



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**HELDER FERNANDES DE OLIVEIRA**

---

**Potencial de sanificação de canais radiculares infectados com  
instrumentos reciprocantes associados com hipoclorito de  
sódio 2,5% e vinagre de maçã**

---

**Goiânia  
2016**

---

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, 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 bibliográfica  Dissertação  Tese

**2. Identificação da Tese ou Dissertação**

Nome completo do autor: Helder Fernandes de Oliveira

Título do trabalho: **Potencial de sanificação de canais radiculares infectados com instrumentos reciprocantes associados com hipoclorito de sódio 2,5% e vinagre de maçã**

**3. Informações de acesso ao documento:**

Concorda com a liberação total do documento  SIM  NÃO<sup>1</sup>

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

  
Assinatura do autor

Data: 17/11/ 2016

<sup>1</sup> Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

**HELDER FERNANDES DE OLIVEIRA**

---

---

**Potencial de sanificação de canais radiculares infectados com instrumentos reciprocantes associados com hipoclorito de sódio 2,5% e vinagre de maçã**

---

---

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Estrela

Co-orientadora: Profa. Dra. Ana Helena G. de Alencar

**Goiânia  
2016**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Fernandes de Oliveira, Helder

Potencial de sanificação de canais radiculares infectados com instrumentos reciprocantes associados com hipoclorito de sódio 2,5% e vinagre de maçã [manuscrito] / Helder Fernandes de Oliveira. - 2016. 79 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Estrela; co-orientador Ana Helena Gonçalves de Alencar.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Faculdade de Medicina (FM), Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Goiânia, 2016.

Bibliografia. Anexos.

Inclui siglas, símbolos, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Preparo de canal radicular. 2. Enterococcus faecalis. 3. biofilmes. 4. microscopia eletrônica de varredura. I. Estrela, Carlos , orient. II. Título.

CDU 616.314



Ata da Defesa de Tese de Doutorado realizada por **Helder Fernandes de Oliveira**. Aos dezessete dias do mês de novembro do ano de 2016, às 14:00 horas, reuniu-se na Faculdade de Odontologia/UFG a Comissão Julgadora infra nomeada para proceder ao julgamento da defesa de Tese intitulada: "**POTENCIAL DE SANIFICAÇÃO DE CANAIS RADICULARES INFECTADOS COM INSTRUMENTOS RECIPROCANES ASSOCIADOS COM HIPOCLORITO DE SÓDIO 2,5% E VINAGRE DE MAÇA**", como parte de requisitos necessários à obtenção do **título de Doutor**, área de concentração **Dinâmica do Processo Saúde-Doença**. O Presidente da Comissão julgadora, **Prof. Dr. Carlos Estrela**, iniciando os trabalhos concedeu a palavra ao candidato, para exposição em até **50 minutos** do seu trabalho. A seguir, o senhor presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos Examinadores, os quais passaram a arguir ao candidato durante o prazo máximo de 30 minutos, assegurando-se o mesmo igual prazo para responder aos Senhores Examinadores. Ultimada a arguição que se desenvolveu nos termos regimentais, a Comissão, em sessão secreta, expressou seu Julgamento, considerando o candidato aprovado ou reprovado.

**Banca Examinadora**

**Aprovado(a)/Reprovado(a)**

Prof. Dr. Carlos Estrela - Presidente  
Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Ana Helena Gonçalves de Alencar – Membro  
Prof. Dr. Jesus Djalma Pecora – Membro  
Prof. Dr. Daniel de Almeida Decurcio – Membro  
Prof. Dr. Julio Almeida Silva – Membro  
Prof. Dr. Fernando Branco Barletta – Suplente  
Prof. Dr. João Batista de Souza - Suplente

*Aprovado*  
\_\_\_\_\_  
*Aprovado*  
\_\_\_\_\_  
*Aprovado*  
\_\_\_\_\_  
*Aprovado*  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Em face do resultado obtido, a Comissão Julgadora considerou o candidato **Helder Fernandes de Oliveira** Habilitado (  ) Não habilitado (  ). Nada mais havendo a tratar, eu **Prof. Dr. Carlos Estrela**, lavrei a presente ata que, após lida e achada conforme foi por todos assinada.

**Assinatura**

Prof. Dr. Carlos Estrela - Presidente  
Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Ana Helena Gonçalves de Alencar – Membro  
Prof. Dr. Jesus Djalma Pecora – Membro  
Prof. Dr. Daniel de Almeida Decurcio – Membro  
Prof. Dr. Julio Almeida Silva – Membro  
Prof. Dr. Fernando Branco Barletta – Suplente  
Prof. Dr. João Batista de Souza - Suplente

*[Handwritten signature]*  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

A banca examinadora aprovou a seguinte alteração no título da Tese:

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

*[Handwritten signature]*  
**Helder Fernandes de Oliveira**

**Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde  
da Universidade Federal de Goiás**

**BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO**

**Aluno: Helder Fernandes de Oliveira**

---

**Orientador: Prof. Dr. Carlos Estrela**

**Co-Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Helena Gonçalves de Alencar**

**Membros:**

**1. Prof. Dr. Carlos Estrela (Presidente da banca)**

**2. Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Helena Gonçalves de Alencar**

**3. Prof. Prof. Dr. Jesus Djalma Pecora**

**4. Prof. Dr. Daniel de Almeida Decurcio**

**5. Prof. Dr. Julio Almeida Silva**

**OU**

**4. Prof. Dr. Fernando Branco Barletta**

**5. Prof. Dr. João Batista de Souza**

**Data: 17/11/2016**

### **Dedico este trabalho...**

Aos meus queridos pais, Dalva e Divino,  
pelo constante apoio em todos os  
momentos e pelos incansáveis esforços  
em me proporcionar a melhor educação.  
À vocês, todo meu eterno amor.

## AGRADECIMENTOS

---

Meus eternos agradecimentos,

À **Deus**, grande arquiteto do universo, fortaleza nos momentos de dificuldade, luz nos momentos de glória, que me concedeu o maravilhoso dom da vida, uma família especial e amigos que me fazem evoluir a cada dia. Obrigado Senhor, por tudo.

Aos meus queridos avós, **João Firmino da Silva e Sebastiana Aurora da Silva** (in memoriam), exímios exemplos de vida, luta, superação e amor.

Aos meus queridos pais, **Divino Fernandes de Oliveira e Dalva Maria Fernandes**, pela paciência, carinho, amor, constante incentivo, e por estarem sempre me apoiando nos bons e difíceis momentos.

Ao meu grande Mestre, orientador, amigo, **Prof. Carlos Estrela**, por todo conhecimento, dedicação e fundamentalmente paciência em sempre servir, ajudar e me capacitar para os caminhos e desafios da docência no ensino superior, sou e serei eternamente grato ao bem que me proporcionou.

À **Prof.<sup>a</sup> Ana Helena G. de Alencar**, que sempre colaborou conosco durante esta caminhada e pelos exemplos de educadora do qual nos inspiramos a cada dia.

Ao **Prof. João Batista de Souza**, exímio educador, que tanto colabora com o nosso grupo de Endodontia, com seus ensinamentos, experiência e

dedicação. Sou eternamente grato ao senhor, por estar sempre conosco desde a graduação até o nosso Doutorado. Muito obrigado.

Aos meus amigos do grupo de pós-graduação da Faculdade de Odontologia-UFG, **Alessandro Freire, Alexandre Carvalho, Denise Ramos, Iussif Mamede, Giulliano Caixeta, Felipe Cavalcanti, Gustavo Chaves, Iury Castro, Juliano Miguel, Keila Surama, Luiz Eduardo, Marcus Vinícius, Mônica Endo, Olavo Lyra, Patrícia Siqueira, Sara Renovato e Vinícius Caixeta** e todos os demais, obrigado pela amizade, convivência saudável e constante estímulo na busca de uma evolução científica e pessoal.

Ao meu estimado grupo de Endodontia – EndoScience representado pelos meus grandes amigos, **Daniel de Almeida Decurcio, Julio Almeida Silva, Alessandro Moreira Freire, Orlando Aguirre Guedes, Vinícius Caixeta de Sousa**, e pelo nosso grande mentor, mestre e amigo **Prof. Carlos Estrela**.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde FM/UFG, por todos ensinamentos, apoio, colaboração e constante estímulo no aprendizado da carreira docente. E em especial, ao **Prof. Dr. Paulo Sérgio Sucasas da Costa**, coordenador do programa.

Ao **Laboratório de Microscopia de Alta Resolução da Faculdade de Física –UFG (Labimic)** pela gentileza em nos ceder o espaço do Centro de Microscopia e Microanálise para a obtenção e análise das imagens de microscopia eletrônica de varredura.

À **Faculdade de Odontologia – FO/UFG**, escola que devo toda gratidão, por tudo que aprendi e conquistei. Se hoje, tenho essa formação profissional e humanística, é graças a esta grande casa, aos mestres que nela se dedicam, e que tanto me orgulha em ter feito parte.

E a todos os amigos, que de alguma forma, contribuíram neste processo de conquista e superação.

## PENSAMENTO

---

*"Não se deixem guiar puramente pela autoridade de alguém. Façam os experimentos, confirmem os fatos. Pensem! Não obedçam cegamente ao que os outros dizem só por terem a fama de sábios"*

*Galileu Galilei*

# SUMÁRIO

---

Tabelas e figuras	xii
Símbolos, siglas e abreviaturas	xiii
Resumo	xiv
Abstract	xv
1. Introdução	14
2. Objetivos	17
3. Materiais e métodos	18
4. Resultados	25
5. Discussão	32
6. Conclusão	39
Referências	40
Anexo	48
Publicação	49



## TABELAS E FIGURAS

---

**Tabela 1.** Média e desvio padrão da densidade óptica (nm) do meio de cultura das coletas microbiológicas realizadas antes e imediatamente após o preparo do canal radicular com sistemas reciprocantes associados ao hipoclorito de sódio 2,5% e ao vinagre de maçã.....27

**Tabela 2.** Médias e desvio padrão do percentual (%) de redução da densidade óptica do meio de cultura após o preparo do canal radicular com sistemas reciprocantes associados ao hipoclorito de sódio 2,5% e ao vinagre de maçã. ....29

**Tabela 3.** Frequência absoluta da classificação por scores, conforme ausência e presença de debris na superfície dentinária, avaliada por terços, de acordo com o sistema reciprocante empregado, em imagens de MEV.....30

**Tabela 4.** Frequência absoluta da classificação por scores, conforme ausência e presença de debris na superfície dentinária, avaliada por terços, de acordo com a solução irrigadora empregada, em imagens de MEV.....31

**Figura 1.** Classificação das imagens de microscopia eletrônica de varredura (1300x) de acordo com a ausência e presença de debris na superfície dentinária: A - Score 1 (Superfície de dentina radicular com ausência de debris); B - Score 2 (Superfície de dentina radicular com áreas cobertas por debris e muitos túbulos visíveis); C - Score 3 (Superfície de dentina radicular com áreas cobertas por debris e poucos túbulos visíveis); D - Score 4 (Superfície de dentina radicular totalmente coberta por debris).....23

**Figura 2.** Gráfico representativo da redução percentual (%) da densidade óptica do meio de cultura após o preparo do canal radicular com sistemas reciprocantes associados ao hipoclorito e sódio 2,5% e ao vinagre de maçã.....29

## SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

---

%	Porcentagem
AM	Amazonas
AATC	American tope culture collection
BHI	Brain heart infusion (infusão cérebro coração)
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
Comp	Company
°C	grau celsius
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
Lt	Lote
mL	mililitro
mm	milímetro
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
n.	Número
NaOCl	Hipoclorito de sódio
pH	Potencial hidrogeniônico
SP	São Paulo
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TF	Twisted file
TM	Trademark
USA	United States of America
UK	United Kindom
UV	Ultravioleta

## RESUMO

---

**Objetivo:** Avaliar o efeito antibacteriano de sistemas recíprocos associados ao hipoclorito de sódio 2,5% e ao vinagre de maçã em canais radiculares infectados. **Materiais e métodos:** Cinquenta dentes humanos unirradiculares extraídos foram preparados, inoculados com *Enterococcus faecalis* e incubados a 37°C por sessenta dias. Os espécimes foram aleatoriamente divididos em 05 grupos sendo três experimentais e dois controles (1. WaveOne® 40.08; 2. Reciproc® 40.06; 3. Unicore® 40.06; 4. Controle positivo; Controle negativo). Para cada grupo experimental, cinco espécimes foram irrigados com hipoclorito de sódio 2,5% e cinco com vinagre de maçã. O crescimento bacteriano foi analisado pela turbidez do meio de cultura e espectrofotometria UV. A limpeza das paredes dentinárias foi analisada por microscopia eletrônica de varredura. **Resultados:** Todos os grupos mostraram redução significativa da densidade óptica do meio de cultura após o preparo do canal radicular ( $p < 0,05$ ). Nenhuma estratégia de sanificação promoveu a eliminação completa do *E. faecalis*. Na análise da limpeza da superfície radicular, foi verificado que, em nenhum dos grupos houve a remoção completa dos debris, não sendo verificadas diferenças significativas indiferente aos terços analisados ( $p > 0,05$ ). **Conclusão:** Os instrumentos recíprocos (WaveOne®, Reciproc® e Unicore®) e as soluções irrigadoras hipoclorito de sódio 2,5% e vinagre de maçã não foram efetivos na completa eliminação do *E. faecalis* em canais radiculares infectados.

**Palavras-chave:** Preparo de canal radicular, *Enterococcus faecalis*, biofilmes, microscopia eletrônica de varredura.

## ABSTRACT

---

**Objective:** Evaluate the antibacterial effect of reciprocating systems associated with sodium hypochlorite 2.5% and apple vinegar in infected root canals. **Methods:** Fifty human anterior teeth uniradicular were prepared, inoculated with *E. faecalis* and examined after sixty days. The teeth were randomly assigned to five groups: (1. WaveOne® 40.08; 2. Reciproc® 40.06; 3. Unicorne® 40.06; 4 and 5 positive and negative controls. For each experimental group (n = 10), five specimens were irrigated with sodium hypochlorite 2.5%, and five with apple vinegar. Bacterial growth was analyzed using turbidity of culture medium followed by UV spectrophotometry. The cleaning of dentinal walls was analyzed by scanning electronic microscopy (SEM). **Results:** All groups showed a significant reduction of the optical density of the culture medium after the root canal preparation ( $p < 0,05$ ). No sanitizing strategy promoted the complete elimination of *E. faecalis*. In the analysis of cleaning the root surface, it was found that in none of the groups showed complete removal of debris, not being verified significant differences indifferent to analyzed thirds ( $p > 0.05$ ). **Conclusion:** The reciprocating instruments (WaveOne®, Reciproc® and Unicorne®) and irrigating sodium hypochlorite solution 2.5% and apple cider vinegar have not been effective in eliminating *E. faecalis* complete in infected root canals.

**Key words:** root canal preparation, *Enterococcus faecalis*, biofilms, scanning electron microscopy.

# 1. INTRODUÇÃO

---

A redução da microbiota do sistema de canais radiculares infectados é essencial ao sucesso do tratamento endodôntico. O adequado preparo do canal radicular associado à ação de agentes antimicrobianos (soluções irrigadoras e a medicação intracanal) desempenha um papel fundamental no processo de descontaminação (NAIR *et al.*, 2005).

As falhas do tratamento endodôntico têm sido associadas a complexidade anatômica. A permanência de bactérias em regiões de istmos, reentrâncias, ramificações, ou em canais ovais, achatados ou curvos dificulta a ação antibacteriana dos instrumentos endodônticos e a penetração da solução irrigadora (PETERS *et al.*, 2001; GLUSKIN, 2007; RICUCCI & SIQUEIRA, 2008; MADHUSUDHANA *et al.*, 2010; ALVES *et al.*, 2012; MACHADO *et al.*, 2013).

O desenvolvimento de instrumentos rotatórios de níquel-titânio possibilitou um expressivo avanço na modelagem do canal radicular, permitindo preparos mais centralizados, mantendo a configuração original do canal e com menor extrusão de debris para a região apical (PETERS, 2004; HÜLSMANN *et al.*, 2005).

A tecnologia atual para o preparo de canais radiculares desempenha importante papel na modelagem e desafios novos no perfeito processo de sanificação. Estudos utilizando microtomografia computadorizada demonstraram que algumas áreas permanecem intocadas durante o preparo do canal radicular. Estas áreas podem manter o biofilme bacteriano intacto e como não tiveram ação do instrumento servem como causa potencial de infecção persistente (PAQUÉ *et al.*, 2009; HAAPASALO *et al.*, 2010; VERSIANI *et al.*, 2011; VERSIANI *et al.*, 2013; DE DEUS *et al.*, 2011; ALVES *et al.*, 2011; SIQUEIRA *et al.*, 2010).

É essencial realçar o papel das soluções irrigadoras no processo de limpeza e sanificação dessas áreas. Neste sentido, o hipoclorito de sódio representa a substância bastante estudada e empregada pelos profissionais (ESTRELA *et al.*, 2002). No entanto, embora apresente uma eficiente limpeza e desinfecção, 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). Varise *et al.* (2014) mostraram que compostos organoclorados, altamente neurotóxicos, são gerados durante o contato do hipoclorito de sódio com a dentina e a polpa. Assim, outras soluções irrigadoras, como o vinagre de maçã, têm sido estudadas como alternativa ao hipoclorito. O vinagre de maçã como uma solução auxiliar no preparo químico-mecânico de canais radiculares também tem sido investigada e merece atenção especial devido os resultados promissores obtidos quando comparados a outros irrigantes tradicionais tais como o hipoclorito de sódio e o EDTA (ESTRELA *et al.*, 2004). Sua ação bactericida contra a microbiota do canal radicular aliada à sua boa capacidade de remoção da *smear layer* o torna uma importante alternativa de utilização como irrigante endodôntico (ESTRELA *et al.*, 2007; SIQUEIRA *et al.*, 2010; DORNELLES-MORGENTAL *et al.*, 2011; CANDEIRO *et al.*, 2011).

Os instrumentos rotatórios de níquel titânio de movimento contínuo tem mostrado significativas reduções bacterianas, porém até o presente momento as evidências indicaram que nenhum instrumento ou técnica foi capaz de atuar em toda área de superfície das paredes dentinárias durante o preparo, e tornar os sistemas de canais radiculares livre de bactérias e endotoxinas (MARTINHO *et al.*, 2010; PARANJPE *et al.*, 2012; MACHADO *et al.*, 2013; SIQUEIRA *et al.*, 2013; PAIVA *et al.*, 2013).

Yared *et al.* (2008), baseado nos conceitos das forças balanceadas de Roane, propuseram um conceito para a instrumentação de canais radiculares com instrumento único capaz de promover a modelagem do canal radicular. Vários sistemas reciprocantes foram lançados, tais como WaveOne<sup>®</sup>, (Dentsply Maillefer, Baillagues, Suíça), Reciproc<sup>®</sup> (VDW GmbH, Munique, Alemanha), TF Adaptive<sup>®</sup> (Axis/SybronEndo, Orange, CA, USA) e Unicorn<sup>®</sup> (Medin, Nove Mesto na Morave, Czech Republic) com o objetivo de reduzir o tempo do tratamento endodôntico e minimizar riscos de fratura e fadiga do instrumento.

Estes instrumentos são fabricados com a liga M-Wire, a qual é desenvolvida por um processo especial de tratamento térmico, e que apresenta maior flexibilidade e resistência à fadiga cíclica que a liga

convencional de NiTi (KIM *et al.*, 2012; PEREIRA *et al.*, 2012; YE & GAO, 2012).

Os instrumentos reciprocantes têm sido testados por meio de diferentes metodologias para avaliação da modelagem dos canais radiculares, remoção de detritos, extrusão apical de debris, resistência à fadiga cíclica, efetividade de limpeza e redução/eliminação bacteriana (ARIAS *et al.*, 2012; BURKLEI *et al.*, 2012; BERUTTI *et al.*, 2012; DIETRICH *et al.*, 2012; CASTELLO-ESCRIVA *et al.*, 2012).

Entretanto, apesar dos resultados promissores de diferentes estratégias de sanificação e preparo dos canais radiculares com instrumentos automatizados, no que se refere ao processo de descontaminação, é importante, o desenvolvimento de estudos comparativos entre as soluções irrigadoras e os novos instrumentos reciprocantes.

## 2. OBJETIVOS

---

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito antibacteriano de instrumentos reciprocantes associados ao hipoclorito de sódio 2,5% e ao vinagre de maçã em canais radiculares infectados.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1. Determinar o efeito antibacteriano do emprego dos instrumentos WaveOne<sup>®</sup>, Reciproc<sup>®</sup> e Unicone<sup>®</sup> associados ao hipoclorito de sódio 2,5% e ao vinagre de maçã, em canais radiculares infectados com *E. faecalis*, por meio de espectrofotometria.

2.2.3. Analisar a limpeza da superfície radicular de canais infectados com *E. faecalis*, após a utilização das diferentes estratégias de sanificação, por meio de imagens de microscopia eletrônica de varredura.



### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

---

O estudo teve início após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás CAAE n.19811113.0.0000.5083 (Anexo).

#### **Preparo das amostras**

Dentes humanos unirradiculares, extraídos por razões diversas, provenientes do serviço de urgência da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás (FO/UFG) foram utilizados no presente estudo.

Os dentes extraídos foram acondicionados em frasco contendo solução de timol 0,2%, e a seguir, imersos em hipoclorito de sódio 5% (Fitofarma, Lt. 20442, Goiânia, GO, Brasil) para remoção de tecidos orgânicos, por 30 minutos. Radiografias periapicais dos dentes foram realizadas nos sentidos vestibulo-lingual e próximo-proximal, utilizando-se filme radiográfico (Eastman Kodak Comp., USA) para confirmar a presença canal radicular único e fechamento do ápice radicular, e ausência de tratamento endodôntico prévio, obliterações do canal radicular, reabsorções radiculares internas e/ou externas, e de trincas e fraturas.

A amostra constituiu-se de cinquenta dentes, os quais foram preparados com cavidades de acesso padrão e patência do canal radicular alcançada com lima tipo K-flexofile n.15 (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Switzerland), comprovada pela visualização direta da ponta da lima no forame apical.

Posterior ao procedimento inicial de abertura e esvaziamento, as coroas foram seccionadas com broca multilaminada Endo-Z (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Switzerland) em alta rotação, em ângulo de 90° com o longo eixo do dente. Os comprimentos radiculares foram padronizados em 16 mm, por meio de paquímetro digital calibrado de 0,01 mm (Fowler/Sylvac Ultra-Cal Mark IV Electronic Caliper, Crissier, Switzerland), medido a partir do ápice radicular. A seguir, os espécimes foram autoclavados por 30 minutos a 120°C.

## **Delineamento experimental**

Os espécimes foram montados em uma plataforma de modo a permitir a inoculação do marcador biológico. A porção coronária do canal radicular de cada espécime 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. Um adesivo cianoacrilato (Super Bonder, Itapevi, SP, Brasil) foi utilizado para vedar a conexão, que ainda foi inteiramente coberta com duas camadas de esmalte de unha (Max Factor, Cosmetics and Fragrances, London, UK) para prevenir infiltração.

Os conjuntos, espécimes acoplados com os tubos Eppendorf, foram acondicionados em hipoclorito de sódio 5% por 30 minutos. Posteriormente, cada conjunto foi acoplado a um frasco de 20mL, com tampa perfurada, contendo 10mL do meio de cultura (BHI; Difco Laboratories, Detroit, Mi, USA) de forma que a porção apical do espécime permanecesse submersa durante todo o período de contaminação. Para assegurar o controle de infecção, o aparato teste foi incubado a 37°C por 24 horas. Decorrido esse período de tempo, nenhum crescimento bacteriano foi observado.

Para a formação do biofilme foi utilizada uma cepa referência de *E. 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 espécimes, as bactérias foram novamente cultivadas na superfície do BHI ágar seguindo as mesmas condições de incubação. O inóculo bacteriano foi obtido pela ressuspensão das células em solução salina em uma concentração final de aproximadamente  $3 \times 10^8$  células mL<sup>-1</sup>, ajustada para o padrão de turbidez 1 de McFarland padronizada por espectrofotômetro.

Para contaminação das amostras, 5 mL do BHI esterilizado foram misturados a 5 mL da suspensão bacteriana, e os grupos experimentais (n=30) e controle positivo (n=10) 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 espécimes foram mantidos em estufa microbiológica a 37°C.

Após o período de formação do biofilme, os canais radiculares foram secados e preenchidos com água destilada. Pontas de papel esterilizadas n. 40 (Tanari, Tanariman Indústria Ltda., Manacarú, AM, Brasil) foram introduzidas dentro do canal radicular e mantidas por 3 minutos para realização da coleta microbiológica. Cada amostra foi coletada utilizando três pontas de papel que foram posteriormente 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 espécimes foram removidos da plataforma e os grupos experimentais foram preparados.

Os espécimes foram aleatoriamente divididos em cinco grupos (n=10), sendo três experimentais e dois grupos controles. Grupo 1. WaveOne<sup>®</sup>: introduzido no canal radicular por movimento recíprocante com o instrumento de diâmetro 40.08 (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Switzerland); Grupo 2. Reciproc<sup>®</sup>: introduzido no canal radicular por movimento recíprocante com o instrumento de diâmetro 40.06 (VDW Silver, Munich, Germany); Grupo 3. Unicorne<sup>®</sup>: introduzido no canal radicular por movimento recíprocante com o instrumento L25 de diâmetro 40.06 (Medin, Nove Mesto na Morave, Czech Republic); Grupo 4. Controle positivo; Grupo 5. Controle negativo.

Para cada grupo experimental (n=10), cinco espécimes foram irrigados com hipoclorito de sódio 2,5% (Fitofarma, Goiânia, GO, Brasil) e cinco espécimes com vinagre de maçã (Castelo, Castelo Alimentos, Jundiaí, SP, Brasil). A irrigação convencional foi realizada com seringa Ultradent 5mL e cânula de irrigação Navitip (Ultradent Products Inc. 505 West 10200, South, South Jordan, UT 84095) com diâmetro de 0,30mm posicionada em 12mm. O acionamento mecânico dos instrumentos dos grupos WaveOne, Reciproc e Unicorne foi realizado com o motor elétrico X-SMART<sup>™</sup> Plus (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Switzerland). Após o preparo do canal radicular, cada espécime foi secado com ponta de papel absorvente n. 40 esterilizada, o canal preenchido com 3 mL de EDTA 17%, mantido sob agitação com lima manual por 3 minutos. O grupo controle positivo foi usado para verificar a

viabilidade bacteriana e o negativo, para avaliar a esterilidade das amostras. Desta forma, durante um período de 60 dias de contaminação dos canais radiculares, dez espécimes não contaminados foram deixados incubados a 37°C, como um controle asséptico, e dez foram contaminados com *E. faecalis*, em condições atmosféricas similares às descritas anteriormente.

Após o processo de irrigação em cada grupo, uma irrigação adicional com 5 mL de água destilada esterilizada foi realizada com uma seringa. Os canais radiculares foram secados e preenchidos com água destilada esterilizada e secados de maneira similar à descrita anteriormente. Cada amostra foi coletada utilizando três pontas de papel. As pontas foram imersas em um tubo de ensaio contendo 7 mL de Letheen Broth (LB; Difco Laboratories), adicionado com neutralizantes [Letheen, 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, em reduzida atmosfera de oxigênio.

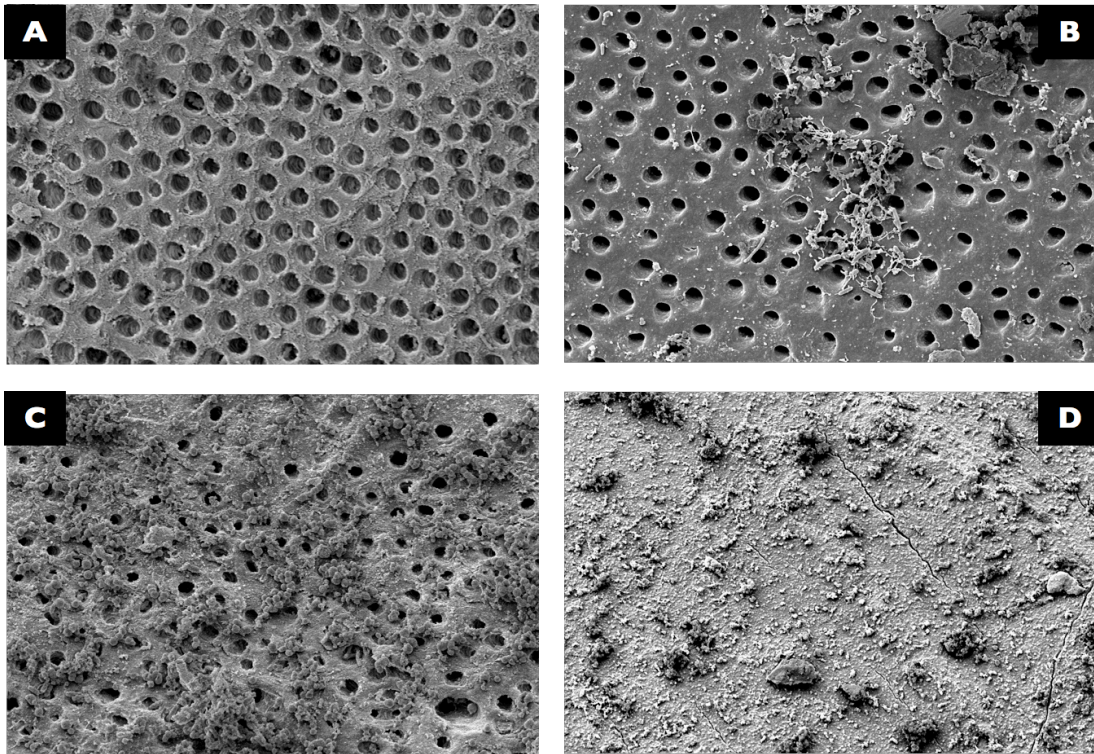
Após o preparo do canal radicular, o crescimento bacteriano foi analisado pela turbidez do meio de cultura, sendo determinada a presença ou ausência de bactérias, e utilizando espectrofotômetro UV (Spectrophotometer Model Nova 1600 UV, Piracicaba, SP, Brasil). Após as coletas microbiológicas, os tubos contendo os cones de papel imersos em meios de cultura, foram transportados de maneira asséptica para uma estufa microbiológica a 37°C e permaneceram por 48 horas. Após esse período, foi realizado um repique de todos os meios em novos tubos contendo 7mL do caldo Letheen (Letheen Broth; Difco Laboratories, Detroit, Mi, USA). Esses meios foram armazenados da mesma maneira descrita anteriormente. A seguir, as amostras foram preparadas para análise em microscopia eletrônica de varredura. Todas as coletas foram realizadas sob condições assépticas.

### **Microscopia Eletrônica de Varredura**

Sulcos longitudinais foram realizados ao longo de todo o comprimento da raiz dos dez espécimes de cada grupo, sendo que o seccionamento foi feito em capela de fluxo laminar com uma espátula n. 24 e um martelo cirúrgico esterilizados.

Os fragmentos foram fixados em solução tamponada de formalina por uma semana. Em seguida, foi feita a desidratação em solução crescente de etanol 70%, 95% e 99,5%, com duas trocas por solução, totalizando 30 minutos em cada solução. A secagem foi realizada em ponto crítico (AutoSamdri-815, Tousimis Research Corporation, Rockville, Maryland, USA). O preparo metalográfico dos dentes foi feito para a análise no Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV, JED, JSM, 6360LV, Tokyo, Japan) com magnificação 1600 vezes, para observar a presença de debris na superfície dentinária (Labimic, Faculdade de Física, UFG, Goiânia, GO, Brasil). A raiz foi medida e dividida igualmente dentro dos terços cervical, médio e apical, os quais foram avaliados separadamente.

Três observadores nivelados analisaram as imagens para avaliação quanto a ausência e presença de debris na superfície dentinária da raiz de acordo com o terço, cervical, médio e apical, usando as seguintes classificações: Score 1. Superfície de dentina radicular com ausência de debris; Score 2. Superfície de dentina radicular com poucas áreas cobertas por debris e muitos túbulos visíveis; Score 3. Superfície de dentina radicular com muitas áreas cobertas por debris e poucos túbulos visíveis; Score 4. Superfície de dentina radicular completamente coberta por debris (Figura 1).



**Figura 1.** Classificação das imagens de microscopia eletrônica de varredura (1600x) de acordo com a ausência e presença de debris na superfície dentinária: A - Score 1 (Superfície de dentina radicular com ausência de debris); B - Score 2 (Superfície de dentina radicular com áreas cobertas por debris e muitos túbulos visíveis); C - Score 3 (Superfície de dentina radicular com áreas cobertas por debris e poucos túbulos visíveis); D - Score 4 (Superfície de dentina radicular totalmente coberta por debris).

Duas análises distintas foram realizadas: não pareada, comparando os valores de densitometria entre os instrumentos reciprocantes, as soluções irrigadoras e a combinação instrumento mais solução em cada período de coleta (Inicial e após o preparo) e a pareada comparando os valores de densitometria entre a coleta antes e após o preparo.

Inicialmente, foram testadas a distribuição dos erros aleatórios em torno da média (normalidade) e a presença ou não de variâncias homogêneas, respectivamente pelos testes de Shapiro-Wilk e Lévene. Para os dados de densitometria antes do preparo e da coleta após o preparo, não foram verificadas presença de normalidade e homogeneidade de variâncias ( $p < 0,05$ ).

Para comparação entre a alocação dos espécimes para teste dos instrumentos reciprocantes no grupo controle foi inicialmente aplicado o teste de Kruskal-Wallis. Para se testar, os espécimes alocados para as duas soluções irrigadoras neste mesmo grupo foi aplicado o teste U de Mann-Whitney. Considerando a interação instrumento e solução irrigadora, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis.

Na análise estatística dos dados frente a remoção de debris em imagens de microscopia eletrônica de varredura foi utilizado os testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. O nível de significância foi de 5%.

## 4. RESULTADOS

---

A Tabela 1 apresenta os resultados da redução bacteriana após as estratégias de sanificação, utilizando os instrumentos reciprocantes WaveOne<sup>®</sup>, Reciproc<sup>®</sup> e Unicone<sup>®</sup> associados às soluções irrigadoras hipoclorito de sódio 2,5% e vinagre de maçã, quando avaliada por meio de espectrofotometria. Embora todos os grupos tenham mostrado redução significativa da densidade óptica do meio de cultura após o preparo do canal radicular ( $p < 0,05$ ), nenhuma estratégia promoveu a eliminação completa do *E. faecalis*.

As médias e desvios padrão do percentual de redução bacteriana de acordo com a estratégia de sanificação utilizada estão apresentados na Tabela 2. Em todos os grupos testados a associação com o hipoclorito de sódio 2,5% promoveu maior redução bacteriana do que com o vinagre de maçã, sendo observadas diferenças significantes entre estes ( $p < 0,001$ ). O instrumento Reciproc<sup>®</sup> associado ao irrigante hipoclorito de sódio 2,5% promoveu o maior percentual de redução bacteriana, enquanto que, a associação do Reciproc com o vinagre de maçã foi a que apresentou o menor (Figura 2).

Os percentuais de redução bacteriana após o preparo do canal radicular com os sistemas WaveOne<sup>®</sup>, Reciproc<sup>®</sup> e Unicone<sup>®</sup> associados ao hipoclorito de sódio 2,5% foram de 96,95%, 99,51%, e 78,43% respectivamente, porém, não foram verificadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos.

Após a análise da limpeza da superfície radicular, por meio de imagens de MEV, foi verificado que, em nenhum dos grupos houve a remoção completa dos debrís (Score 1).

A Tabela 3 apresenta a frequência absoluta da classificação por scores, conforme a ausência e presença de debrís na superfície dentinária, avaliada por terços, de acordo com o sistema recíprocante empregado. Os resultados mostraram que o grupo do Reciproc<sup>®</sup> apresentou o maior número de superfícies com score 2 (18/30), seguido do Unicone<sup>®</sup> (14/30) e WaveOne<sup>®</sup>



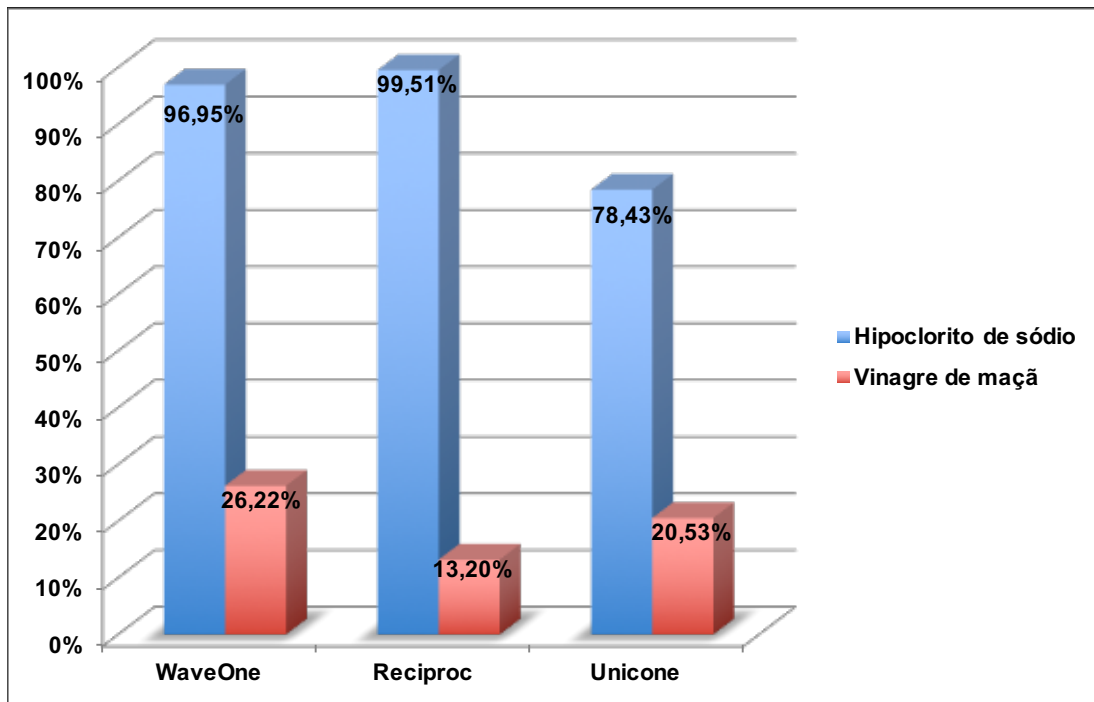
(12/30). Quando considerada a frequência absoluta da classificação por scores de acordo com a solução irrigadora utilizada (Tabela 4), o grupo do vinagre de maçã apresentou o maior número de superfícies com score 2 (26/45). A comparação entre os postos médios quanto a frequência absoluta dos scores revelou não haver diferenças significantes entre os grupos ( $p>0,05$ ), quando considerado tanto o sistema recíprocante ( $n=30$ ) quanto a solução irrigadora ( $n=45$ ).

**Tabela 1.** Média e desvio padrão da densidade óptica (nm) do meio de cultura das coletas microbiológicas realizadas antes e imediatamente após o preparo do canal radicular com sistemas reciprocantes associados ao hipoclorito de sódio 2,5% e ao vinagre de maçã

Sistema reciprocante	Solução irrigante	N	Média/DP da densidade óptica (nm)	Média/DP da densidade óptica (nm)
			Coleta antes	Coleta após
WaveOne®	Hipoclorito de sódio 2,5%	5	0,289 ± 0,089	0,007 ± 0,006
	Vinagre de maçã	5	0,235 ± 0,048	0,168 ± 0,014
	Total	10	0,262 ± 0,073	0,087 ± 0,086
Reciproc®	Hipoclorito de sódio 2,5%	5	0,200 ± 0,058	0,001 ± 0,002
	Vinagre de maçã	5	0,245 ± 0,099	0,181 ± 0,006
	Total	10	0,223 ± 0,080	0,091 ± 0,095
Unicone®	Hipoclorito de sódio 2,5%	5	0,264 ± 0,098	0,034 ± 0,066
	Vinagre de maçã	5	0,227 ± 0,065	0,169 ± 0,012
	Total	10	0,246 ± 0,080	0,102 ± 0,084

**Tabela 2.** Médias e desvio padrão do percentual (%) de redução da densidade óptica do meio de cultura após o preparo do canal radicular com sistemas reciprocantes associados ao hipoclorito de sódio 2,5% e ao vinagre de maçã

<b>Sistema reciprocante</b>	<b>Solução Irrigante</b>	<b>N</b>	<b>Média/DP</b>
WaveOne®	Hipoclorito de Sódio 2,5%	5	96,95 ( $\pm 3,59$ )
	Vinagre de Maçã	5	26,22 ( $\pm 15,40$ )
	Total	10	61,58 ( $\pm 38,74$ )
Reciproc®	Hipoclorito de Sódio 2,5%	5	99,51 ( $\pm 0,82$ )
	Vinagre de Maçã	5	13,20 ( $\pm 41,43$ )
	Total	10	56,36 ( $\pm 53,22$ )
Unicone®	Hipoclorito de Sódio 2,5%	5	78,43 ( $\pm 43,86$ )
	Vinagre de Maçã	5	20,53 ( $\pm 23,23$ )
	Total	10	49,48 ( $\pm 45,01$ )



**Figura 2.** Gráfico representativo da redução percentual (%) da densidade óptica do meio de cultura após o preparo do canal radicular com sistemas reciprocantes associados ao hipoclorito de sódio 2,5% e ao vinagre de maçã

**Tabela 3.** Frequência absoluta da classificação por scores, conforme ausência e presença de debris na superfície dentinária, avaliada por terços, de acordo com o sistema reciprocante empregado, em imagens de MEV

Classificação	Número de superfície dentinária		
	WaveOne <sup>®</sup>	Reciproc <sup>®</sup>	Unicone <sup>®</sup>
Score 1	0	0	0
Score 2	12	18	14
Score 3	16	9	14
Score 4	2	3	2
Total	30	30	30

**Tabela 4.** Frequência absoluta da classificação por scores, conforme ausência e presença de debris na superfície dentinária, avaliada por terços, de acordo com a solução irrigadora empregada, em imagens de MEV

<b>Classificação</b>	<b>Número de superfície dentinária</b>	
	<b>Hipoclorito de Sódio</b>	<b>Vinagre de Maçã</b>
<b>Score 1</b>	0	0
<b>Score 2</b>	18	26
<b>Score 3</b>	23	16
<b>Score 4</b>	4	3
<b>Total</b>	45	45

## 5. DISCUSSÃO

---

A ação dos sistemas reciprocantes em conjunto com as soluções irrigadoras (hipoclorito de sódio a 2,5% e vinagre de maçã) em canais radiculares infectados promoveu redução bacteriana. Um dos fatores determinantes do fracasso endodôntico é a manutenção pós-tratamento da infecção no sistema de canais radiculares, cujo processo de sanificação envolve a ação mecânica com o poder de desagregar o biofilme e os efeitos físico-químicos das substâncias irrigadoras com o objetivo de alcançar e eliminar a microbiota presente (FERRER-LUQUE *et al.*, 2014; ESTRELA *et al.*, 2014).

A organização dos microrganismos em biofilmes aumenta sobremaneira a resistência destes patógenos frente aos procedimentos terapêuticos endodônticos. O *E. faecalis* está presente em elevada prevalência em casos de infecção endodôntica persistente, sendo capaz de se estruturar-se em biofilme, invadir profundamente os túbulos dentinários e sobreviver em microambientes de escassos nutrientes (STUART *et al.*, 2006; CHÁVEZ DE PAZ *et al.*, 2010; SOUZA *et al.*, 2010; NAKAMURA *et al.*, 2015).

O período de contaminação e indicador biológico utilizado no presente estudo foi de 60 dias, período este suficiente para que o *E. faecalis* colonize e promova uma invasão dos túbulos dentinários e estruture um biofilme maduro. Este modelo foi utilizado em estudo prévio (ESTRELA *et al.*, 2009) para avaliar estratégias antimicrobianas com tempo de colonização bacteriana satisfatório às propriedades de virulência e aderência. Outros estudos empregaram, períodos menores na formação de biofilmes, o que dificulta comparações e extrapolação dos resultados para o estabelecimento de protocolos clínicos (HEMS *et al.*, 2005; CLEGG *et al.*, 2006; SOUKOS *et al.*, 2006; GARCEZ *et al.*, 2006; GARCEZ *et al.*, 2007).

O método utilizado de coletas bacterianas antes e após o preparo do canal radicular para se verificar o crescimento ou redução bacteriana nos canais radiculares infectados por *E. faecalis*, por meio de cones de papel

aconicionados em meio de cultura, é um método padrão amplamente empregado para este tipo de análise (ESTRELA *et al.*, 2007; ESTRELA *et al.*, 2009; NAKAMURA *et al.*, 2015; ALVES *et al.*, 2015).

O indicador biológico usado como referência, *E. faecalis*, foi utilizado em vários estudos prévios (HAAPASALO & ØRSTAVIK 1987; ESTRELA *et al.*, 1999; ESTRELA *et al.*, 2007; ESTRELA *et al.*, 2009; PAQUE *et al.*, 2009; HAAPASALO *et al.*, 2010; GUINZELLI *et al.*, 2014; LUI *et al.*, 2014), sendo considerada importante bactéria nas condições de persistência de lesões periapicais pós-tratamento endodôntico (NAIR *et al.*, 2005, SUNDQUIST *et al.*, 1998). Trata-se de um coco gram-positiva facultativa que tolera baixa condições de nutrientes e oxigênio e elevado pH (SUNDQUIST *et al.*, 1998; KVIST *et al.*, 2004; SIQUEIRA *et al.*, 2010; ALVES *et al.*, 2012; ESTRELA *et al.*, 2014).

Vários instrumentos rotatórios de NiTi têm sido incorporados à endodontia, no intuito de diminuir a prevalência de iatrogenias e melhorar o processo de limpeza do sistema de canais radiculares. (PETERS, 2004). A proposta do movimento recíprocante e preparo com instrumento único proposto por YARED (2008), conjugada a liga M-Wire com tratamento térmico de superfície têm possibilitado maior flexibilidade e resistência à fratura quando comparado às ligas de níquel-titânio convencionais. Assim, diferentes estratégias metodológicas têm sido continuamente testadas para se avaliar a eficácia destes instrumentos recíprocantes quanto à preservação da geometria original dos canais radiculares, redução de detritos apicais, remoção de material obturador, resistência à fadiga cíclica, bem como o desempenho destes frente ao processo de limpeza e redução bacteriana (ARIAS *et al.*, 2012; BURKLEI *et al.*, 2012; BERUTTI *et al.*, 2012; SHEN *et al.*, 2013; DIETRICH *et al.*, 2012; CASTELLO-ESCRIVA *et al.*, 2012; KOÇAK *et al.*, 2013; ZUOLO *et al.* 2013; MARINHO *et al.*, 2015;). Entretanto, a simplificação do preparo por meio de um único instrumento traz preocupações quanto à eficácia em promover uma adequada desinfecção do sistema de canais radiculares (NAKAMURA *et al.*, 2015).

Os resultados do presente estudo mostraram redução bacteriana após o preparo dos canais radiculares com os respectivos sistemas recíprocantes WaveOne<sup>®</sup>, Reciproc<sup>®</sup> e Unicorne<sup>®</sup> associadas as soluções irrigadoras de



hipoclorito de sódio 2.5% e de vinagre de maçã. Estes achados estão condizentes com outros estudos anteriores que utilizaram metodologias similares (DAGNA *et al.*, 2012; MACHADO *et al.*, 2013; NAKAMURA *et al.*, 2015). Em canais radiculares infectados por *E. faecalis*, Dagna *et al.*, (2012) avaliaram a eficácia antibacteriana utilizando usando instrumentos rotatórios de NiTi (MTwo, Revo-S, e One Shape) e recíprocante (Reciproc), sob irrigação com hipoclorito de Sódio 5% e EDTA 17%. Todas as técnicas foram eficientes na redução bacteriana, sendo os instrumentos de uso único Reciproc tão eficientes quanto ao sistema rotatório convencional. NAKAMURA *et al.* (2015) verificaram a efetividade de três técnicas de instrumentação, manual (K-file<sup>®</sup>), rotatória contínua (MTwo<sup>®</sup>), e recíprocante (Reciproc<sup>®</sup>) associada ao hipoclorito de sódio 2.5% em canais radiculares ovais infectados por *E. faecalis*. Todas as técnicas reduziram o número de microrganismos e a instrumentação recíprocante com Reciproc<sup>®</sup> foi efetiva na redução do biofilme com *E. faecalis*. MACHADO *et al.* (2013) avaliaram a influência da instrumentação recíprocante com instrumento único (WaveOne, Reciproc) e rotatória contínua (ProTaper, MTwo) e instrumentação manual na redução bacteriana em canais radiculares infectados por *E. faecalis*. As amostras bacterianas foram coletadas imediatamente e 7 dias após a instrumentação. A contagem bacteriana foi significativamente reduzida após a instrumentação em todos os grupos analisados, não havendo diferença quanto à redução entre as técnicas recíprocantes, rotatória contínua e instrumentação manual.

ALVES *et al.*, (2012) analisaram pelo método qPCR e cultura microbiológica, o efeito antibacteriano em canais ovais comparando a técnica do instrumento único Reciproc<sup>®</sup> associado ao hipoclorito de sódio 2,5%, com a técnica rotatória convencional com instrumentos BioRace associada ao hipoclorito de sódio 2,5%. Ambas as técnicas promoveram redução bacteriana, não havendo diferenças entre os sistemas de instrumentação.

Diante da necessidade de sobrepor as dificuldades e as barreiras de resistência microbiana, diferentes modelos experimentais de biofilme têm sido descritos. Experimentos *in vivo*, *ex vivo*, dentes de cães *in vivo*, dentes

bovinos *ex vivo*, e modelo de biofilme em filtros de membrana vem sendo testados, no intuito de se analisar o comportamento e a efetividade de diferentes soluções irrigantes e instrumentos destinados ao processo de desinfecção. (BYSTROM *et al.*, 1985; HAAPASALO *et al.*, 1987; ØRSTAVIK *et al.*, 1990; SAFAVI *et al.*, 1990; ESTRELA *et al.*, 1999; DISTEL *et al.*, 2002; HOLLAND *et al.*, 2003; ESTRELA *et al.*, 2007; ESTRELA *et al.*, 2009). A susceptibilidade do biofilme bacteriano frente às diferentes estratégias de sanificação e modelagem indica a necessidade de se reproduzir as condições *in vivo*, onde as bactérias possam crescer e se estruturar sobre a superfície da dentina radicular (WILSON 1996).

Embora o preparo dos canais radiculares realizados pelos diferentes sistemas recíprocos WaveOne<sup>®</sup>, Reciproc<sup>®</sup> e Unicorne<sup>®</sup> tenha sido realizado por apenas um único instrumento com diâmetro 40.08, 40.06 e 40.06 respectivamente, os resultados mostraram que não foram diferentes de outras técnicas testadas (HULSMANN *et al.*, 2005; SIQUEIRA *et al.*, 2010; DE DEUS *et al.*, 2011; DIETRICH *et al.*, 2012; BURKLEIN *et al.*, 2012; PARANJPE *et al.*, 2012; PAIVA *et al.*, 2013; MACHADO *et al.*, 2013; VERSIANI *et al.*, 2013; SIQUEIRA *et al.*, 2013; NAKAMURA *et al.* 2015). Tal fato pode ser pela ampliação final da porção apical a um diâmetro de 400µm alcançada nos grupos experimentais. Assim, há de se considerar que a eficácia do processo de sanificação do sistema de canais radiculares está diretamente associada à correta determinação do comprimento de trabalho e também no grau de alargamento da porção apical. Desta forma, ampliar a crítica zona apical a diâmetros biológicos capazes de otimizar a efetividade da substância química auxiliar e da medicação intracanal torna-se essencial (WU *et al.*, 2002; DEBELIAN *et al.*, 2008). Métodos como a microtomografia computadorizada empregado para avaliar a ação dos instrumentos endodônticos nas paredes do canal radicular, revela que extensas áreas podem não serem tocadas durante o preparo pelo instrumento endodôntico, o que corrobora com importância da irrigação na limpeza e sanificação dessas áreas (PAQUÉ *et al.*, 2009; HAAPASALO *et al.*, 2010); VERSIANI *et al.*, 2011; VERSIANI *et al.*, 2013). As superfícies não tocadas podem ser desinfetadas pela ação das soluções irrigantes, o que pode explicar a ausência de diferenças entre os três grupos no presente estudo.

A seleção de um irrigante ideal depende de sua ação contra a microbiota dos canais radiculares e o efeito biológico nos tecidos periapicais. Várias soluções irrigantes têm sido preconizadas a fim de diminuir a infecção endodôntica e contribuir para a desinfecção do canal radicular (ESTRELA *et al.* 2002; ESTRELA *et al.*, 2007; ESTRELA *et al.*, 2014).

O hipoclorito de sódio é uma solução amplamente utilizada no processo de sanificação endodôntica, por apresentar propriedades fundamentais como um largo espectro de ação, efeito antimicrobiano (contra esporos e vírus) e pela capacidade de dissolução da matéria orgânica que está diretamente influenciada pelo aumento de sua concentração (ZENDER, 2006; ESTRELA *et al.*, 2002; MARENDING *et al.*, 2007; CANDEIRO *et al.* 2011). Entretanto, este poder de dissolução da matéria orgânica não é seletivo, o que significa que especialmente em altas concentrações este agente pode dissolver tanto os tecidos vitais quanto os remanescentes necróticos indistintamente, além do fato ter alta toxicidade aos tecidos periapicais em casos de inadvertida extrusão. Estudos têm sido realizados no intuito de se encontrar outras alternativas de um irrigante endodôntico que apresente melhor biocompatibilidade que o NaOCl mantendo as propriedades de dissolução tecidual e de elevado poder antibacteriano (HAAPASALO *et al.*, 2007; CANDEIRO *et al.* 2011; ESTRELA *et al.*, 2012; VARISE *et al.* 2014)

Diferentes irrigantes, como EDTA, ácido cítrico, ácido maleico e vinagre de maçã vem sendo utilizados para a remoção da *smear layer* durante o tratamento endodôntico. O vinagre de maçã constitui em uma alternativa de solução irrigadora auxiliar no preparo químico mecânico dos canais radiculares. Suas propriedades físico-químicas e eficácia no processo de sanificação tem sido investigado em diferentes estudos (ZANDIM *et al.*, 2004; ESTRELA *et al.*, 2004; ESTRELA *et al.*, 2007; CALIGIANI *et al.*, 2007). A presença do ácido maleico em sua composição confere ao vinagre de maçã uma importante característica de tolerância tecidual, uma vez que este é um dos ácidos responsáveis pela produção de energia nas células. Além disso, o vinagre de maçã tem um potencial medicinal notável devido ao seu elevado conteúdo mineral (sódio, potássio, fósforo, magnésio, enxofre, cálcio e silício) e outros elementos como a pectina, betacaroteno, enzimas e

aminoácidos que atacam os radicais livres contribuindo para o sistema imune e no processo de reparo periapical (ESTRELA *et al.*, 2004; ESTRELA *et al.*, 2007). Apresenta ainda boa capacidade de remoção de *smear layer* das entradas dos túbulos dentinários com ação bactericida contra microrganismos que são frequentemente associados com infecções endodônticas, tais como *S. aureus* e *E. faecalis* (ESTRELA *et al.*, 2007).

No que tange às estratégias de sanificação, a solução de hipoclorito de sódio 2,5% mostrou-se ser mais efetiva do que o vinagre de maçã na redução bacteriana em dentina infectada. Esses achados são condizentes com estudos anteriores (ESTRELA *et al.*, 2004; DORNELLES-MORGENTAL *et al.*, 2011).

Na análise da limpeza das paredes dentinárias após o uso de soluções irrigadoras e sistemas reciprocantes, em imagens de microscopia eletrônica de varredura foi verificado que as paredes dos diferentes terços do canal radicular apresentavam com pequenas quantidades de sujidades. A análise dos dados revelou não haver diferenças estatisticamente entre os grupos, independente da solução irrigadora e do instrumento reciprocante, ou de sua combinação. Estes resultados também foram encontrados considerando os terços da raiz separadamente ( $p > 0,05$ ).

A avaliação bacteriológica em meio de cultura possibilitou verificar uma estimativa numérica da quantidade de bactérias por correspondência com a escala de turbidez de McFarland, o que confere valor quantitativo e elimina a subjetividade da análise visual (LIU *et al.*, 2014).

Os dados obtidos a partir da contagem bacteriana devem ser interpretados com cautela, uma vez que a coleta bacteriana ocorre apenas no canal principal, o que permite a detecção somente das bactérias planctônicas, não alcançando aquelas localizadas nas irregularidades do canal radicular e partes profundas dos túbulos dentinários (KVIST *et al.*, 2004; GHINZELLI *et al.*, 2014; NAKAMURA *et al.* 2015).

Os desafios a serem vencidos com vistas ao sucesso do tratamento endodôntico incluem o domínio da anatomia interna do canal radicular, o controle da microbiota endodôntica, a participação positiva das respostas imunológicas do indivíduo, além do conhecimento e habilidades do profissional (ESTRELA *et al.*, 2014).

Até o momento, a perfeita sanificação do sistema de canais radiculares infectados mantém como real desafio, uma vez que não tem sido alcançada por qualquer técnica de instrumentação ou protocolo de irrigação. Da mesma forma que o volume bacteriano mínimo remanescente dentro do canal radicular, necessário para promover o reparo dos tecidos periapicais ou para a manutenção da sua saúde, ainda é desconhecida. Novos estudos com outras metodologias, ensaios clínicos adicionais devem ser constantemente realizados no intuito de se avaliar os efeitos das técnicas de instrumentação e protocolos de irrigação frente à infecção endodôntica.

## 6. CONCLUSÃO

---

De acordo com a metodologia empregada, pode concluir que:

1. Os sistemas reciprocantes (WaveOne<sup>®</sup>, Reciproc<sup>®</sup> e Unicorn<sup>®</sup>) e as soluções irrigadoras hipoclorito de sódio 2,5% e vinagre de maçã não foram efetivos na completa eliminação do *E. faecalis* em canais radiculares infectados. O hipoclorito de sódio 2,5% mostrou-se mais efetivo na redução bacteriana dos canais radiculares do que com o vinagre de maçã.
2. Os sistemas reciprocantes WaveOne<sup>®</sup>, Reciproc<sup>®</sup> e Unicorn<sup>®</sup> associados ao hipoclorito de sódio 2,5% não mostraram diferenças quanto ao potencial antibacteriano. Nenhum dos sistemas reciprocantes associados ao hipoclorito de sódio 2,5% ou ao vinagre de maçã promoveu a remoção completa dos debris da superfície radicular, avaliada por meio de MEV.

## REFERÊNCIAS

---

1. ALVES, F. R.; ALMEIDA, B. M.; NEVES, M. A.; ROÇAS, I. N.; SIQUEIRA, J. F., JR. Time-dependent antibacterial effects of the Self-Adjusting File used with two sodium hypochlorite concentrations. **Journal of Endodontics**, v. 37, n. 10, p. 1451-1455, 2011.
2. ALVES, F.R.; RÔÇAS, I.N.; ALMEIDA, B.M.; NEVES, M.A.; ZOFFOLI, J.; SIQUEIRA, J.F.JR. Quantitative molecular and culture analyses of bacterial elimination in oval-shaped root canals by a single-file instrumentation technique. **International Endodontic Journal**, v. 45, p. 871–7, 2012.
3. ALVES, D.R.S.; CUNHA, R.S.; SILVEIRA-BUENO, C.E, DE ALENCAR, A.H.G.; ESTRELA C.R.A.; SANTOS, T.O.; ESTRELA C. Antibacterial Potential of 2.5% Sodium Hypochlorite in Distinct Irrigation Protocols on *Enterococcus faecalis* Biofilm. **J Contemp Dent Pract**, v.16(5), p. 340-346, 2015.
4. ARIAS, A.; PEREZ-HIGUERAS, J.J.; DE, L.A.; MACORRA, J.C. Differences in cyclic fatigue resistance at apical and coronal levels of Reciproc and WaveOne new files. **Journal of Endodontics**, v. 38, p.1244–8, 2012.
5. BERUTTI, E.; CHIANDUSSI, G.; PAOLINO, D.S.; SCOTTI, N.; CANTATORE, G.; CASTELLUCCI, A.; PASQUALINI, D. Canal shaping with WaveOne Primary reciprocating files and ProTaper system: a comparative study. **Journal of Endodontics**, v. 38, p. 505–9, 2012.
6. BYSTRÖM, A.; CLAEISSON, R.; SUNDQVIST, G. The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. **Endodontic Dental Traumatology**, v.1, p. 170-5, 1985.
7. BURKLEIN, S.; SCHAFER, E. Apically extruded debris with reciprocating single-file and full-sequence rotary instrumentation systems. **Journal of Endodontics**, v. 38, p. 850–2, 2012.
8. CALIGIANI, A.; ACQUOTTI, D.; PALLA, G.; BOCCHI, V. Identification and quantification of the main organic components of vinegars by high resolution <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. **Anal Chim Acta**, v. 585(1), p. 110-9, 2007.

9. CANDEIRO, G.T.; MATOS, I.B.; COSTA, C.F.; FONTELES, C.S.; VALE, M.S. A comparative scanning electron microscopy evaluation of smear layer removal with apple vinegar and sodium hypochlorite associated with EDTA. **Journal Applied Oral Science**, v. 19, n. 6, p.639-43, 2011.
10. CASTELLÓ-ESCRIVÁ, R.; ALEGRE-DOMINGO, T.; FAUS-MATOSES, V.; ROMÁN-RICHON, S.; FAUS-LLÁCER, V.J. In vitro comparison of cyclic fatigue resistance of ProTaper, WaveOne, and Twisted Files. **Journal of Endodontics**, v. 38, p.1521-4, 2012.
11. CLEGG, M.S.; VERTUCCI, F.J.; WALKER, C.; BELANGER, M.; BRITTO, L.R. The effect of exposure to irrigant solutions on apical dentin biofilms in vitro. **Journal of Endodontics**, v.32(5), p. 434-7, 2006.
12. CHÁVEZ DE PAZ, L.E.; BERGENHOLTZ, G.; SVENSÄTER, G. The effects of antimicrobials on endodontic biofilm bacteria. **Journal of Endodontics**, v. 36(1), p-70-7, 2010.
13. DAGNA, A.; ARCIOLA, C.R.; VISAI, L.; SELAN, L.; COLOMBO, M.; BIANCHI, S.; POGGIO, C. Antibacterial efficacy of conventional and single-use Ni-Ti endodontic instruments: an in vitro microbiological evaluation. **Int J Artif Organs**, v. 35(10), p. 826-31, 2012.
14. DE-DEUS, G.; SOUZA, E. M.; BARINO, B.; MAIA, J.; ZAMOLYI, R. Q.; REIS, C.; KFIR, A. The self-adjusting file optimizes debridement quality in oval-shaped root canals. **Journal of Endodontics**, v. 37, n. 5, p. 701-705, 2011.
15. DEBELIAN, G.; TROPE. M. BioRace: efficient, safe and biological based sequence files. **Roots**, v. 1, p. 20-26, 2008.
16. DIETRICH, M.A.; KIRKPATRICK, T.C.; YACCINO, J.M. In vitro canal and isthmus debris removal of the self-adjusting file, K3, and WaveOne files in the mesial root of human mandib- ular molars. **Journal of Endodontics**, v. 38, p. 1140-4, 2012.
17. DISTEL, J.W.; HATTON, J.F.; GILLESPIE, M.J. Biofilm formation in medicated root canals. **Journal of Endodontics**, v. 28, p.689-93, 2002.
18. DORNELLES-MORGENTAL, R.; TANOMARU, J.M.G.; FARIA-JÚNIOR, N.B.; DUARTE, M.A.H.; KUGA, M.C.; TANOMARU-FILHO, M. Antibacterial efficacy of endodontic irrigating solutions and their combinations in root canals contaminated with *Enterococcus faecalis*. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 112, p. 396-400, 2011.
19. ESTRELA, C.; PIMENTA, F.C.; ITO I.Y.; BAMMANN, L.L.; Antimicrobial evaluation of calcium hydroxide in infected dentinal tubules. **Journal of Endodontics**, v. 26, p. 416-8, 1999.



20. ESTRELA, C.; ESTRELA, C.R.; BARBIN, E.L.; SPANO, J.C.; MARCHESAN, M.A.; PECORA, J.D. Mechanism of action of sodium hypochlorite. **Brazilian Dental Journal**, v.13, n.2, p.113-7, 2002.
21. ESTRELA, C.; HOLLAND, R.; BERNABÉ, P.F.E.; SOUZA, V.; ESTRELA, C.R.A. Antimicrobial potential of medicaments used in healing process in dogs' teeth with apical periodontitis. **Brazilian Dental Journal**, v. 15(3), p.181-18, 2004.
22. ESTRELA, C.; ESTRELA, C.R.A.; DECURCIO, D.A.; HOLLANDA A.C.B.; SILVA, J.A. Antimicrobial efficacy of ozonated water, gaseous ozone, sodium hypochlorite and chlorhexidine in infected human root canals. **International Endodontic Journal**, v.40, p.85- 93, 2007.
23. ESTRELA, C.; LOPES, H.P.; ELIAS, C.N.; LELES, C.R.; PÉCOR, J.D. Cleanliness of the surface of the root canal of apple vinegar, sodium hypochlorite, chlorhexidine and EDTA. **Revista da Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas**, v. 61, p. 177-82, 2007.
24. ESTRELA, C.; SYDNEY, G.B.; FIGUEIREDO, J.A.; ESTRELA, C.R.; Antibacterial efficacy of intracanal medicaments on bacterial biofilm: a critical review. **Journal Applied Oral Science**, v. 17(1), p.1-7, 2009.
25. ESTRELA, C. SOUSA-NETO, M.D.; ALVES, D.R.S. ALENCAR, A.H.G.; SANTOS, T.O.; PÉCOR, J.D. A Preliminary Study of the Antibacterial Potential of Cetylpyridinium Chloride in Root Canals Infected by *E. Faecalis*. **Brazilian Dental Journal**, v. 23(6), p. 645-653, 2012.
26. ESTRELA, C.; HOLLAND, R.; ESTRELA, C.R.A.; ALENCAR, A.H.G.; SOUSA-NETO, M.D.; PECORA, J.D. Characterization of successful root canal treatment. **Brazilian Dental Journal**, v. 25(1), p.3-11, 2014.
27. FERRER-LUQUE, C. M.; BEJARANO, I. RUIZ-LINARES, M. BACA, P. Reduction in *Enterococcus faecalis* counts – a comparison between rotary and reciprocating systems. **International Endodontic Journal**, v. 47, p. 380–386, 2014.
28. GARCEZ A.S.; NÚÑEZ, S.C.; LAGE-MARQUES, J.L.; JORGE, A.O.; RIBEIRO, M.S. Efficiency of NaOCl and laser-assisted photosensitization on the reduction of *Enterococcus faecalis* in vitro. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 102(4), p. 93-8, 2006.
29. GARCEZ, A.S.; RIBERIO, M.S.; TEGOS, G.P.; NUNEZ, S.C.; JORGE, A.O.; HAMBLIN, M.R. Antimicrobial photodynamic therapy combined with conventional endodontic treatment to eliminate root canal biofilm infection. **Lasers Sur Med**, v. 39, p.59-66, 2007.
30. GHINZELLI, G.C.; SOUZA, M.A.; CECCHIN, D.; FARINA, A.P.; DE FIGUEIREDO, J.A. Influence of ultrasonic activation on photodynamic therapy over root canal system infected with *Enterococcus Faecalis* - an in

vitro study. **Photodiagnosis Photodynamic Therapy**, v.11(4), p.472-8, 2014.

31. GLUSKIN, A.H. Anatomy of an overfill: a reflection on the process. **Endodontic Topics**, v.16, p. 64-81, 2007.

32. HAAPASALO, M.; ØRSTAVIK, D. In vitro infection and disinfection of dentinal tubules. **Journal of Dental Research**, v. 66, p.1375-9, 1987.

33. HAAPASALO, M.; QIAN W.; PORTENIER, I.; WALTIMO, T.; Effects of dentin on the antimicrobial properties of endodontic medicaments. **Journal of Endodontics**, v.33, n.8, p. 917-25, 2007.

34. HAAPASALO, M.; SHEN, Y.; QIAN, W.; GAO, Y. Irrigation in endodontics. **Dental Clinics North America**, v.54: p.291-312, 2010.

35. HEMS, R.S.; GULABILAVALA K.N.G.; READY, D.; SPRATT, D.A. An in vitro evaluation of the ability of ozone to kill a strain of *Enterococcus faecalis*. **International Endodontic Journal**, v. 38, p.22-9, 2005.

36. HOLLAND, R.; OTOBONI-FILHO, J.A.; SOUZA, V.; NERY, M.J.; BERNABE, P.F.E.; DEZAN, E. JR.; A comparison of one versus two appointment endodontic therapy in dogs' teeth with apical periodontitis. **Journal of Endodontics**, v. 29, p.121-5, 2003.

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

38. LIU, H.; XU, Q.; HUO, L.; WEI, X.; LING, J. Chemical composition of *Enterococcus faecalis* in biofilm cells initiated from different physiologic states. **Folia Microbiologica (Praha)**, v. 59(5), p.447-53, 2014.

39. KIM, H.C.; KWAK, S.W.; CHEUNG, G.S.P.; KO, D.H.; CHUNG, S.M.; LEE, W.C. Cyclic fatigue and torsional resistance of two new nickel-titanium instruments used in reciprocation motion: Reciproc versus WaveOne. **Journal of Endodontics**, v.38, n.4 p. 541-4, 2012.

40. KOÇAK, S.; KOÇAK, M.M.; SAGLAM, B.C.; TÜRKER, S.A.; SAGSEN, B.; ER. Ö. Apical extrusion of debris using self-adjusting file, reciprocating single-file, and 2 rotary instrumentation systems. **Journal of Endodontics**, v. 39, p. 1278–80., 2013.

41. KVIST, T.; MOLANDER, A.; DAHLEN, G.; REIT, C. Microbiological evaluation of one-and two-visits endodontic treatment of teeth with apical periodontitis: a randomized, clinical trial. **Journal of Endodontics**, v.30, p.572-6, 2004.

42. MACHADO, M.E.; NABESHIMA, C.K.; LEONARDO, M.F.; REIS, F.A.; BRITTO, M.L.; CAI. S. Influence of reciprocating single- file and rotary

instrumentation on bacterial reduction on infected root canals. **International Endodontic Journal**, v. 46, p. 1083–7, 2013.

43. MADHUSUDHANA, K.; MATHEW, V.B.; REDDY, N.M.; Apical extrusion of debris and irrigants using hand and three rotary instrumentation systems - an in vitro study. **Contemporary Clinical Dentistry**, v.1, p. 234–6, 2010.

44. MARENDING, M.; PAQUÉ, F.; FISHER, J.; ZEHNDER, M. Impact of irrigant sequence mechanical properties of human root dentin. **Journal of Endodontics**, v. 33, p. 1325-8, 2007.

45. MARINHO, A.C.S.; MARTINHO, F.C.; GONÇALVES, L.M.; RABANG, H.R.C.; GOMES, B.P.F.A. Does the Reciproc file remove root canal bacteria and endotoxins as effectively as multifile rotary systems? **International Endodontic Journal**, v. 48, p. 542–548, 2015.

46. MARTINHO, F.C.; CHIESA, W.M.; MARINHO, A.C.; ZAIA, A.A.; FERRAZ, C.C.; ALMEIDA, J.F.; SOUZA-FILHO, F.J, GOMES, B.P. Clinical investigation of the efficacy of chemomechanical preparation with rotary nickel-titanium files for removal of endo- toxin from primarily infected root canals. **Journal of Endodontics**, v. 36, p. 1766–9, 2010.

47. NAIR, P.N.R.; HENRY, S.; CANO, V.; VERA J. 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, p.231-52, 2005.

48. NAKAMURA, V.L.; CANDEIRO, C.T.M.; CAI, S.; GAVINI, G. Ex vivo evaluation of three instrumentation techniques on *E. faecalis* biofilm within oval shaped root canals. **Brazilian Oral Research**, v. 29(1), p. 1-7, 2015.

49. ØRSTAVIK, D.; HAAPASALO, M.P.P. Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. **Endodontic Dental Traumatology**, v.6, p.142-9, 1990.

50. PAIVA, S.S.; SIQUEIRA, J.F. JR.; ROÇAS, I.N.; CARMO, F.L.; LEITE, D.C.; FERREIRA, D.C.; RACHID, C.T.; ROSADO, A.S. Clinical antimicrobial efficacy of NiTi rotary instrumentation with NaOCl irrigation, final rinse with chlorhexidine and interappointment medication: a molecular study. **International Endodontic Journal**, v.46, p. 225-33, 2013.

51. PAQUÉ, F.; LAIB, A.; GAUTSCHI, H.; ZEHNDER, M. Hard-tissue debris accumulation analysis by high-resolution computed tomography scans. **Journal of Endodontics**, v. 35, n. 7, p. 1044-1047, 2009.

52. PARANJPE, A.; GREGORIO, C.; GONZALEZ, A. M.; GOMEZ, A.; HERZOG, D. S.; PIÑA, A. A.; COHENCA, N. Efficacy of the Self-Adjusting File system on cleaning and shaping oval canals: a microbiological and

microscopic evaluation. **Journal of Endodontics**, v. 38, n. 2, p. 226-231, 2012.

53. PEREIRA, E. S.; PEIXOTO, I. F.; VIANA, A. C.; OLIVEIRA, II; GONZALEZ, B. M.; BUONO, V. T.; BAHIA, M. G. Physical and mechanical properties of a thermomechanically treated NiTi wire used in the manufacture of rotary endodontic instruments. **International Endodontic Journal**, v. 45, n. 5, p. 469-74, 2012.

54. PETERS, O. A.; LAIB, A.; GOHRING, T. N.; BARBAKOW, F. Changes in root canal geometry after preparation assessed by high-resolution computed tomography. **Journal of Endodontics**, v. 27, n. 1, p. 1-6, 2001.

55. PETERS, O. A. Current challenges and concepts in the preparation of root canal systems: a review. **Journal of Endodontics**, v. 30, n. 8, p. 559-567, 2004.

56. RICUCCI, D.; SIQUEIRA, J.F.JR. Anatomic and microbiologic challenges to achieving success with endodontic treatment: a case report. **Journal of Endodontics**, v.34, p.1249–1254, 2008.

57. SAFAVI K.E.; SPÅNGBERG, L.S.W.; LANGELAND, K. Root canal dentinal tubule disinfection. **Journal of Endodontics**, v.16, p. 207-10, 1990.

58. SHEN, Y.; ZHOU, H.; ZHENG, Y.; PENG, B.; HAAPASALO, M. Current challenges and concepts of the thermomechanical treatment of nickel-titanium instruments. **Journal of Endodontics**, v. 39, p. 163-172, 2013.

59. SIQUEIRA, J. F., JR.; ALVES, F. R.; ALMEIDA, B. M.; DE OLIVEIRA, J. C.; ROÇAS, I. N. Ability of chemomechanical preparation with either rotary instruments or self-adjusting file to disinfect oval-shaped root canals. **Journal of Endodontics**, v. 36, n. 11, p. 1860-1865, 2010.

60. SIQUEIRA, J.F.JR.; ALVES, F.R.; VERSIANI, M.A.; RÔÇAS, I.N.; ALMEIDA, B.M; NEVES, M.A.; SOUSA-NETO, M.D. Correlative bacteriologic and micro-computed tomographic analysis of mandibular molar mesial canals prepared by self-adjusting file, reciproc, and twisted file systems. **Journal of Endodontics**, v. 39, p.1044–50, 2013.

61. SOUZA, L.C.; BRITO, P.R.; DE OLIVEIRA, J.C.; ALVES, F.R.; MOREIRA, E.J.; SAMPAIO-FILHO, H.R.; RÔÇAS, I.N.; SIQUEIRA, J.F.JR. Photodynamic therapy with two different photosensitizers as a supplement to instrumentation/irrigation procedures in promoting intracanal reduction of *Enterococcus faecalis*. **Journal of Endodontics**, v. 36(2), p. 292-6, 2010.

62. SOUKOS, N.S.; CHEN, P.S.; MORRIS, J.T.; RUGGIERO, K.; ABERNETHY, A.D.; SOM, S.; FOSCHI, F.; DOUCETTE, S.; BAMMANN, L.L.; FONTANA, C.R.; DOUKAS, A.G.; STASHENKO, P.P. Photodynamic

therapy for endodontic disinfection. **Journal of Endodontics**, v. 32(10), p.979-84, 2006.

63. SOUZA, L.C.; BRITO, P.R.; DE OLIVEIRA, J.C.; ALVES, F.R.; MOREIRA, E.J.; SAMPAIO-FILHO, H.R.; RÔÇAS, I.N.; SIQUEIRA, J.F.JR. Photodynamic therapy with two different photosensitizers as a supplement to instrumentation/irrigation procedures in promoting intracanal reduction of *Enterococcus faecalis*. **Journal of Endodontics**, v. 36(2), p. 292-6, 2010.

64. STUART, C.H.; SCHWARTZ, S.A.; BEESON, T.J.; OWATZ C.B. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. **Journal of Endodontics**, v. 32(2), p. 93-8, 2006.

65. SUNDQVIST, G.; FIGDOR, D.; PERSSON, S.; SJÖGREN, U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re- treatment. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 85, p. 86- 93,1998.

66. VARISE, T.G.; ESTRELA, C.; GUEDES D.F.; SOUSA-NETO, M.D.; PÉCORÁ, J.D. Detection of organochlorine compounds formed during the contact of sodium hypochlorite with dentin and dental pulp. **Brazilian Dental Journal**, v. 25, n. 2, p.109-16, 2014.

67. VERSIANI, M.A.; LEONI, G.B.; STEIER, L.; DE-DEUS, G.; TASSANI, S.; PÉCORÁ, J.D.; DE SOUSA-NETO, M,D. Micro-computed tomography study of oval-shaped canals prepared with the Self-adjusting File, Reciproc, WaveOne, and ProTaper universal systems. **Journal of Endodontics**, v. 39, p.1060-6, 2013.

68. VERSIANI, M. A.; PÉCORÁ, J. D.; SOUSA-NETO, M. D. Flat-oval root canal preparation with self-adjusting file instrument: a micro-computed tomography study. **Journal of Endodontics**, v. 37, n. 7, p. 1002-1007, 2011.

69. WILSON, M. Susceptibility of oral bacterial biofilms to antimicrobial agents. **Journal of Medical Microbiology**, v. 44(2), p.79-87, 1999.

70. WU, M.K.; BARKIS, D.; RORIS, A.; WESSELINK, P.R. Does the first file to bind correspond to the diameter of the canal in the apical region? **International Endodontic Journal**, v. 35(3), p. 264-7, 2002.

71. YARED, G. Canal preparation using only one Ni-Ti rotary instrument: preliminary observations. **International Endodontic Journal**, v. 41, n. 4, p. 339-344, 2008.

72. YE, J.; GAO, Y. Metallurgical Characterization of M-wire nickel-titanium shape memory alloy used for endodontic rotary instruments during low-cycle fatigue. **Journal of Endodontics**, v. 38, n. 1, p. 105-107, 2012.

73. ZANDIM, D.L.; CORRÊA, F.O.B.; SAMPAIO, J.E.C.; ROSSA JÚNIOR, C. The influence of vinegars on exposure of dentinal tubules. **Brazilian Oral Research**, v. 18, p.63-8, 2004.
74. ZUOLO, A.S.; MELLO, J.E.JR.; CUNHA, R.S.; ZUOLO, M.L.; BUENO, C.E.S. Efficacy of reciprocating and rotary techniques for removing filling material during root canal retreatment. **International Endodontic Journal**, v. 46, p. 947–953, 2013.
75. ZEHNDER, M. Root canal irrigants. **Journal of Endodontics**, v.32(5), p.389-98, 2006.

## **ANEXO**

---

### **Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética**

## **PUBLICAÇÃO**

---

### **Sanitizing potential root canals infected with reciprocating instruments associated with sodium hypochlorite 2.5% and apple vinegar**

Helder Fernandes de Oliveira<sup>1</sup>, Ana Helena Gonçalves de Alencar<sup>1</sup>, Daniel de Almeida Decurcio<sup>1</sup>, Julio Almeida Silva<sup>1</sup>, Jesus Djalma Pecora<sup>1</sup>, Carlos Estrela<sup>1</sup>

Department of Stomatologic Sciences, School of Dentistry, UFG - Federal University of Goiás, Goiânia, GO, Brazil

Correspondence: Prof. Dr. Carlos Estrela, Praça Universitária s/n, Setor Universitário, 74605-220, Goiânia, GO, Brasil. Tel: +55-62-3209-6254. e-mail: estrela3@terra.com.br



**Sanitizing potential root canals infected with reciprocating instruments associated with sodium hypochlorite 2.5% and apple vinegar**

*Short title:* **Sanitizing potential root canals infected**

## SUMMARY

Evaluate the antibacterial effect of reciprocating systems associated with sodium hypochlorite 2.5% and apple vinegar in infected root canals. Fifty human anterior teeth uniradicular were prepared, inoculated with *E. faecalis* and examined after sixty days. The teeth were randomly assigned to five groups: (1. WaveOne<sup>®</sup> 40.08; 2. Reciproc<sup>®</sup> 40.06; 3. Unicorne<sup>®</sup> 40.06; 4 and 5 positive and negative controls. For each experimental group (n = 10), five specimens were irrigated with sodium hypochlorite 2.5%, and five with apple vinegar. Bacterial growth was analyzed using turbidity of culture medium followed by UV spectrophotometry. The cleaning of dentinal walls was analyzed by scanning electronic microscopy (SEM). All groups showed a significant reduction of the optical density of the culture medium after the root canal preparation (p<0,05). No sanitizing strategy promoted the complete elimination of *E. faecalis*. In the analysis of cleaning the root surface, it was found that in none of the groups showed complete removal of debris, not being verified significant differences indifferent to analyzed thirds (p> 0.05). The reciprocating instruments (WaveOne<sup>®</sup>, Reciproc<sup>®</sup> and Unicorne<sup>®</sup>) and irrigating sodium hypochlorite solution 2.5% and apple cider vinegar have not been effective in eliminating *E. faecalis* complete in infected root canals.

**Key words:** root canal preparation, *E. faecalis*, biofilms, scanning electron microscopy.

## **Introduction**

Reducing the microbiota of the infected root canal system is essential to successful endodontic treatment. The adequate preparation of the root canal associated to the action of antimicrobial agents (irrigating solutions and intracanal medication) plays a fundamental role in the decontamination process (1).

Failures of endodontic treatment have been associated with anatomical complexity. The presence of bacteria in regions of isthmuses, recesses, ramifications, or oval, flat or curved channels hinders the antibacterial action of endodontic instruments and the penetration of the irrigating solution (2-7).

The development of nickel-titanium rotary instruments allowed an expressive advance in root canal modeling, allowing more centralized preparation, maintaining the original canal configuration and with less extrusion of debris to the apical region (8-9).

Current technology for root canal preparation plays an important role in modeling and new challenges in the perfect sanitizing process. Studies using computerized microtomography have shown that some areas remain untouched during the preparation of the root canal. These areas can maintain the bacterial biofilm intact and as they did not have the action of the instrument serve as a potential cause of persistent infection (10-16).

It is essential to highlight the role of irrigation solutions in cleaning and sanitizing these areas. In this sense, sodium hypochlorite represents the substance well studied and employed by professionals (17). However, although it presents an efficient cleaning and disinfection, its interaction with the dentin can lead to the loss in the immunoreactivity of the type I collagen, leading to the compromise of its structure (18). Varise et al. (2014) showed that highly neurotoxic organochlorine compounds are generated during the contact of sodium hypochlorite with dentin and pulp. Thus, other irrigation solutions, such as apple cider vinegar, have been studied as an alternative to hypochlorite. Apple cider vinegar as an auxiliary solution in the chemical-mechanical preparation of root canals has also been investigated and deserves special attention because of the promising results obtained when compared to other traditional irrigators such as sodium hypochlorite and EDTA (20). Its bactericidal action against the microbiota of the root canal, together with its good

smear layer removal capacity, makes it an important alternative for use as an endodontic irrigator (21-24).

Continuous-motion nickel-titanium rotary instruments have shown significant bacterial reductions, but to date the evidence has indicated that no instrument or technique was able to act on any surface area of the dentin walls during the preparation and to make the channel systems, and the effects of the enzymatic activity on the microorganisms (25-29).

Yared et al. (2008), based on the concepts of Roane's balanced forces, proposed a concept for root canal instrumentation with a single instrument capable of promoting root canal modeling. Several reciprocating systems have been launched, such as WaveOne (Dentsply Maillefer, Baillagues, Switzerland), Reciproc (VDW GmbH, Munich, Germany), TF Adaptive (Axis / SybronEndo, Orange, CA, USA) and Unicone (Medin, Nove Mesto na Morave , Czech Republic) with the aim of reducing the time of endodontic treatment and minimizing risks of instrument fracture and fatigue. These instruments are manufactured with the M-Wire alloy, which is developed by a special heat treatment process, and which presents greater flexibility and resistance to cyclic fatigue than the conventional NiTi alloy (31-33).

The reciprocating instruments have been tested using different methodologies for root canal modeling, debris removal, debris apical extrusion, resistance to cyclic fatigue, cleaning effectiveness and bacterial reduction/elimination (34-38).

However, in spite of the promising results of different sanitation strategies and preparation of the root canals with automated instruments, as regards the decontamination process, it is important to develop comparative studies between irrigation solutions and new reciprocating instruments. The aim of this study was to evaluate the antibacterial effect of reciprocating systems associated with sodium hypochlorite 2.5% and apple vinegar in infected root canals.

## **Material and Methods**

### *Preparation of the samples*

Unirradicular human teeth, extracted for different reasons, from the emergency department of the Faculty of Dentistry of the Federal University of Goiás (FO / UFG) were used in the present study. The extracted teeth were conditioned in a vial containing 0.2% thymol solution and then immersed in 5% sodium hypochlorite (Fitofarma, Lt. 20442, Goiânia, GO, Brazil) for the removal of organic tissues for 30 minutes. Periapical radiographs of the teeth were performed in the vestibulo-lingual and proximal-proximal directions, using radiographic film (Eastman Kodak Comp., USA) to confirm the presence of single root canal and root apex closure, and absence of previous endodontic treatment, obliterations Of the root canal, internal and/or external root resorption, and cracks and fractures. The sample consisted of fifty teeth, which were prepared with standard access cavities and root canal patency achieved with K-flex type n.15 file (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Switzerland), as evidenced by the direct visualization of the tip of the file in the apical foramen.

After the initial opening and emptying procedure, the crowns were sectioned with an Endo-Z multilayer drill (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Switzerland) in high rotation, at a 90 ° angle to the long axis of the tooth. The root lengths were standardized at 16 mm using a calibrated digital caliper of 0.01 mm (Fowler / Sylvac Ultra-Cal Mark IV Electronic Caliper, Crissier, Switzerland), measured from the root apex. Next, the specimens were autoclaved for 30 minutes at 120 ° C.

### *Experimental design*

The specimens were mounted on a platform so as to allow inoculation of the biological marker. The coronary portion of the root canal of each specimen was connected to a 1.5mL polypropylene Eppendorf tube (Cral, São Paulo, SP, Brazil), which had the fund removed to adapt the cervical portion of the root. A cyanoacrylate adhesive (Super Bonder, Itapevi, SP, Brazil) was used to seal the connection, which was still entirely covered with two layers of nail polish (Max Factor, Cosmetics and Fragrances, London, UK) to prevent infiltration.

The sets, specimens coupled with Eppendorf tubes, were packed in 5% sodium hypochlorite for 30 minutes. Subsequently, each set was coupled to a 20mL, perforated cap containing 10mL culture medium (BHI; Difco Laboratories, Detroit,

MI, USA) so that the apical portion of the specimen remained submerged throughout the contamination period. To assure infection control, the test apparatus was incubated at 37 ° C for 24 hours. After this period of time, no bacterial growth was observed.

A reference strain of *E. faecalis* (ATCC 29212) obtained from the American Type Culture Collection was used for biofilm formation. The bacterial strain was inoculated into 7 ml heart brain infusion (BHI; Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) and incubated at 37 ° C for 24 hours.

Twenty-four hours prior to inoculation of the specimens, the bacteria were again cultured on the surface of the BHI agar following the same incubation conditions. The bacterial inoculum was obtained by resuspending the cells in saline at a final concentration of approximately  $3 \times 10^8$  cells mL<sup>-1</sup>, adjusted for the standard McFarland turbidity standard 1 spectrophotometer.

For contamination of the samples, 5 mL of the sterilized BHI were mixed with 5 mL of the bacterial suspension, and the experimental (n = 30) and positive control (n = 10) groups were inoculated with *E. faecalis* for 60 days using sterilized syringes with Sufficient volume to fill the root canal. This procedure was repeated every 72 hours, always using pure culture with 24 hours of preparation and adjusted to standard 1 of McFarland. The specimens were kept in a microbiological oven at 37°C.

After the biofilm formation period, the root canals were dried and filled with distilled water. Sterile paper tips n. 40 (Tanari, Tanariman Indústria Ltda., Manacaru, AM, Brazil) were introduced into the root canal and maintained for 3 minutes for microbiological collection. Each sample was collected using three paper tips which were subsequently immersed in 7 mL of BHI added with neutralizing Tween 80 and sodium thiosulfate (PA, Lab Art, Campinas, SP, Brazil) at appropriate concentrations, followed by incubation at 37°C For 48 hours. After bacterial growth was verified, the specimens were removed from the platform and the experimental groups were prepared.

The specimens were randomly divided into five groups (n = 10), three being experimental and two control groups. Group 1. WaveOne®: introduced into the root canal by reciprocating movement with the instrument of diameter 40.08 (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Switzerland); Group 2. Reciproc®: introduced into the root canal by reciprocating movement with the 40.06 diameter instrument (VDW Silver,

Munich, Germany); Group 3. Unicone®: introduced into the root canal by reciprocating movement with instrument L25 of diameter 40.06 (Medin, Nove Mesto in Morave, Czech Republic); Group 4. Positive control; Group 5. Negative control.

For each experimental group (n = 10), five specimens were irrigated with 2.5% sodium hypochlorite (Fitofarma, Goiânia, GO, Brazil) and five specimens with apple vinegar (Castelo, Castelo Alimentos, Jundiaí, . Conventional irrigation was performed with Ultradent 5mL syringe and Navitip irrigation cannula (Ultradent Products Inc. 505 West 10200, South, South Jordan, UT 84095) with a diameter of 0.30mm positioned at 12mm. The mechanical drive of the WaveOne®, Reciproc® and Unicone® instruments was performed with the X-SMART™ Plus electric motor (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Switzerland). After root canal preparation, each specimen was dried with absorbent paper tip n.40 sterilized. The channel was filled with 3 mL of 17% EDTA, kept under stirring with manual file for 3 minutes. The positive control group was used to verify bacterial and negative viability to evaluate the sterility of the samples. Thus, during a period of 60 days of root canal contamination, ten uncontaminated specimens were allowed to incubate at 37°C as an aseptic control and ten were contaminated with *E. faecalis* under atmospheric conditions similar to those described previously.

After the irrigation process in each group, additional irrigation with 5 mL sterile distilled water was performed with a syringe. The root canals were dried and filled with sterile distilled water and dried in a manner similar to that described above. Each sample was collected using three paper tips. The tips were immersed in a test tube containing 7 mL of Letheen Broth (LB; Difco Laboratories), added with neutralizers [Letheen, Tween 80 and sodium thiosulfate (PA, Lab Art, Campinas, SP, Brazil)] at appropriate concentrations, followed by incubation at 37°C for 48 hours in a reduced oxygen atmosphere.

After preparation of the root canal, the bacterial growth was analyzed by the turbidity of the culture medium, being determined the presence or absence of bacteria, and using spectrophotometer UV (Spectrophotometer Model Nova 1600 UV, Piracicaba, SP, Brazil). After the microbiological collections, the tubes containing the paper cones immersed in culture media were transported aseptically to a microbiological oven at 37 °C and remained for 48 hours. After this time, all media were peeled in new tubes containing 7mL Letheen broth (Letheen Broth; Difco Laboratories, Detroit, MI, USA). These media were stored in the same manner as

described above. Next, the samples were prepared for analysis by scanning electron microscopy. All collections were performed under aseptic conditions.

### *Scanning Electron Microscopy*

Longitudinal grooves were made along the entire root length of the ten specimens of each group, and the sectioning was done in a laminar flow hood with a spatula n. 24 and a sterile surgical hammer.

The fragments were fixed in buffered formalin solution for one week. Then, dehydration was carried out in a solution of 70%, 95% and 99.5% ethanol, with two exchanges per solution, totaling 30 minutes in each solution. Drying was done at critical point (AutoSamdri-815, Tousimis Research Corporation, Rockville, Maryland, USA). The metallographic preparation of the teeth was done for analysis in the Scanning Electron Microscope (MEV, JED, JSM, 6360LV, Tokyo, Japan) with magnification 1600 times to observe the presence of debris on the dentin surface (Labimic, Faculty of Physics, UFG , Goiânia, GO, Brazil). The root was measured and divided equally within the cervical, middle and apical thirds, which were evaluated separately.

Three level observers analyzed the images for evaluation of the absence and presence of debris on the dentinal surface of the root according to the third, cervical, middle and apical, using the following classifications: Score 1. Surface of root dentin with absence of debris; Score 2. Surface of root dentin with few areas covered by debris and many visible tubules; Score 3. Surface of root dentin with many areas covered by debris and few visible tubules; Score 4. Surface of radicular dentine completely covered by debris (Figure 1).



## Results

Table 1 presents the results of the bacterial reduction after the sanification strategies, using the reciprocating instruments WaveOne<sup>®</sup>, Reciproc<sup>®</sup> and Unicone<sup>®</sup> associated to the irrigating solutions 2.5% sodium hypochlorite and apple vinegar, when evaluated by means of spectrophotometry. Although all groups showed a significant reduction in the optical density of the culture medium after root canal preparation ( $p < 0.05$ ), no strategy promoted the complete elimination of *E. faecalis*.

The means and standard deviations of the percentage of bacterial reduction according to the sanitization strategy used are shown in Table 2. In all groups tested the association with 2.5% sodium hypochlorite promoted greater bacterial reduction than with vinegar of ( $P < 0.001$ ) were observed. The Reciproc<sup>®</sup> instrument associated to the irrigant sodium hypochlorite 2.5% promoted the highest percentage of bacterial reduction, while the Reciproc<sup>®</sup> association with apple vinegar was the one that presented the lowest (Figure 2).

The percentages of bacterial reduction after root canal preparation with the WaveOne<sup>®</sup>, Reciproc<sup>®</sup> and Unicone<sup>®</sup> systems associated with 2.5% sodium hypochlorite were 96.95%, 99.51%, and 78.43%, respectively, however, no statistically significant differences were found between groups.

After analysis of root surface cleaning, SEM images showed that in all groups there was complete removal of debris (Score 1).

Table 3 presents the absolute frequency of classification by scores, according to the absence and presence of debris on the dentin surface, evaluated by thirds, according to the reciprocal system employed. The results showed that the Reciproc<sup>®</sup> group presented the highest number of surfaces with score 2 (18/30), followed by Unicone<sup>®</sup> (14/30) and WaveOne<sup>®</sup> (12/30). When the absolute frequency of classification by scores according to the irrigating solution used was considered (Table 4), the apple vinegar group had the highest number of surfaces with score 2 (26/45). The comparison between the average positions and the absolute frequency of the scores revealed no significant differences between the groups ( $p > 0.05$ ), considering both the reciprocal system ( $n = 30$ ) and the irrigation solution ( $n = 45$ ).

## Discussion

The action of the reciprocating systems in conjunction with irrigating solutions (2.5% sodium hypochlorite and apple vinegar) in infected root canals promoted bacterial reduction. One of the determining factors of endodontic failure is the post-treatment maintenance of the infection in the root canal system, whose sanitization process involves the mechanical action with the power to disaggregate the biofilm and the physicochemical effects of the irrigating substances in order to reach and eliminate the microbiota present (37-38).

The organization of microorganisms in biofilms greatly increases the resistance of these pathogens to endodontic therapeutic procedures. *E. faecalis* is present in high prevalence in cases of persistent endodontic infection, being able to structure itself in biofilm, to deep invade the dentin tubules and to survive in microenvironments of scarce nutrients (42,46,74,75).

The period of contamination and biological indicator used in the present study was 60 days, a period sufficient for *E. faecalis* to colonize and promote an invasion of the dentin tubules and structure a mature biofilm. This model was used in a previous study (43) to evaluate antimicrobial strategies with a time of bacterial colonization satisfactory to virulence and adhesion properties. Other studies have employed smaller periods in the formation of biofilms, which makes it difficult to compare and extrapolate the results to the establishment of clinical protocols (44-47,72,73).

The method used for bacterial collections before and after preparation of the root canal to verify the bacterial growth or reduction in *E. faecalis* infected root canals by means of paper cones packed in culture medium is a standard method widely used for this type of analysis (42,43,48,49).

The biological indicator used as a reference, *E. faecalis* was used in several previous studies (11,42,49-54), being considered important bacterium in the conditions of persistence of periapical lesions after endodontic treatment (1,55). It is an optional gram-positive cocoon that tolerates low nutrient and oxygen conditions and high pH (6,26,40,55,56).

Several rotating NiTi instruments have been incorporated into endodontics in order to reduce the prevalence of iatrogenies and to improve the root canal system cleaning process (8). The proposal of the reciprocal movement and preparation with

a single instrument proposed by Yared (2008), conjugated to the M-Wire alloy with surface heat treatment have allowed greater flexibility and fracture resistance when compared to conventional nickel-titanium alloys. Thus, different methodological strategies have been continuously tested to evaluate the efficacy of these reciprocating instruments in the preservation of original root canal geometry, reduction of apical debris, removal of the obturator material, resistance to cyclic fatigue, as well as their performance in the process cleaning and bacterial reduction (32-35, 57-60). However, the simplification of the preparation by means of a single instrument raises concerns about the effectiveness in promoting an adequate disinfection of the root canal system (42).

The results of the present study showed bacterial reduction after preparation of the root canals with the respective reciprocating systems WaveOne<sup>®</sup>, Reciproc<sup>®</sup> and Unicone<sup>®</sup> associated with irrigating solutions of 2.5% sodium hypochlorite and apple vinegar. These findings are consistent with previous studies that used similar methodologies (7,42,61).

In the infected root canals by *E. faecalis*, Dagna et al. (2012) evaluated the antibacterial efficacy using NiTi (MTwo, Revo-S, and One Shape) and reciprocating (Reciproc) rotary instruments under irrigation with sodium hypochlorite 5% and EDTA 17%. All the techniques were efficient in the bacterial reduction, the Reciproc single use instruments being as efficient as the conventional rotary system. Nakamura *et al.* (2015) verified the effectiveness of three instrumentation techniques, manual (K-file), continuous rotatory (MTwo), and Reciproc associated with 2.5% sodium hypochlorite in oval root canals infected with *E. faecalis*. All techniques reduced the number of microorganisms and Reciproc reciprocating instrumentation was effective in reducing biofilm with *E. faecalis*. Machado *et al.* (2013) evaluated the influence of reciprocating instrumentation with single instrument (WaveOne, Reciproc) and continuous rotatory (ProTaper, MTwo) and manual instrumentation on bacterial reduction in root canals infected with *E. faecalis*. The bacterial samples were collected immediately and 7 days after instrumentation. The bacterial count was significantly reduced after instrumentation in all the analyzed groups, with no difference in the reduction between reciprocal techniques, continuous rotatory and manual instrumentation.

Alves *et al.*, (2012) analyzed by the qPCR method and microbiological culture, the antibacterial effect in oval channels comparing the technique of the single

instrument Reciproc<sup>®</sup> associated with 2.5% sodium hypochlorite, with the conventional rotary technique with BioRace instruments associated with 2.5% sodium hypochlorite. Both techniques promoted bacterial reduction, with no differences between the instrumentation systems.

In view of the need to overcome the difficulties and barriers of microbial resistance, different experimental models of biofilm have been described. Experiments *in vivo*, *ex vivo*, *in vivo* dog teeth, bovine teeth *ex vivo*, and biofilm model in membrane filters have been tested in order to analyze the behavior and effectiveness of different irrigating solutions and instruments for the disinfection (43,48,50,51,62,63). The susceptibility of the bacterial biofilm to the different strategies of sanitization and modeling indicates the need to reproduce the *in vivo* conditions, where the bacteria can grow and structure on the surface of the root dentin (64).

Although the preparation of the root canals made by the different WaveOne<sup>®</sup>, Reciproc<sup>®</sup> and Unicone<sup>®</sup> reciprocating systems was performed by only one instrument with diameter 40.08, 40.06 and 40.06 respectively, the results showed that they were not different from other techniques tested (7,9,13,14,16,25,26,27,33,35,42). This may be due to the final enlargement of the apical portion to a diameter of 400  $\mu$ m achieved in the experimental groups. Thus, it should be considered that the efficacy of the sanitization process of the root canal system is directly associated to the correct determination of the working length and also the degree of enlargement of the apical portion. In this way, extending the critical apical zone to biological diameters capable of optimizing the effectiveness of the auxiliary chemical and intracanal medication becomes essential (65,66). Methods such as the computerized microtomography used to evaluate the action of endodontic instruments on the walls of the root canal reveals that extensive areas may not be touched during preparation by the endodontic instrument, which corroborates the importance of irrigation in the cleaning and sanitization of these areas (11-13,52). Untreated surfaces can be disinfected by the action of irrigating solutions, which may explain the absence of differences between the three groups in the present study.

The selection of an ideal irrigant depends on its action against the microbiota of the root canals and the biological effect on the periapical tissues. Several irrigating solutions have been advocated in order to reduce endodontic infection and contribute to disinfection of the root canal (17,21,40).

Sodium hypochlorite is a solution widely used in the endodontic sanitation process, as it presents fundamental properties such as a broad spectrum of action, antimicrobial effect (against spores and viruses) and the dissolution capacity of organic matter that is directly influenced by the increase of its concentration (17,23,67,68).

However, this dissolving power of organic matter is not selective, which means that especially at high concentrations this agent can dissolve both vital and necrotic remnants indistinctly, in addition to having high toxicity to the periapical tissues in cases of inadvertent extrusion. Studies have been carried out in order to find other alternatives of an endodontic irrigator that presents better biocompatibility than NaOCl maintaining the properties of tissue dissolution and high antibacterial power (18,19,23,69).

Different irrigators such as EDTA, citric acid, maleic acid and apple cider vinegar have been used to remove the smear layer during endodontic treatment. The apple vinegar constitutes an alternative irrigating solution auxiliary in the mechanical chemical preparation of the root canals. Its physicochemical properties and efficacy in the sanitization process have been investigated in different studies (20,21,70,71). The presence of maleic acid in its composition gives to apple vinegar an important characteristic of tissue tolerance, since this is one of the acids responsible for the production of energy in the cells. In addition, apple cider vinegar has a remarkable medicinal potential due to its high mineral content (sodium, potassium, phosphorus, magnesium, sulfur, calcium and silicon) and other elements such as pectin, beta carotene, enzymes and amino acids that attack free radicals contributing to the immune system and the periapical repair process (20,48). It also shows good ability to remove smear layer from the entrance of dentinal tubules with bactericidal action against microorganisms that are frequently associated with endodontic infections such as *S. aureus* and *E. faecalis* (21).

Regarding sanitization strategies, 2.5% sodium hypochlorite solution proved to be more effective than apple vinegar in bacterial reduction in infected dentin. These findings are consistent with previous studies (20,22).

In the analysis of the cleaning of the dentin walls after the use of irrigating solutions and reciprocating systems, scanning electron microscopy images showed that the walls of the different thirds of the root canal had small amounts of dirt. Data analysis revealed no statistical differences between the groups, irrespective of the

irrigating solution and the reciprocating instrument, or their combination. These results were also found considering the root thirds separately ( $p>0.05$ ). The bacteriological evaluation in culture medium allowed to verify a numerical estimate of the quantity of bacteria by correspondence with the McFarland turbidity scale, which confers quantitative value and eliminates the subjectivity of the visual analysis (54).

The data obtained from the bacterial count should be interpreted with caution, since the bacterial collection occurs only in the main channel, which allows the detection only of the planktonic bacteria, not reaching those located in the irregularities of the root canal and deep parts of the tubules dentin (42,56,53).

The challenges to be overcome with a view to the success of endodontic treatment include the domain of the internal anatomy of the root canal, control of the endodontic microbiota, positive participation of the individual's immune responses, and professional knowledge and skills (40).

To date, the perfect sanitization of the infected root canal system remains a real challenge since it has not been achieved by any instrumentation technique or irrigation protocol. Just as the minimal bacterial volume remaining within the root canal, necessary to promote the repair of periapical tissues or to maintain their health, is still unknown. Further studies with other methodologies, additional clinical trials should be constantly performed in order to evaluate the effects of instrumentation techniques and irrigation protocols against endodontic infection.

According to the methodology used, it can conclude that: The reciprocating systems (WaveOne<sup>®</sup>, Reciproc<sup>®</sup> and Unicone<sup>®</sup>) and the irrigating solutions 2.5% sodium hypochlorite and apple vinegar were not completely eliminated from *E. faecalis* in infected root canals. Sodium hypochlorite 2.5% showed to be more effective in the bacterial reduction of the root canals than with apple vinegar. The WaveOne<sup>®</sup>, Reciproc<sup>®</sup> and Unicone<sup>®</sup> reciprocating systems associated with 2.5% sodium hypochlorite showed no differences in antibacterial potential. None of the reciprocating systems associated with 2.5% sodium hypochlorite or apple vinegar promoted the complete removal of the debris from the root surface evaluated by MEV.

## REFERENCES

1. Nair PNR, Henry S, Cano V, Vera J. 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* 2005;99:231-252.
2. Peters OA, Laib A, Göhring TN, Barbakow F. Changes in root canal geometry after preparation assessed by high-resolution computed tomography. *J Endod* 2001;27:1-6.
3. Gluskin AH. Anatomy of an overfill: a reflection on the process. *Endod Topics* 2007; 16:64-81.
4. Ricucci D, Siqueira JF Jr. Anatomic and Microbiologic Challenges to Achieving Success with Endodontic Treatment: A Case Report. *J Endod* 2008; 34:1249–1254.
5. Madhusudhana K, Mathew VB, Reddy NM. Apical extrusion of debris and irrigants using hand and three rotary instrumentation systems - an in vitro study. *Contemp Clin Dent* 2010; 1:234–6.
6. Alves FR, Roças IN, Almeida BM, et al. Quantitative molecular and culture analyses of bacterial elimination in oval-shaped root canals by a single-file instrumentation technique. *Int Endod J* 2012; 45:871–7.
7. Machado ME, Nabeshima CK, Leonardo MF, et al. Influence of reciprocating single- file and rotary instrumentation on bacterial reduction on infected root canals. *Int Endod J* 2013; 46:1083–7.
8. Peters OA. Current challenges and concepts in the preparation of root canal systems: a review. *J Endod* 2004; 30:559–67.
9. Hulsmann M, Peters OA, Dummer PMH. Mechanical preparation of root canals: shaping goals, techniques and means. *Endod Topics* 2005; 10:30–76.
10. Paque F, Laib A, Gautschi H, Zehnder M. Hard-tissue debris accumulation analysis by high-resolution computed tomography scans. *J Endod* 2009; 35:1044–7.

11. Haapasalo M, Shen Y, Qian W, Gao Y. Irrigation in endodontics. *Dent Clin North Am* 2010; 54:291-312.
12. Versiani MA, Pecora JD, De Sousa-Neto MD. Flat-oval root canal preparation with self-adjusting file instrument: A micro-computed tomography study. *J Endod* 2011; 37:1002-7.
13. Versiani MA, Leoni GB, Steier L, De-Deus G, Tassani S, Pécora JD, De Sousa-Neto MD. Micro-computed tomography study of oval-shaped canals prepared with the Self-adjusting File, Reciproc, WaveOne, and ProTaper Universal Systems. *J Endod* 2013; 39:1060-6.
14. De-Deus G, Souza EM, Barino B, Maia J, Zamolyi RQ, Reis C. The self-adjusting file optimizes debridement quality in oval-shaped root canals. *J Endod* 2011; 37:701-5.
15. Alves FR, Almedina BM, Neves MA, Rôças IN, Siqueira-Jr JF. Time dependent antibacterial effects of the self-adjusting file used with two sodium hypochlorite concentrations. *J Endod* 2011; 37:1451-5.
16. Siqueira JF Jr, Alves FR, Almeida BM, De Oliveira JC, Rôças IN. Ability of chemomechanical preparation with either rotary instruments or self-adjusting file to disinfect oval-shaped root canals. *J Endod* 2010; 36:1860-5.
17. Estrela C, Estrela CR, Barbin EL, Spano JC, Marchesan MA, Pecora JD. Mechanism of action of sodium hypochlorite. *Braz. Dent. J* 2002; 13(2): 113-7.
18. Haapasalo M, Qian W, Portenier I, Waltimo T. Effects of dentin on the antimicrobial properties of endodontic medicaments. *Endod J.* 2007; 33 (8):917-25.
19. Varise TG, Estrela C, Guedes DF, Sousa-Neto MD, Pécora JD. Detection of organochlorine compounds formed during the contact of sodium hypochlorite with dentin and dental pulp. *Braz Dent J.* 2014;25(2):109-16.



20. Estrela C, Holland R, Bernabé PFE, Souza V, Estrela CRA. Antimicrobial potential of medicaments used in healing process in dogs' teeth with apical periodontitis. *Brazilian Dental Journal*, v. 15(3), p.181-18, 2004.
21. Estrela C, Lopes HP, Elias CN, Leles CR, Pécora JD. Cleanliness of the surface of the root canal of apple vinegar, sodium hypochlorite, chlorhexidine and EDTA. *Rev Assoc Paul Cir Dent*. 2007;61:177-82.
22. Siqueira Jr JF, Alves FR, Almeida BM, Oliveira JCM, Rôças IN. Ability of chemomechanical preparation with either rotary instruments or self-adjusting file to disinfect oval-shaped root canals. *J Endod*. 2010 Nov;36(11):1860–5
23. Dornelles-Morgental R, Tanomaru JMG, Faria-Júnior NB, Duarte MAH, Kuga MC, Tanomaru-Filho M. Antibacterial efficacy of endodontic irrigating solutions and their combinations in root canals contaminated with *Enterococcus faecalis*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2011;112:396-400.
24. Candeiro GT, Matos IB, Costa CF, Fonteles CS, Vale MS. A comparative scanning electron microscopy evaluation of smear layer removal with apple vinegar and sodium hypochlorite associated with EDTA. *J Appl Oral Sci*. 2011;19(6):639-43.
25. Martinho FC, Chiesa WM, Marinho AC, et al. Clinical investigation of the efficacy of chemomechanical preparation with rotary nickel-titanium files for removal of endo- toxin from primarily infected root canals. *J Endod* 2010; 36:1766–9.
26. Paranjpe A, de Gregorio C, Gonzalez AM, et al. Efficacy of the self-adjusting file system on cleaning and shaping oval canals: a microbiological and microscopic evaluation. *J Endod* 2012; 38:226–31.
27. Machado ME, Nabeshima CK, Leonardo MF, et al. Influence of reciprocating single- file and rotary instrumentation on bacterial reduction on infected root canals. *Int Endod J* 2013; 46:1083–7.
28. Siqueira JF Jr, Alves FR, Versiani MA, et al. Correlative bacteriologic and micro- computed tomographic analysis of mandibular molar mesial canals prepared by self-adjusting file, reciproc, and twisted file systems. *J Endod* 2013; 39: 1044–50.

29. Paiva SS, Siqueira JF Jr, Roças IN, Carmo FL, Leite DC, Ferreira DC, Rachid CT, Rosado AS. Clinical antimicrobial efficacy of NiTi rotary instrumentation with NaOCl irrigation, final rinse with chlorhexidine and interappointment medication: a molecular study. *Int Endod J* 2013; 46:225-33.
30. Yared G. Canal preparation using only one Ni-Ti rotary instrument: preliminary observations. *Int Endod J* 2008; 41:339-344.
31. Kim HC, Kwak SW, Cheung GSP, Ko DH, Chung SM, Lee WC. Cyclic fatigue and torsional resistance of two new nickel-titanium instruments used in reciprocation motion: Reciproc versus WaveOne. *J Endod* 2012; 38(4): 541-4.
32. Pereira ES, Peixoto IF, Viana AC, Oliveira II; Gonzalez, BM, Buono V T, Bahia MG. Physical and mechanical properties of a thermomechanically treated NiTi wire used in the manufacture of rotary endodontic instruments. *Int Endod J* 2012; 45(5): 469-74.
33. Ye J, & Gao Y. Metallurgical Characterization of M-Wire Nickel-Titanium Shape Memory Alloy Used for Endodontic Rotary Instruments during Low-cycle Fatigue. *J Endod.* 2012 Jan; 38(1): 105-7.
34. Arias A, Perez-Higueras JJ, de la Macorra JC. Differences in cyclic fatigue resistance at apical and coronal levels of Reciproc and WaveOne new files. *J Endod* 2012; 38:1244–8.
35. Burklein S, Schafer E. Apically extruded debris with reciprocating single-file and full-sequence rotary instrumentation systems. *J Endod* 2012; 38:850–2.
36. Berutti E, Chiandussi G, Paolino DS, et al. Canal shaping with WaveOne Primary reciprocating files and ProTaper system: a comparative study. *J Endod* 2012; 38: 505–9.
37. Dietrich MA, Kirkpatrick TC, Yaccino JM. In vitro canal and isthmus debris removal of the self-adjusting file, K3, and WaveOne files in the mesial root of human mandib- ular molars. *J Endod* 2012; 38:1140–4.
38. Castelló-Escrivá R, Alegre-Domingo T, Faus-Matoses V, Román-Richon S,

Faus-Llácer VJ. In vitro comparison of cyclic fatigue resistance of ProTaper, WaveOne, and Twisted Files. *J Endod* 2012; 38: 1521–4.

39. Ferrer-Luque CM, Bejarano I, Ruiz-Linares M, Baca P. Reduction in *Enterococcus faecalis* counts – a comparison between rotary and reciprocating systems. *Int Endod J* 2014; 47:380–386.

40. Estrela C, Holland R, Estrela CR, Alencar AH, Sousa-Neto MD, Pécora JD. Characterization of successful root canal treatment. *Braz Dent J*. 2014 Jan-Feb;25(1):3-11.

41. Souza LC, Brito PR, De Oliveira JC, Alves FR, Moreira EJ, Sampaio-Filho, HR, Rôças IN, Siqueira JF Jr. Photodynamic therapy with two different photosensitizers as a supplement to instrumentation/irrigation procedures in promoting intracanal reduction of *Enterococcus faecalis*. *J Endod*. 2010;36(2);292-6.

42. Nakamura VL, Candeiro CTM, Cai S, Gavini G. Ex vivo evaluation of three instrumentation techniques on *E. faecalis* biofilm within oval shaped root canals. *Braz Oral Research* 2015;29(1):1-7.

43. Estrela C, Sydney GB, Figueiredo JA, Estrela CR. A model system to study antimicrobial strategies in endodontic biofilms. *J Appl Oral Sci*. 2009 Mar-Apr;17(2):87-91.

44. Hems RS, Gulabilavala K, Ng Y-L, Ready D, Spratt DA. An in vitro evaluation of the ability of ozone to kill a strain of *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J*. 2005;38:22-9.

45. Clegg MS, Vertucci FJ, Walker C, Belanger M, Britto LR. The effect of exposure to irrigant solutions on apical dentin biofilms in vitro. *J Endod*. 2006 May;32(5):434-7.

46. Chávez de Paz LE, Bergenholtz G, Svensäter G. The effects of antimicrobials on endodontic biofilm bacteria. *J Endod*. 2010 Jan;36(1):70-7.

47. Garcez AS, Riberio MS, Tegos GP, Nunez SC, Jorge AO, Hamblin MR. Antimicrobial photodynamic therapy combined with conventional endodontic

- treatment to eliminate root canal biofilm infection. *Lasers Surg Med.* 2007;39:59-66.
48. Estrela C, Lopes HP, Elias CN, Leles CR, Pécora JD. Cleanliness of the surface of the root canal of apple vinegar, sodium hypochlorite, chlorhexidine and EDTA. *Rev. Assoc. Paul. Cir. Dent.* 2007;61:177-82.
49. Alves, DRS, Cunha RS, Silveira-Bueno CE, De Alencar AHG, Estrela CRA, Santos TO, Estrela C. Antibacterial Potential of 2.5% Sodium Hypochlorite in Distinct Irrigation Protocols on *Enterococcus faecalis* Biofilm. *J Contemp Dent Pract* 2015;16(5):340-346.
50. Haapasalo M, Ørstavik D. In vitro infection and disinfection of dentinal tubules. *J Dent Res.* 1987;66:1375-9.
51. Estrela C, Pimenta FC, Ito IY, Bammann LL. Antimicrobial evaluation of calcium hydroxide in infected dentinal tubules. *J Endod.* 1999 Jun;25(6):416-8.
52. Paqué F, Laib A, Gautschi H, Zehnder M. Hard-tissue debris accumulation analysis by high-resolution computed tomography scans. *J Endod* 2009;35(7):1044-7.
53. Ghinzelli GC, Souza MA, Cecchin D, Farina AP, de Figueiredo JA. Influence of ultrasonic activation on photodynamic therapy over root canal system infected with *Enterococcus faecalis*--an in vitro study. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2014 Dec;11(4):472-8.
54. Liu H, Xu Q, Huo L, Wei X, Ling J. Chemical composition of *Enterococcus faecalis* in biofilm cells initiated from different physiologic states. *Folia Microbiol (Praha).* 2014 Sep;59(5):447-53.
55. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1998;85:86-93.
56. Kvist T, Molander A, Dahlen G, et al. Microbiological evaluation of one-and two-visits endodontic treatment of teeth with apical periodontitis: a randomised, clinical trial. *J Endod* 2004;30:572-6.

57. Shen Y, Zhou H, Zheng Y, Peng B, Haapasalo M. Current challenges and concepts of the thermomechanical treatment of nickel-titanium instruments. *J Endod* 2013;39:163-172.
58. Koçak S, Koçak MM, Sağlam BC, Türker SA, Sagsen B, Er Ö. Apical extrusion of debris using self-adjusting file, reciprocating single-file, and 2 rotary instrumentation systems. *J Endod* 2013;39:1278–80.
59. Zuolo AS, Mello JEr, Cunha RS, Zuolo ML, Bueno CES. Efficacy of reciprocating and rotary techniques for removing filling material during root canal retreatment. *Int Endod J* 2013;46:947–953.
60. Marinho ACS, Martinho FC, Gonçalves LM, Rabang HRC, Gomes BPF. Does the Reciproc file remove root canal bacteria and endotoxins as effectively as multifile rotary systems? *Int Endod J* 2015;48:542–548.
61. Dagna A, Arciola CR, Visai L, Selan L, Colombo M, Bianchi S, Poggio C. Antibacterial efficacy of conventional and single-use Ni-Ti endodontic instruments: an in vitro microbiological evaluation. *Int J Artif Organs* 2012;35(10):826-31.
62. Byström A, Claesson R, Sundqvist G. The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. *Endod Dent Traumatol.* 1985;1:170-5.
63. Ørstavik D, Haapasalo MPP. Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. *Endod Dent Traumatol.* 1990;6:142-9.
64. Wilson M. Susceptibility of oral bacterial biofilms to antimicrobial agents. *J Med Microbiol.* 1996 Feb;44(2):79-87.
65. Wu MK, Barkis D, Roris A, Wesselink PR. Does the first file to bind correspond to the diameter of the canal in the apical region?. *Int Endod J.* 2002 Mar;35(3):264-7.
66. Debelian G, Trope M. BioRace: efficient, safe and biological based sequence files. *Roots* 2008;1:20-26.
67. Zehnder M. Root canal irrigants. *J Endod.* 2006 May;32(5):389-98.

68. Marending M, Paqué F, Fisher J, Zehnder M. Impact of irrigant sequence mechanical properties of human root dentin. *J Endod* 2007;33:1325-8.
69. Safavi KE, Spångberg LSW, Langeland K. Root canal dentinal tubule disinfection. *J Endod*. 1990;16:207-10.
70. Zandim DL, Corrêa FOB, Sampaio JEC, Rossa Júnior C. The influence of vinegars on exposure of dentinal tubules. *Braz Oral Research*. 2004;18:63-8.
71. Caligiani A, Acquotti D, Palla G, Bocchi V. Identification and quantification of the main organic components of vinegars by high resolution <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. *Anal Chim Acta* 2007;585(1):110-9.
72. Garcez AS, Núñez SC, Lage-Marques JL, Jorge AO, Ribeiro MS. Efficiency of NaOCl and laser-assisted photosensitization on the reduction of *Enterococcus faecalis* in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006 Oct;102(4):e93-8.
73. Soukos NS, Chen PS, Morris JT, Ruggiero K, Abernethy AD, Som S, Foschi F, Doucette S, Bammann LL, Fontana CR, Doukas AG, Stashenko PP. Photodynamic therapy for endodontic disinfection. *J Endod*. 2006 Oct;32(10):979-84.
74. Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J Endod* 2006; 32(2):93-8.
75. Souza LC1, Brito PR, de Oliveira JC, Alves FR, Moreira EJ, Sampaio-Filho HR, Rôças IN, Siqueira JF Jr. Photodynamic therapy with two different photosensitizers as a supplement to instrumentation/irrigation procedures in promoting intracanal reduction of *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2010; 36(2):292-6.

**Table 1.** Mean and standard deviation of the optical density (nm) of the culture medium of the microbiological samples taken before and immediately after the preparation of the root canal with reciprocating systems associated with 2.5% sodium hypochlorite and apple vinegar

Reciprocating system	Irrigating solution	N	Mean/SD optical density of mdium (nm)	Mean/SD optical density of mdium (nm)
			Collect before	Collect after
WaveOne®	Sodium hypochlorite 2.5%	5	0,289 ± 0,089	0,007 ± 0,006
	Apple vinegar	5	0,235 ± 0,048	0,168 ± 0,014
	Total	10	0,262 ± 0,073	0,087 ± 0,086
Reciproc®	Sodium hypochlorite 2.5%	5	0,200 ± 0,058	0,001 ± 0,002
	Apple vinegar	5	0,245 ± 0,099	0,181 ± 0,006
	Total	10	0,223 ± 0,080	0,091 ± 0,095
Unicorne®	Sodium hypochlorite 2.5%	5	0,264 ± 0,098	0,034 ± 0,066
	Apple vinegar	5	0,227 ± 0,065	0,169 ± 0,012
	Total	10	0,246 ± 0,080	0,102 ± 0,084

**Table 2.** Means and standard deviation of percentage (%) reduction of optical density of the culture medium after root canal preparation with reciprocating systems associated with 2.5% sodium hypochlorite and apple vinegar

<b>Reciprocating system</b>	<b>Irrigating solution</b>	<b>N</b>	<b>Mean/SD</b>
WaveOne®	Sodium hypochlorite 2.5%	5	96,95 (±3,59)
	Apple vinegar	5	26,22 (±15,40)
	Total	10	61,58 (±38,74)
Reciproc®	Sodium hypochlorite 2.5%	5	99,51 (±0,82)
	Apple vinegar	5	13,20 (±41,43)
	Total	10	56,36 (±53,22)
Unicorn®	Sodium hypochlorite 2.5%	5	78,43 (±43,86)
	Apple vinegar	5	20,53 (±23,23)
	Total	10	49,48 (±45,01)

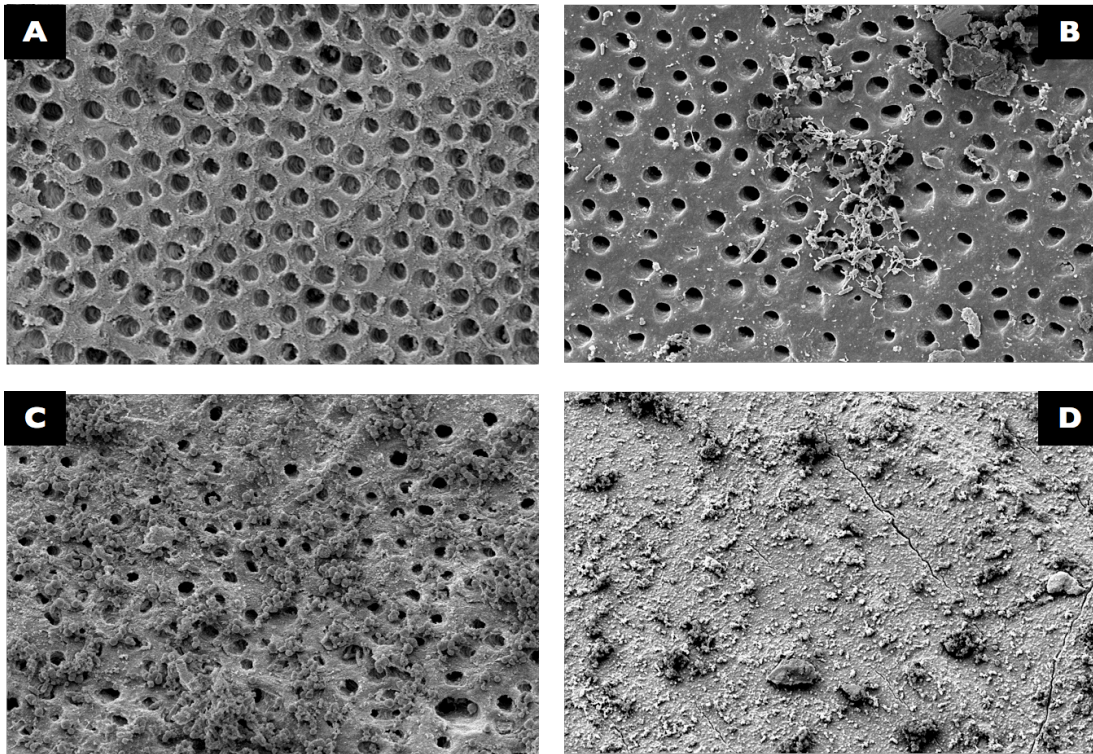


**Table 3.** Absolute frequency of classification by scores, according to absence and presence of debris on the dentin surface, evaluated by thirds, according to the reciprocal system used, in SEM images

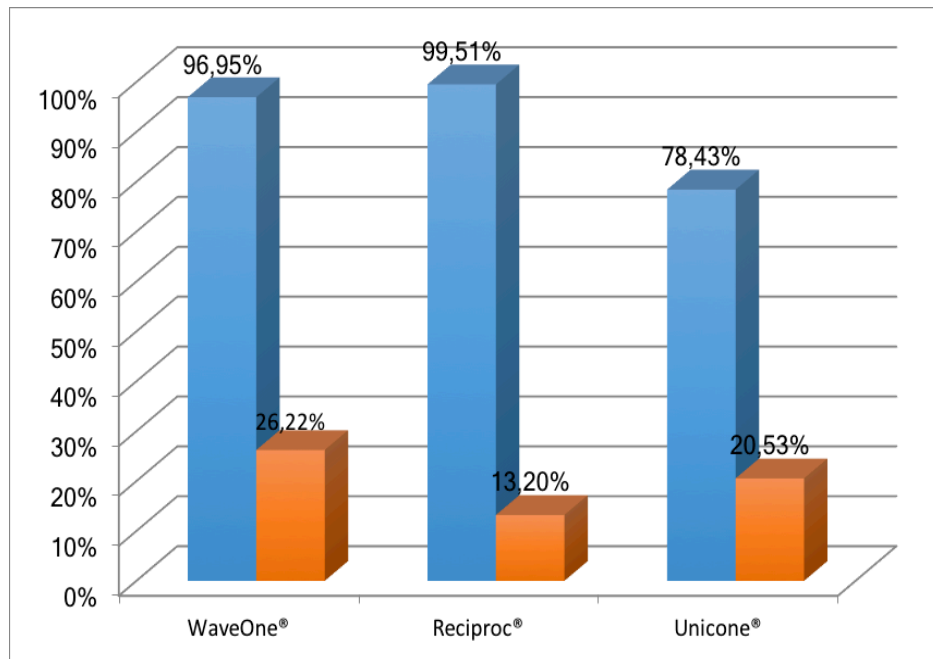
Classification	Number of dentin surface		
	WaveOne <sup>®</sup>	Reciproc <sup>®</sup>	Unicone <sup>®</sup>
Score 1	0	0	0
Score 2	12	18	14
Score 3	16	9	14
Score 4	2	3	2
<b>Total</b>	30	30	30

**Table 4.** Absolute frequency of classification by scores, according to absence and presence of debris on the dentin surface, evaluated by thirds, according to the irrigating solution used in SEM images

Classification	Number of dentin surface	
	Sodium hypochlorite 2.5%	Apple vinegar
Score 1	0	0
Score 2	18	26
Score 3	23	16
Score 4	4	3
Total	45	45



**Figure 1.** Classification of scanning electron microscopy images (1300x) according to the absence and presence of debris on the dentin surface: A - Score 1 (Surface of dentin root with absence of debris); B - Score 2 (Surface of root dentin with areas covered by debris and many visible tubules); C - Score 3 (Surface of root dentin with areas covered by debris and few visible tubules); D - Score 4 (Surface of root dentin completely covered by debris)



**Figure 2.** Percentage reduction (%) of the optical density of the culture medium after preparation of the root canal with reciprocating systems associated with 2.5% sodium hypochlorite and apple vinegar