTS

The results are shown in Table 2. The analysis of antibacterial irrigation protocols (positive pressure, negative pressure, ultrasonic passive) with 2.5% sodium hypochlorite has not been effective in infected dentin *Enterococcus faecalis* for 60 days.

Table 1 - Mean and standard deviation of the analytical values of the optical densities associated with the number of bacteria obtained in the initial collection, after 20 min. and 72 hr.

	Initial colect	Immediate colect (20 min)	Colect of 72 h	*
	$\bar{X} \pm S$	$\bar{X} \pm S$	$\bar{X} \pm S$	
1	0,277 ± 0,007 ^a	0,078 ± 0,134 ^b	0,018 ± 0,026 ^b	,000
2	0,291 ± 0,063 ^a	0,000 ± 0,000 ^b	0,127 ± 0,194 ^{ab}	,046
3	0,258 ± 0,076 ^a	0,000 ± 0,000 ^b	0,009 ± 0,009 ^b	,004

\bar{X} : average. S: standard deviation. * Repeated measures ANOVA, post hoc Bonferroni. Same letters in lines indicate no significant difference ($p > 0.05$). Different letters on the lines indicate significant difference ($p < 0.05$).

Table 2 - Antimicrobial efficacy of irrigation protocols in human root canals infected with *E. faecalis*.

Protocol	20 min	Medium / SD optical density of the environment	72 h	Medium / SD optical density of the environment
G1	+ - -	0,078 ± 0,134 ^b	- - -	0,018 ± 0,026 ^b
G2	- - -	0,000 ± 0,000 ^b	+ - -	0,127 ± 0,194 ^{ab}
G3	- - -	0,000 ± 0,000 ^b	- - -	0,009 ± 0,009 ^b

6 DISCUSSION

Irrigation protocols used with sodium hypochlorite 2.5% (positive pressure, negative pressure, passive ultrasonic) in root canals infected with *Enterococcus faecalis* for 60 days not completely eliminated the bacteria, however there was a reduction in all groups evaluated.

The *E. faecalis* has the capacity to survive and grow in the dentinal tubules and reinfect filled root canals. The species has the ability to invade dentinal tubules and adhere to collagen type 1 immobilized in the presence of human serum. Love (2001) demonstrated that invasion by *E. faecalis* dentin was reduced in the presence of serum, but not inhibited, and adhesion to collagen was enhanced. The bacterial virulence factor in tooth treated endodontically failure may be related to its ability to maintain the ability to invade dentinal tubules and adhere to collagen in the presence of human serum. The *E. faecalis* also has the ability to adapt to environmental changes of root canal after endodontic treatment and remain as a pathogen in the root canal system making it difficult to eliminate and are thus associated with secondary infections, (Buck et al. 2001; Portenier et al. 2003; Sedgley et al, 2005;. Estrela et al, 2007;. Duggan, Sedgley, 2007;. Estrela et al, 2009), and for these reasons is that the species was selected as reference for the study.

Estrela et al. (2009) conducted a study in vitro with the proposal to develop a standard biofilm viable for studies on antimicrobial strategies. A biofilm model was obtained in human root dentin 60 days development under low oxygen and nutrient rich environment. They concluded that this model appears to be feasible for studies aimed at creating antimicrobial strategies, and satisfactory time of colonization of microbial species selected with virulence properties and adhesion.

In the present study extracted human teeth were used to simulate the clinical setting (Love 2001; Peters et al., 2001; Vivacqua-Gomez et al., 2005). The dentin was the primary substrate used for bacterial adhesion, and its interaction with the irrigation has been shown (Buck et al., 2001; Portenier et al. 2003; Estrela et al, 2007;. Haapasalo et al., 2007; Estrela et al., 2009). During the experiment, there was no intention to create an open or closed the apical foramen system because there was no intention to evaluate the difference in cleaning between thirds. The main objective was to evaluate the ability of eliminating *E. faecalis* root canal by three protocols.

Among the irrigation protocols used opted up by irrigation with negative pressure, positive pressure and passive ultrasonic irrigation. The positive pressure system is used as a function of its simplicity (Miller, Baumgartner, 2010), besides being the traditional protocol leading to the interior of the irrigating channel through syringe needles connected to different models. The tip of this needle is placed 3 mm working length and the irrigator is released according to the pressure exerted by the operator on the syringe plunger, performing short shuttle movements respecting the maximum penetration of the needle 13 mm (Hockett et al, 2008;. Desai, Himel, 2009; Brito et al, 2009;. Gondim Jr. et al, 2010;. Miller, Baumgartner, 2010).

Irrigation protocol uses negative pressure to a high powered suction system, which enables irrigation with a high volume of solution irrigator. It has been shown that this system introduces a further flow of irrigant from the root canal, which favors better cleaning compared to conventional irrigation protocol (Nielsen, Baumgartner, 2007). However, it is observed that the irrigation protocol with negative pressure (Endovac system) used in this study had failed master adaptation of the syringe tip used to bring the inside of the channel irrigant.

Pawar et al. (2012) developed a clinical prospective, randomized, controlled, to determine whether the use of irrigation with EndoVac was more efficient compared to the standard needle in getting irrigation channels from which the bacteria could not be grown. The results showed that the antimicrobial efficacy of irrigation EndoVac was comparable with standard irrigation.

Ultrasonic irrigation can be an important ally for removing areas of debris in the rotating device or the active or passive irrigation has not had access, and is used after the instrumentation and in cases of endodontic retreatment. The solution is

stirred by an ultrasonic tip attached to the ultrasound (Goodman et al, 1985;. Gustarts et al, 2005;. Van Der Sluis et al, 2007;. Zuolo et al., 2009).

The rational selection of irrigators, the appropriate volume and flow along the walls of the root canal is critical to the sanitization process (Siqueira et al, 2002;. Zehnder, 2006; Estrela et al, 2007;.. Hsieh et al, 2007 ; Tay et al, 2010;. Susin et al, 2010;. De Gregorio et al, 2010;. Case et al, 2012;. Estrela et al, 2012). The irrigator volume is directly related to the effectiveness of disinfection of the root canal (Baker et al, 1975;. Sedgley et al, 2005;. Susin et al, 2010;.. Howard et al, 2011), but few studies have described which volume that can be taken compared positive pressure and negative pressure (Brunson et al., 2010). In the present study, this variable is standardized, and the same volume of irrigant was used for all experimental groups, according to previous studies Shin et al. (2010) and Mitchell et al. (2010).

Sodium hypochlorite has been used for decades and has antibacterial capacity (Estrela et al, 2002, 2003;. Zehnder 2006; Haapasalo et al, 2010;. Case et al, 2012.). Care should be taken in the sodium hypochlorite selection. The solution was prepared shortly before use at a concentration of 2.5%. Zou et al., (2010) evaluated the effect of the concentration, exposure time and temperature on the penetration of sodium hypochlorite in the dentinal tubules. The lower penetration (77 μ m) was measured after incubation with 1% NaOCl for 2 minutes at room temperature. The greatest penetration (300 μ m) was obtained with 6% NaOCl for 20 minutes at 45°C. After initial penetration during the first 2 minutes, the depth of penetration has doubled over the next 18 minutes of exposure. The temperature had a modest effect within each group the penetration depth, and in most cases it was not statistically significant. The depth of penetration increased with increasing concentration of the hypochlorite, but the differences were small. Within the same time within each group, the penetration depth with 1% NaOCl was approximately 50%-80% of 6% solution.

The antimicrobial mechanism of action of sodium hypochlorite previously discussed by Estrela et al. (2002). Among the chemical reactions that develop between the organic material and sodium hypochlorite, there is the saponification reaction, neutralization of amino acids and chloramination. Sodium hypochlorite also expressed its antimicrobial effectiveness from high pH of the solution (action of hydroxyl ions). The high pH of the sodium hypochlorite interfere with the integrity of the plasma membrane, changes in cellular metabolism, biosynthesis and

phospholipid degradation observed with lipid peroxidation. The sodium hypochlorite is observed acts as a solvent of organic matter and fat, transforming these fatty acids (fats and oils) fatty acid salts (soap) and glycerol (alcohol), which reduces the surface tension of the remaining solution (explained in the saponification reaction). Sodium hypochlorite (sodium hydroxide) amino acid neutralized to form water and salt (played in the amino acid neutralization reaction), and degrade fatty acids. With the removal of hydroxyl ions occurs reducing the pH of the remaining solution. The hypochlorous acid when in contact with organic matter acts as solvent releases nascent chlorine contact amine group of proteins, form chloramines (chloramination reaction). Hypochlorous acid (HOCl-) and hypochlorite ions (OCl-) has the ability to hydrolyze and degrade amino acids. Chloramination The reaction between chlorine and grouping amine (NH₂) of amino acids, with the formation of chloramines interfere with cell metabolism. Chlorine (strong oxidant) has antimicrobial action through the bacterial enzyme inhibition from the irreversible oxidation of SH groups (sulfhydryl group) of essential bacterial enzymes. In summary, the high pH of sodium hypochlorite interferes with the integrity of the cytoplasmic membrane, promotes biosynthetic changes with irreversible enzyme inhibition (oxidant action). With the formation of chloramines interference occurs in cellular metabolism, irreversible oxidation of the sulfhydryl group (SH) of bacterial enzymes (cysteine). The dissolution of organic tissue can be observed in the saponification reaction when sodium hypochlorite degrades fatty acids and lipids, resulting in soap and glycerol.

EDTA was used at the end of the irrigation process, it assists in removing the smear layer, which enhances the antibacterial effect of sodium hypochlorite (Khademi et al., 2006; Estrela et al, 2007;.. De Gregorio et al 2010).

Among the limitations of this study, the biofilm was of monoespecie, and the microbiota of the root canal is polymicrobial. The teeth were used maxillary central incisors, whose root canals have a significant anatomical diameter compared to other dental groups. The biggest challenge for professionals is to take the irrigator on all surfaces of the root canal, in an appropriate volume and time interval that neutralizes bacteria and help tools to break the biofilm, considering the complexity of morphologies in all dental groups.

The advancement of technology results in several innovations that facilitate the cleaning of the root canal and can improve the success rate of endodontic treatment. However, the cost-benefit ratio should be carefully analyzed. Additional

research is needed to define new guidelines for the treatment of endodontic infections.

7 CONCLUSION

Based on the methodology used and considering the limitations of the study it was concluded that the use of irrigation in positive pressure, negative pressure and passive ultrasonic irrigation, with the irrigating sodium hypochlorite 2.5% did not show complete elimination of the bacteria later collection 72 hours, there was a decrease in the number of bacteria in all tested irrigation protocols.

REFERENCES

1. NAIR, P.N. et al. Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after "one-visit" endodontic treatment. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 99, n.2, p.231-52, feb. 2005.
2. ESTRELA, C. et al. Characterization of successful root canal treatment. **Braz. Dent. J.**, v.25, p.3-11, jan-feb. 2014.
3. WILSON, M. et al. Susceptibility of oral bacterial biofilms to antimicrobial agents. **J. Med. Microbiol.**, v.44, n.2, p.79-87, feb.1996.
4. ZEHNDER, M. Root canal irrigants. **J. Endod.** v.32, n.5, p.389-98, may 2006.
5. ESTRELA, C. et al. Antibacterial efficacy of intracanal medicaments on bacterial biofilm: a critical review. **J. Appl. Oral Sci.**, v.17, n.1, p.1-7, feb. 2009.
6. ESTRELA, C.; PECORA, J.D. Hipoclorito de Sódio. In: ESTRELA,C. et al. **Ciência Endodôntica**. v.1. São Paulo: Artes Médicas, 2004. cap.11, p.415-456.
7. HAAPASALO, M. et al. Effects of dentin on the antimicrobial properties of endodontic medicaments. **Endod. J.**, v.33, n.8, p.917-25, aug. 2007.
8. ESTRELA, C. et al. Mechanism of action of sodium hypochlorite. **Braz. Dent. J.**, v.13, n.2, p. 113-7, 2002.
9. ESTRELA, C.R. et al. Control of microorganisms in vitro by endodontic irrigants. **Braz. Dent. J.**, v.14, n.3, p.187-92, 2003.
10. HAAPASALO, M. et al. Irrigation in endodontics. **Dent. Clin. North. Am.** v.54, n.2, p.291-312, apr. 2010.
11. HOCKETT, J.L. et al. Antimicrobial efficacy of two irrigation techniques in tapered and nontapered canal preparations: an in vitro study. **J. Endod.**, v.34, n.11, p.1374-7. Nov. 2008.
12. NIELSEN, B.A.; CRAIG BAUMGARTNER, J. Comparison of the EndoVac system to needle irrigation of root canals. **J. Endod.**, v.33, n.5, p.611-5, may 2007.

13. GONDIM, E. Jr. et al. Postoperative pain after the application of two different irrigation devices in a prospective randomized clinical trial. **J. Endod.**, v.36, n. 8, p.1295-301, aug. 2010.
14. PETERS, O.A. et al. Effects of four Ni-Ti preparation techniques on root canal geometry assessed by micro computed tomography. **Int. Endod. J.**, v.33, n.3, p.221-30, apr. 2001.
15. GOODMAN, A. et al. An in vitro comparison of the efficacy of the step-back technique versus a step-back ultrasonic technique in human mandibular molars. **J. Endod.**, v. 11, n.6, p.249-56, jun. 1985.
16. GUSTARTS, R. et al. In vivo debridement efficacy of ultrasonic irrigation following hand-rotary instrumentation in human mandibular molars. **J. Endod.**, v.31, n.3, p.166-70, mar. 2005.
17. VAN DER SLUIS, L.W. Passive ultrasonic irrigation of the root canal: a review of the literature. **Int. End. J.**, v.40, n.6, p.415-25, jun. 2007.
18. PINHEIRO, E.T. et al. Microorganisms from canals of root –filled teeth with periapical lesions. **Int. Endod. J.**, v.33, n.1, p.1-11, jan. 2003.
19. LOVE, R.M. *Enterococcus faecalis* – a mechanism for its role in endodontic failure. **Int. Endod. J.**, v.34, n.5, p.399-405, jul. 2001.
20. BUCK, R.A. et al. Effectiveness of three endodontic irrigants at various tubular depths in human dentin. **J. Endod.**, v.27, n.3, p.206-8, mar. 2001.
21. PORTENIER, I. *Enterococcus faecalis*– the root canal survivor and ‘star’ in post-treatment disease. **Endod. T.**, v.6, n.1,p.135-59, nov. 2003.
22. SEDGLEY, C.M. et al. Survival of *Enterococcus faecalis* in root canals ex vivo. **Int. Endod. J.**, v.38, n.10, p.735-42, oct. 2005.
23. ESTRELA, C. et al. Antimicrobial efficacy of ozonated water, gaseous ozone, sodium hypochlorite and chlorhexidine in infected human root canals. **Int. Endod. J.**, v.40, n. 2, p.85-93, feb. 2007.
24. DUGGAN, J.M.; SEDGLEY, C.M. Biofilm formation of oral and endodontic *Enterococcus faecalis*. **J. Endod.**, v.33, n.7, p.815-8, jul. 2007.

25. ESTRELA, C. et al. A model system to study antimicrobial strategies in endodontic biofilms. **J. Appl. Oral Sci.**, v.17, n.2, p.87-91, mar-apr. 2009.
26. VIVACQUA-GOMES, N. et al. Recovery of *Enterococcus faecalis* after single-or multiple-visit root canal treatments carried out in infected teeth *ex vivo*. **Int. Endod. J.**, v.38, n.10, p.697-704, oct. 2005.
27. MILLER, T.A.; BAUMGARTNER, J.C. Comparison of the antimicrobial efficacy of irrigation using the EndoVac to endodontic needle delivery. **J. Endod.**, v.36, n.3, p.509-11, mar. 2010.
28. DESAI, P.; HIMEL, V. Comparative safety of various intracanal irrigation systems. **J. Endod.**, v.35, n.4, p.545-9, apr.2009.
29. BRITO, P.R. et al. Comparison of the effectiveness of three irrigation techniques in reducing intracanal *Enterococcus faecalis* populations: an in vitro study. **J. Endod.**, v.35, n.10, p.1422-7, oct. 2009.
30. PAWAR, R. et al. Influence of an Apical Negative Pressure Irrigation System on Bacterial Elimination during Endodontic Therapy: A Prospective Randomized Clinical Study. **J. Endod.**, v.38, n.9, p.1177-81, sep. 2012.
31. ZUOLO, M.L. Retreatment efficacy of gutta-percha removal using a clinical microscope and ultrasonic instruments:part I-an ex vivo study. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v.108, n.1, p.59-62, jul. 2009.
32. SIQUEIRA, J.F. et al. Efficacy of instrumentation techniques and irrigation regimens in reducing the bacterial population within root canals. **J. Endod.**, v.28, n.3, p.181-84, mar. 2002.
33. HSIEH, Y.D. et al. Dynamic recording of irrigating fluid distribution in root canals using thermal image analysis. **Int. Endod. J.**, v.40, n.1, p.11-7, jan. 2007.
34. TAY, F.R. et al. Effect of Vapor Lock on Root Canal Debridement by Using a Side-vented Needle for Positive-pressure Irrigant Delivery. **J. Endod.**, v.36, n.4, p.745-50, apr. 2010.
35. SUSIN, L. et al. Canal and isthmus debridement efficacies of two irrigant agitation techniques in a closed system. **Int. Endod. J.**, v.43, n.12, p.1077-90, dec. 2010.

36. De GREGORIO, C. et al. Efficacy of different irrigation and activation systems on the penetration of sodium hypochlorite into simulated lateral canals and up to working length: an in vitro study. **J. Endod.**, v.36, n.7, p.1216-21, jul. 2010.
37. CASE, P.D. et al. Treatment of root canal biofilms of *Enterococcus faecalis* with ozone gas and passive ultrasound activation. **J. Endod.**, v.38, n.4, p.523-6, apr. 2012.
38. ESTRELA, C. et al. A preliminary study of the antibacterial potential of cetylpyridinium chloride in root canals infected by *E. faecalis*. **Braz. Dent. J.**, v.36, n.6, p.645-53, 2012.
39. SEDGLEY, C.M. et al. Influence of irrigant needle depth in removing bioluminescent bacteria inoculated into instrumented root canals using real-time imaging in vitro. **Int. Endod. J.**, v.38, n.2, p.97-104, feb. 2005.
40. HOWARD, R.K. et al. Comparison of debris removal with three different irrigation techniques. **J. Endod.**, v.37, n.9, p.1301-5, sep. 2011.
41. BRUNSON, M. et al. Effect of apical preparation size and preparation taper on irrigant volume delivered by using negative pressure irrigation system. **J. Endod.**, v.36, n.4, p.721-4, apr. 2010.
42. SHIN, S-J. et al. Comparison of the cleaning efficacy of a new apical negative pressure irrigating system with conventional irrigation needles in the root canals. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v.109, n.3, p.479-84, mar. 2010.
43. MITCHELL, R.P. et al. Comparison of apical extrusion of NaOCl using the EndoVac or needle irrigation of root canals. **J. Endod.**, v.6, n.2, p.338-41, feb. 2010.
44. ZOU, L. et al. Penetration of sodium hypochlorite into dentin. **J. Endod.**, v.36, n.5, p.793-6, may 2010.
45. KHADEMI, A. et al. Determination of the minimum instrumentation size for penetration of irrigants to the apical third of root canal systems. **Endod. J.**, v.32, n.5, p.417-20, may 2006.
46. TOWNSEND C., MAKI J. An in vitro comparison of new irrigation and agitation techniques to ultrasonic agitation in removing bacteria from a simulated root canal. **J. Endod.**, v. 35, p. 1040-1043, 2009.