

Trabalho de Conclusão de Curso

Análise do efeito de diferentes ácidos na desmineralização da dentina

Fillipe Ferreira



**Universidade Federal de Santa Catarina
Curso de Graduação em Odontologia**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA**

Fillipe Ferreira

**ANÁLISE DO EFEITO DE DIFERENTES ÁCIDOS NA DESMINERALIZAÇÃO
DA DENTINA**

Trabalho apresentado à Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para a conclusão do Curso de Graduação em Odontologia.

Orientador: Prof^a. Me. Gabriela Santos Felipe

Co-orientador: Prof. Dr. Wilson Tadeu Felipe

Florianópolis
2015

Fillipe Ferreira

**ANÁLISE DO EFEITO DE DIFERENTES ÁCIDOS NA DESMINERALIZAÇÃO
DA DENTINA**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do título de cirurgião-dentista e aprovado em sua forma final pelo Departamento de Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 27 de maio de 2015.

Banca Examinadora:

Prof.^a, Me. Gabriela Santos Felipe,
Orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a, Dr.^a Cleonice da Silveira Teixeira
Universidade Federal de Santa Catarina

Me. Luciane Geanini Pena dos Santos
Universidade Federal de Santa Catarina

Ao meu pai que, lá de cima, me conduz
pelos melhores caminhos.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, pela saúde e por abençoar minha trajetória.

À UFSC pela oportunidade de estudar e me tornar um profissional de qualidade.

*À professora **Gabriela Santos Felipe** por ter sido uma excelente orientadora, atenciosa, presente e dedicada. Obrigado pelo carinho que conduziu meu trabalho, pelo incentivo, paciência, conhecimento transmitido, tempo atribuído e, principalmente, pela amizade.*

*Aos professores **Wilson Tadeu Felipe** e **Mara Cristina Santos Felipe** que estiveram sempre dispostos a contribuir para o enriquecimento deste trabalho. O conhecimento e experiência de vocês foram essenciais para o mesmo.*

*Às professoras **Cleonice da Silveira Teixeira** e **Renata Gondo Machado** e à doutoranda **Luciane Geanini Pena dos Santos** por aceitarem o convite de fazer parte da minha Banca Examinadora, pela leitura e considerações prestadas a este trabalho.*

*Agradeço imensamente aos meus pais, **Ricardo Ferreira** e **Maria Conceição Gonçalves Ferreira**, por todos os anos de amor, dedicação, por serem meus maiores incentivadores e, acima de tudo, meus exemplos. Ao meu irmão, **Leonardo Ferreira**, que sempre me ajudou e orientou em tudo que eu precisasse. A toda minha família, pelo amor, amizade e força para que superássemos os momentos difíceis sempre unidos. Amo vocês!*

*A todos os amigos que conquistei durante o curso de Odontologia, especialmente à minha dupla querida, **Soraia Rosa Alves**, por todos esses anos de amizade e pelos incontáveis momentos bons. Obrigado por dividir comigo cada minuto de nosso crescimento profissional e tenho certeza que terás excelência no que fazes. Aos amigos que estarão pra sempre comigo, **Letícia Perin**, **Virgínia Polli**, **Fernanda Scotti**, **Cristine Bez** e **Carlos Willian Pereira** por tornarem estes anos tão especiais.*

*Aos meus amigos de **Imbituba** que estiveram ao meu lado e que torceram para que eu pudesse comemorar mais esta conquista.*

Por fim, agradeço a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste sonho.

“Tudo aquilo que se compartilha, se multiplica.”

(Papa Francisco)

RESUMO

Diferentes ácidos são utilizados na prática clínica e na pesquisa odontológica, viabilizando diversos procedimentos. Esses ácidos atuam de maneira distinta nas diferentes estruturas da dentina, alterando sua composição química e estrutural. A desmineralização ocorre com mais intensidade na dentina peritubular, hipermineralizada, do que na dentina intertubular, que é composta por uma rica matriz de colágeno. O objetivo desta revisão de literatura foi estudar o efeito de diferentes ácidos na desmineralização da dentina e, quando possível, verificar como ocorre a desmineralização nas suas diferentes estruturas. O levantamento bibliográfico foi realizado em três bases de dados eletrônicas (PubMed, BioMed e Scielo) e incluídos artigos publicados na língua inglesa ou portuguesa, entre os anos de 1970 e 2014. De acordo com a literatura revisada, foi possível concluir que os ácidos cítrico, fosfórico e EDTA afetam a estrutura da dentina, atuam em seus componentes orgânicos e inorgânicos e causam a desmineralização das dentinas intertubular e peritubular.

Palavras-chave: Ácido cítrico, ácido fosfórico, ataque ácido à dentina, condicionamento ácido da dentina, dentina intertubular, dentina peritubular, dentina radicular, desmineralização, EDTA, *lamina limitans*, microscopia.

ABSTRACT

Different acids are used in clinical practice and in dental research, enabling various procedures. These acids act differently in different dentin structures by altering its chemical and structural composition. Demineralization takes place more intensively in the peritubular dentin, hypermineralized, than in the intertubular dentin, which is composed of rich collagen matrix. The aim of this review was to study the effect of different acid in the dentin demineralization and, when possible, verify how demineralization affects its different structures. The literature review was conducted in three electronic databases (PubMed, BioMed and Scielo) and included articles published in English or Portuguese, between the years 1970 and 2014. According to the literature reviewed, it was concluded that citric, phosphoric acid and EDTA affect the structure of dentin, act on their organic and inorganic components and cause demineralization of the peritubular and intertubular dentines.

Keywords: citric acid, demineralization, dentin acid attack, dentin etching, EDTA, intertubular dentin, *lamina limitans*, peritubular dentin, phosphoric acid, root dentin, microscopy.

LISTA DE SÍMBOLOS

% - porcentagem
 μ - micro
n - nano
m - mili
°C - graus Celcius
k – quilo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 OBJETIVOS.....	12
3 METODOLOGIA.....	13
4 REVISÃO DE LITERATURA	14
4.1 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	18
4.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA AMBIENTAL (ESEM)	24
4.3 MICROSCOPIA ÓPTICA CO-SITE (CSOM).....	25
4.4 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (AFM).....	27
4.5 ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO DE MASSA (ICP-AES).....	28
5 DISCUSSÃO.....	31
6 CONCLUSÃO.....	35
REFERÊNCIAS.....	36

1 INTRODUÇÃO

O sucesso do tratamento endodôntico depende, principalmente, do eficiente preparo químico-mecânico do canal radicular (SAYIN et al., 2007; PATIL; UPPIN, 2011). Diferentes instrumentos e soluções irrigadoras são utilizados com o objetivo de limpar e descontaminar o sistema de canais radiculares (MARENDING et al., 2007; SAYIN et al., 2007; PATIL; UPPIN, 2011;). Alguns dos produtos químicos utilizados na irrigação do canal podem alterar a composição química da dentina, bem como sua estrutura, já que as alterações estão diretamente ligadas à proporção dos componentes inorgânicos e orgânicos da mesma (SAYIN et al., 2007).

Basicamente, a dentina é constituída de componentes inorgânicos, representados pelos cristais de hidroxiapatita (50%) e água (20%); e componentes orgânicos, quase que exclusivamente colágeno do tipo I (30%). Outros componentes orgânicos também estão presentes, mas em pequenas quantidades (MARSHALL et al., 1997; TJÄDERHANE et al., 2013). Dentre eles, os mais estudados são os proteoglicanos (BERTASSONI et al., 2012), pois podem influenciar o processo de mineralização, estabilizando os cristais de hidroxiapatita (BOSKEY, 1991)

Estudos demonstraram que o uso de soluções ácidas na dentina auxilia na remoção do *smear layer*, desobstrui os túbulos dentinários (MEERBEEK et al., 1992), aumenta a microporosidade da dentina intertubular (SANO et al., 1993) e desmineraliza a sua superfície, afetando principalmente a dentina peritubular (PERDIGÃO et al., 1996). Após a ação ácida, muito da parte mineral é perdida, expondo componentes orgânicos como a *lamina limitans*, filamentos e macromoléculas (BERTASSONI; STANKOSKA; SWAIN, 2012).

Os diferentes ácidos utilizados na odontologia agem de maneiras distintas na dentina. Assim, o objetivo desta pesquisa é revisar trabalhos de autores que avaliaram o efeito dos ácidos cítrico, fosfórico e etilenodiaminotetracético (EDTA) e/ou que procuraram verificar como ocorre o processo de desmineralização por meio de distintas metodologias.

2 OBJETIVOS

Revisar trabalhos existentes na literatura que contemplam o efeito dos ácidos cítrico, fosfórico e EDTA na desmineralização da dentina.

3 METODOLOGIA

O levantamento bibliográfico foi realizado nas bases de dados eletrônicas PubMed, BioMed e SciELO, consultadas através do portal de periódicos da Biblioteca Universitária da UFSC (www.periodicos.capes.gov.br). As palavras-chave utilizadas para a pesquisa foram: ácido cítrico, ácido fosfórico, ataque ácido à dentina, condicionamento ácido da dentina, dentina intertubular, dentina peritubular, dentina radicular, desmineralização, EDTA e *lamina limitans*. Foram incluídos artigos publicados na língua inglesa ou portuguesa, entre os anos de 1970 e 2014, que abordam, por meio de variadas metodologias, a desmineralização dentinária após diferentes protocolos de condicionamento ácido.

4 REVISÃO DE LITERATURA

O tecido dentinário, subjacente ao esmalte e ao cimento, constitui a maior parte da estrutura do dente. Do ponto de vista fisiológico, a dentina pode ser descrita como uma barreira vital (PASHLEY, 1991; BERTASSONI; STANKOSKA; SWAIN, 2012), semi-permeável e que funciona como anteparo biomecânico diminuindo a propagação de fissuras na estrutura dental (IMBENI et al., 2005; BERTASSONI; STANKOSKA; SWAIN, 2012).

Esse tecido mineralizado se origina a partir de odontoblastos, células especializadas que secretam matriz de colágeno tipo I e uma série de proteínas não-colagenosas (HABELITZ et al., 2007; GOLDBERG et al., 2012). Essas células geram os processos odontoblásticos que possuem 1 µm de diâmetro e comprimento variável. Durante e após a mineralização, esses processos incorporam e se mantêm juntos à matriz extracelular, dando origem a estruturas finas e longas na dentina denominadas túbulos dentinários (PASHLEY, 1991; HABELITZ et al., 2007).

As paredes internas dos túbulos dentinários são revestidas por dentina peritubular. Essa dentina é hipermineralizada e contém, principalmente, cristais de hidroxiapatita e pouca matriz orgânica (MARSHALL et al., 1997; GOTLIV; VEIS, 2009; GOLDBERG et al., 2012; BERTASSONI; STANKOSKA; SWAIN, 2012). A parte da dentina que preenche os espaços entre os túbulos dentinários é chamada de intertubular, e é composta por rica matriz de colágeno e reforçada por pequenos cristais de hidroxiapatita (MARSHALL et al., 1997; GOLDBERG et al., 2012; BERTASSONI et al., 2012). Propriedades nanomecânicas sugerem que a hidroxiapatita esteja presente na dentina peritubular em 60% de seu volume, enquanto na dentina intertubular seja cerca de 45% (MARSHALL et al., 2001). A dentina peritubular se distingue ainda da dentina intertubular por ser lisa e densa, enquanto a última se apresenta granulosa e desorganizada (GOTLIV; VEIS, 2009).

Conforme HABELITZ et al. (2007), o colágeno pode estar ausente ou presente em pequenas quantidades na dentina peritubular; e uma matriz não-colagenosa é secretada pelos odontoblastos para que as paredes dos túbulos sejam mineralizadas em um grau mais elevado do que ocorre na dentina intertubular. Análises recentes na dentina peritubular revelaram a ausência de prolina e hidroxiprolina, aminoácidos essenciais para a presença de colágeno (GOTLIV; VEIS, 2009). Outros destacaram a presença de componentes orgânicos, como ácido glutâmico e metionina e de

proteoglicanos e glicosaminoglicanos, possivelmente associados a componentes fosforilados como fosfolipídeos, fosfoproteínas e glicolipídeos (GOTLIV; VEIS, 2009; BERTASSONI et al., 2012).

Dai, Cate e Limeback (1991), em contrapartida, observaram a presença de colágeno na dentina peritubular, porém em pequenas quantidades. Este fato pode ser indicativo de um recuo, com o passar do tempo, do processo odontoblástico, pois a secreção de colágeno é maior mais próximo do corpo da célula.

Acredita-se que a rede fibrilar orgânica peritubular se origine de uma estrutura tubular semelhante a uma folha, denominada *lamina limitans*; que é constituída por núcleos de proteoglicanos possivelmente ligados a macromoléculas amorfas, como o complexo proteolipídio-fosfolipídico. Esse sistema projeta-se para o lúmen do túbulo recrutando precursores minerais que iniciam a mineralização (BERTASSONI et al., 2012).

A função da dentina peritubular ainda não está totalmente definida. Pode ser mecânica, uma vez que o aumento da dureza da dentina peritubular pode aumentar a resistência à pressão em torno dos túbulos e, assim, afetar a propagação de fissuras (HABELITZ et al., 2007). A dentina peritubular pode, também, desempenhar um papel importante na regulação do transporte de constituintes do túbulo para a dentina intertubular. Esse processo de transporte ocorre porque o complexo proteolipídio-fosfolipídico fornece uma matriz densa, rica em poros que atuam como reguladores seletivos e permitem o fluxo de fluidos e íons entre os processos odontoblásticos e a dentina intertubular, um tecido que, apesar de altamente mineralizado, é vital e metabólico (GOTLIV; VEIS, 2009).

Como já mencionado, a matriz intertubular é essencialmente composta por fibras de colágeno tipo I associadas a proteínas não-colagenosas e proteoglicanos, que desenvolvem uma rede tridimensional reforçada por cristais de hidroxiapatita (MARSHALL et al., 1997; HABELITZ et al., 2007; BERTASSONI et al., 2012). Cerca de 90% da composição orgânica dessa dentina é quase que exclusivamente colágeno tipo I, embora tenham sido identificados outros tipos de colágeno (BERTASSONI et al., 2012).

As fibras de colágeno tipo I representam um complexo supramolecular, altamente estruturado, formado por unidades subestruturais denominadas fibrilas. Essas unidades variam seu diâmetro entre 10 e 25 nm e são originadas, em teoria, por um conjunto de microfibrilas de diâmetro ainda menor, compreendido entre 4 e 5 nm. As

microfibrilas, por sua vez, são formadas por moléculas de colágeno medindo cada uma 1,4 nm de diâmetro (BERTASSONI et al., 2012).

O uso de substâncias químicas na prática odontológica pode alterar a estrutura da dentina, principalmente o colágeno (MORRIS et al., 2001).

Em Endodontia, por exemplo, os procedimentos de limpeza e modelagem dos canais produzem uma camada de *smear layer* que fica aderida às paredes radiculares instrumentadas (SHEN; HAAPASALO, 2008). Principalmente em dentes despolpados, a presença dessa camada pode ser considerada prejudicial porque dificulta o contato e a penetração de irrigantes, medicamentos e materiais obturadores na dentina radicular (DE-DEUS et al., 2004). A sua completa remoção requer o uso de um agente ácido para ajudar na desmineralização (ZEHNDER et al., 2005).

Os agentes quelantes provocam alterações estruturais e nos níveis de cálcio e fósforo da dentina (ROTSTEIN et al., 1996), e quando em altas concentrações podem causar a erosão das paredes do canal (DE-DEUS et al., 2008a). Geralmente, a eficiência desses agentes depende de alguns fatores como comprimento da raiz e do canal, profundidade de penetração do produto, dureza da dentina, tempo de aplicação, pH e concentração (SEN; WESSELINK; TURKUN, 1995).

Uma variedade de agentes quelantes é utilizada em endodontia. Os mais comuns são EDTA e ácido cítrico (DE-DEUS et al., 2008a).

O EDTA é indicado para facilitar a instrumentação dos canais radiculares e remover o *smear layer*, preparando as paredes dentinárias para receber a medicação intracanal e os materiais obturadores (WHITE; GOLDMAN; LIN, 1987; ÇALT; SERPER, 1999). Essa solução atua apenas pelo contato direto (DE-DEUS et al., 2008b) e, por curtos períodos de exposição, sua ação é suave quando comparada a de outros ácidos mais agressivos (MACHADO-SILVEIRO; GONZALEZ-LOPEZ; GONZALEZ-RODRIGUEZ, 2004). Autores sugeriram a adição de um detergente catiônico (Cetavlon) para reduzir a tensão superficial do líquido, aumentar a sua capacidade antisséptica e melhorar a ação quelante (DE-DEUS et al., 2006; 2008a; 2008b). Esta substância combinada é conhecida como EDTAC e age sobre as paredes de dentina produzindo uma superfície limpa e com túbulos dentinários abertos (GOLDBERG; SPIELBERG, 1982). Além de estudarem certas associações com o EDTA, vários autores procuraram verificar o efeito do tempo de uso desse produto sobre as alterações na dentina (MACHADO-SILVEIRO; GONZALEZ-LOPEZ; GONZALEZ-

RODRIGUEZ, 2004; DE-DEUS et al., 2006; 2008a; 2008b; REIS et al., 2008; QIAN; SHEN; HAAPASALO, 2011).

O ácido cítrico também tem sido sugerido e utilizado por muitos profissionais. Apesar de ser eficaz na remoção do *smear layer* e na desmineralização da dentina, o baixo pH da solução pode ter efeito irritante sobre os tecidos periapicais (GARBEROGLIO; BECCE, 1994). Contudo, na forma de citrato de sódio, o ácido cítrico torna-se mais biocompatível por apresentar pH próximo ao neutro (MACHADO-SILVEIRO; GONZALEZ-LOPEZ; GONZALEZ-RODRIGUEZ, 2004).

Já na Dentística Restauradora, um ácido amplamente empregado para condicionamento da dentina é o fosfórico (BRAJDIC et al., 2008). Geralmente encontrado na forma de gel (BRAJDIC et al., 2008), este ácido tem como objetivo remover o *smear layer*, desmineralizar esmalte e dentina, expor as fibras de colágeno e aumentar a energia livre de superfície para promover a adesão dos materiais restauradores (LOPES et al., 2002; SUSIN et al., 2008).

A ação desses ácidos sobre a dentina pode ser analisada por meio de diferentes metodologias.

A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) é um dos métodos mais utilizados para estudar a dentina (REIS et al., 2008). Mas, por apresentar limitações, como não permitir reutilização de amostras e observações longitudinais, novas metodologias têm sido desenvolvidas (REIS et al., 2008).

A Microscopia Eletrônica de Varredura Ambiental (ESEM) é indicada para a análise de materiais biológicos, incluindo a dentina (REIS et al., 2008). Como não há necessidade de metalização da amostra e do exame poder ser feito em baixo vácuo, os danos causados pela perda de água ocasionada pelo alto vácuo do MEV tradicional são minimizados (REIS et al., 2008).

A Microscopia Óptica Co-Site (CSOM) e a Microscopia de Força Atômica (AFM) também têm sido utilizadas com sucesso (DE-DEUS et al., 2006; 2008a). Essas alternativas fornecem métodos reprodutíveis, longitudinais e capazes de produzir dados quantitativos precisos (DE-DEUS et al., 2007; 2008a; REIS et al., 2008). Há, ainda, estudos que utilizaram a Espectrometria de Absorção de Massa (ICP-AES) para estudar a quantidade de cálcio e fósforo dissolvida após o uso de diferentes produtos sobre a dentina (SOUSA; SILVA, 2005).

Na sequência, encontram-se descritos, de acordo com a metodologia utilizada e em ordem cronológica, os resumos de diversos trabalhos nos quais os efeitos dos ácidos cítrico, fosfórico e EDTA foram avaliados.

4.1 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Matos et al. (1997) avaliaram a ação de quatro soluções ácidas sobre a superfície da dentina e verificaram seu grau de desmineralização. A partir do terço médio da coroa de dentes molares de humanos, foram obtidos discos de dentina de 3 mm de espessura, os quais foram preparados e seccionados com discos de carboneto de silício. Após a produção de *smear layer* com uso de discos abrasivos, os espécimes foram imersos em solução salina e os seguintes ácidos foram aplicados durante 15 segundos na superfície da dentina: ácido fosfórico nas concentrações de 10%, 35% e 37,5% e ácido maleico 10%. Depois, as amostras foram imersas em glutaraldeído 4% e solução tampão fosfato (0,075 M, pH 7,3) por 12 horas. Em seguida, foram desidratadas com graduações crescentes de etanol até 100%. A análise, realizada por meio de MEV, demonstrou que todas as concentrações de ácido fosfórico removeram o *smear layer*, aumentaram o diâmetro dos túbulos dentinários [2,88 μm (ácido fosfórico 10%), 2,90 μm (ácido fosfórico 35%) e 2,47 μm (ácido fosfórico 37,5%)] e causaram a desmineralização da dentina em uma profundidade média de 9,83 μm [10,19 μm (ácido fosfórico 10%), 11,00 μm (ácido fosfórico 35%) e 8,32 μm (ácido fosfórico 37,5%)]. A solução de ácido maleico 10% apenas removeu o *smear layer* superficialmente (2,14 μm). Como o valor de referência da largura de abertura dos túbulos dentinários foi de 2,22 μm , os autores concluíram que o ácido fosfórico 35% foi o agente quelante mais eficaz.

Ayad (2001) estudou as variações na topografia da superfície da dentina ácido-condicionada a fim de avaliar a eficiência de diferentes protocolos de ataque ácido utilizados para permitir a infiltração da resina durante os procedimentos restauradores. Foram utilizados 35 terceiros molares de humanos, que tiveram suas raízes removidas. Cinco amostras foram preparadas com pontas diamantadas a fim de se avaliar a textura da superfície da dentina. O restante das amostras foi preparado com instrumentos rotatórios de acabamento e subdividido de acordo com o tratamento utilizado: ácido poliacrílico 25% (Grupo 1); ácido fosfórico 10% (Grupo 2), ácido cítrico 10% (Grupo 3), ácido láctico 20% (Grupo 4) e ácido fosfórico 32% (Grupo 5). Então, as soluções foram aplicadas por 10 segundos na dentina, e posteriormente as amostras foram

lavadas com água por 10 segundos, fixadas em glutaraldeído 2,5% por 24 h e solução tampão fosfato 0,1 M por mais 24 h e processadas para análise em MEV. O ácido poliacrílico 25% (Grupo 1) removeu parcialmente a camada de *smear layer*, sendo que todos os túbulos apresentaram resíduos de lama. Imagens semelhantes foram observadas nos espécimes do Grupo 2. As superfícies tratadas com ácido cítrico 10% (Grupo 3) mostraram remoção de *smear layer* e aumento do diâmetro dos túbulos dentinários. Nos espécimes do grupo 4, foi possível observar remoção de *smear layer* e grande desmineralização da dentina peritubular, expondo as fibras de colágeno da dentina intertubular. A maior desmineralização da dentina e maior aumento no diâmetro dos túbulos dentinários foram observados nos espécimes do grupo 5.

Em 2007, Tay, Gutmann e Pashley examinaram as condições da dentina radicular após o uso de hipoclorito de sódio (NaOCl) 5,25%, EDTA 17%, BIOPURE MTAD e EDTA 17% + NaOCl. Após o acesso de 28 dentes unirradiculados de humanos, cada canal foi preparado até o instrumento #40, com comprimento de trabalho estabelecido em 0,5 mm aquém do forame. Durante a instrumentação, os canais foram irrigados com 10 mL de NaOCl 1,3% (tempo total = 20 minutos), exceto os do grupo controle, e em seguida, irrigados com 10 mL de água destilada, para minimizar potenciais interações do NaOCl com os outros irrigantes. Após o preparo, os canais foram irrigados com 1 mL de cada uma das soluções irrigantes testadas. Cada irrigante foi deixado no canal por 1 minuto e depois o canal foi irrigado com mais 4 mL durante 1 minuto, com o tempo total de 2 minutos para cada irrigação final. Para o controle negativo, a irrigação inicial foi feita com EDTA 17% e a final com NaOCl 5,25%. Estas soluções irrigantes foram usadas da mesma maneira como descrito anteriormente, com exceção do NaOCl 5,25% que foi deixado no canal por 10 min. Os canais foram obturados, restaurados provisoriamente e colocados em água deionizada a 37°C durante 2 h. Logo após, cada dente foi imerso em nitrogênio líquido e fraturado longitudinalmente em duas metades. Uma metade de cada dente foi preparada com um protocolo de desidratação utilizando concentrações crescentes de etanol até 100% e colocada em um secador por 24 h. A outra metade foi preparada com um protocolo de desidratação utilizando hexametildissilazano (HMDS), que impede a efeito da tensão superficial sobre o colapso de tecidos biológicos moles. Estas amostras foram inicialmente desidratadas em concentrações crescentes de etanol e imersas durante 5 min em HMDS. Os conjuntos foram deixados em repouso por 12 h. Após a desidratação, as amostras foram examinadas em MEV. Micrografias foram tiradas das

paredes dos canais em 1-3 mm e 5-7 mm do forame apical, que representavam os terços apical e médio dos canais, respectivamente. O uso somente do NaOCl (controle positivo) não removeu a camada de esfregaço, exceto em áreas isoladas. A utilização de EDTA como irrigante inicial e NaOCl como irrigante final (controle negativo) resultou na remoção completa do *smear layer* e expôs uma camada de dentina desmineralizada altamente irregular, independentemente do protocolo de desidratação utilizado. As amostras que foram irrigadas com EDTA 17% ou BIOPURE MTAD e examinadas após o protocolo de desidratação com etanol mostraram a remoção completa do *smear layer* e superfícies de dentina intertubular lisas e não porosas. Os espécimes que foram inicialmente irrigados com NaOCl 5,25%, subsequentemente com EDTA 17% e expostos ao protocolo de desidratação HMDS apresentaram a remoção completa de *smear layer* nos terços médio e apical. Os espécimes que foram irrigados com BIOPURE MTAD apresentaram matriz de colágeno desmineralizada ao longo dos terços médio e apical. Micrografias em maior aumento revelaram a presença de grandes depósitos globulares ligados às fibrilas de colágeno, que provavelmente representavam sais de cálcio. As dimensões desses depósitos globulares (80 – 120 nm) eram, geralmente, maiores que as das fibrilas. Em alguns espécimes, partes das superfícies da matriz de dentina desmineralizada estavam extensivamente cobertas por esses aglomerados.

Brajdic et al. (2008) analisaram a influência de diferentes tempos de ataque ácido na superfície de dentina durante a remoção do *smear layer*. Sessenta primeiros pré-molares foram cortados sagitalmente na direção mésio-distal da região da dentina coronal e horizontalmente na metade da distância entre a junção esmalte-dentina e a polpa. As superfícies de dentina nos cortes horizontais foram tratadas com ácido fosfórico 35% por 10 segundos no grupo 1 e 30 segundos no grupo 2. Depois do condicionamento, as superfícies foram lavadas com água por 5 segundos e levemente secas com ar comprimido, e as amostras preparadas para análise em MEV. Os autores concluíram que o aumento do tempo de ataque ácido promoveu maior remoção do *smear layer*, aumentou o diâmetro e o percentual de túbulos dentinários expostos em relação à superfície de dentina exposta, diminuiu o percentual de dentina intertubular, proporcionou o aparecimento de uma zona porosa que contém *smear layer* e colágeno residual e promoveu a dissolução completa da dentina peritubular.

Susin et al. (2008) compararam o efeito de diferentes ácidos na micromorfologia da dentina. Discos de dentina com 2 mm de espessura foram obtidos a partir de 20

terceiros molares e polidos com lixa 600 por 30 segundos para formar *smear layer* padrão. Os discos foram seccionados no sentido mésio-distal e aleatoriamente divididos em 4 grupos: sem tratamento (grupo 1), ácido fosfórico 37% (grupo 2), iBond (grupo 3) e Clearfil SE Bond (grupo 4). As amostras do grupo que continha o ácido fosfórico tiveram como protocolo: tempo de condicionamento ácido de 20 segundos e imersão em solução aquosa de etanol 50% por 5 segundos. Após o uso das substâncias e enxágüe, os espécimes foram imersos em glutaraldeído 2,5%, tamponado com cacodilato de sódio 0,1 M, por 6 horas para fixação. Após ter sido enxaguado com cacodilato de sódio 0,1 M, eles foram enxaguados com água destilada por 1 minuto. Então, cada hemi-disco de dentina foi desidratado em concentrações crescentes de etanol (50, 70 e 90 %) por 5 minutos cada e etanol 100% por 3 horas. A seguir, as amostras foram colocadas em um aparelho de ultrassom por 15 minutos com etanol 100% e fraturadas manualmente pela metade. Após secos, foram revestidos com ouro e as superfícies observadas em MEV operando em 25 kV. As imagens foram capturadas em ampliações de 8000x e 32000x. O aspecto geral da superfície da dentina condicionada foi avaliado levando em consideração a profundidade de desmineralização intertubular, o aspecto *cuff-like* da dentina peritubular, o aspecto em funil dos túbulos dentinários, a presença ou ausência de *smear layer* e a presença ou ausência de *smear plugs*. Os espécimes do grupo controle, que não receberam tratamento, apresentaram o perfil esperado após a análise, tendo 100% dos túbulos obliterados. A análise dos espécimes tratados com ácido fosfórico 37% apresentou 100% dos túbulos abertos e grande desmineralização da dentina. Nos espécimes tratados com iBond ocorreu menor desmineralização da dentina e observou-se a presença da dentina peritubular com aspecto *cuff-like*. Quando o Clearfil SE Bond foi utilizado, a análise dos espécimes apresentou 50% dos túbulos dentinários abertos, moderada desmineralização e dentina peritubular com aspecto *cuff-like*. Os autores concluíram, então, que todos os agentes condicionantes testados foram capazes de alterar a morfologia dentinária.

Lottanti et al. (2009) compararam diferentes protocolos de irrigação, avaliando, por meio de MEV e ICP-AES, a quantidade de cálcio dissolvido, o *smear layer* e a desmineralização da dentina. Foram obtidos tubos de dentina de 12 mm, a partir de 51 pré-molares unirradiculados de humanos. A superfície externa das raízes foi recoberta com esmalte de unha, para evitar a diluição do cálcio. Os canais foram preparados no sentido coroa-ápice com auxílio de brocas Gates-Glidden, e uma lima calibre #45 foi utilizada no comprimento de trabalho (11 mm). Então, os espécimes foram

aleatoriamente divididos em 4 grupos experimentais (n=12) e um grupo controle positivo (n=3), como descrito a seguir: NaOCl 1% durante a instrumentação e depois água deionizada (grupo 1 – controle negativo); NaOCl 1% durante a instrumentação e depois EDTA 17% (grupo 2); Mistura 1:1 de NaOCl 2% e ácido etidrônico 18%, durante e após a instrumentação (grupo 3); NaOCl 1% durante a instrumentação e depois ácido peracético 2,25% (grupo 4). O tempo total de irrigação durante a instrumentação foi de 15 minutos e o volume foi de 10 mL. Após a instrumentação, foi utilizado 5 mL da solução irrigadora por 3 minutos. Por fim, o canal foi lavado com 5 mL de água deionizada. No grupo controle positivo, o canal foi irrigado durante a instrumentação com NaOCl 1%, e, logo após, irrigado com 10 mL de EDTA 17% por 30 minutos. As raízes foram mergulhadas em água, depois em nitrogênio líquido e fraturadas. A desidratação foi feita com concentrações crescentes de etanol até 100%. Uma metade de cada raiz foi infiltrada e mergulhada em concentrações crescentes de isobornilmetacrilato. Em seguida, elas foram seccionadas no terço coronal, médio e apical usando uma ponta diamantada. As raízes seccionadas foram montadas em blocos individuais e polidas utilizando lixa 1200 e 2400 e pastas de diamante com partículas menores que 0,5 μm . As superfícies expostas foram recobertas com carbono e analisadas em MEV operando em 11 kV a uma distância de trabalho de 9 a 12 mm. As imagens digitais foram obtidas em ampliações de 100x, 500x e 2000x para visualizações mais detalhadas em uma resolução de 1024x768 pixels. Os espécimes do grupo controle positivo foram utilizados para comparar as imagens obtidas em modo de retroespalhamento, homólogos a mesma amostra obtida por raio-x de energia dispersiva (EDX) recolhida durante 300 minutos. Como a análise por EDX leva meio dia de trabalho por espécime e as áreas escuras nas micrografias formadas por elétrons são exatamente iguais às áreas desmineralizadas, as imagens do retroespalhamento foram usadas para comparar desmineralizações aparentes entre os grupos. A metade oposta de cada raiz foi preparada para análise do *smear layer*. Três micrografias foram tomadas em 1000x, ampliando áreas típicas dos terços coronal, médio e apical com MEV operando em 10 kV a uma distância de trabalho de 7 a 9 mm. Para a análise do *smear layer*, as imagens das paredes dos canais foram comparadas com o padrão de dentina da metade oposta da raiz. Isso fez com que fosse possível diferenciar as áreas cobertas por *smear layer* e áreas escleróticas. Todos os protocolos de irrigação que utilizaram agente quelante resultaram em redução estatística do *smear layer*, enquanto os espécimes irrigados com NaOCl e água deionizada estavam quase completamente cobertos por

smear layer. Em áreas coronais, o EDTA removeu um pouco mais de *smear layer* do que o ácido peracético, enquanto que no terço médio e apical o ácido peracético foi mais eficaz. Pouco ou nenhuma área desmineralizada foi observada em amostras tratadas com NaOCl/ácido etidrônico. As amostras irrigadas com EDTA, como irrigante final por 3 minutos, mostraram padrões típicos de desmineralização dentinária: atingiam profundidades de até 20 micrometros e as aberturas dos túbulos eram mais amplas.

Moreira et al. (2009) avaliaram o efeito de diferentes irrigantes na matriz orgânica de colágeno e na topografia da matriz inorgânica das paredes de dentina. Foram utilizados 60 incisivos de bovinos. Os ápices dos dentes foram selados, a superfície externa foi coberta com uma camada de cianocrilato e as coroas foram separadas das raízes por um corte horizontal feito 3 mm abaixo da junção amelo-cementária. Para evitar o extravasamento da solução irrigadora em torno da superfície externa da raiz, a área foi vedada com Impregum Soft. Os canais foram preparados com uma lima calibre #130 e broca Gates-Glidden #6. Os dentes foram divididos aleatoriamente em 6 grupos (n=10): Grupo 1 - NaOCl 5,25% (30 minutos) + EDTA 17% (5 minutos); Grupo 2 - clorexidina 2% (30 minutos); Grupo 3 - NaOCl 5,25% (30 minutos); Grupo 4 - EDTA 17% (5 minutos); Grupo 5 - clorexidina 2% (30 minutos) + EDTA 17% (5 minutos) e; Grupo 6 (controle) - cloreto de sódio 0,9% (30 minutos). Em todos os grupos foram utilizados 10 mL de solução irrigadora, exceto no grupo da clorexidina 2%, no qual foi utilizado 2 mL. Cinco mililitros de solução salina foram usados a cada 3 minutos para renovação da substância química analisada. As amostras foram armazenadas em formaldeído 10% durante 48 h. e seccionadas. Uma metade foi submetida à digitalização por MEV e a outra foi submetida ao processamento histológico para ser analisada sob microscopia de luz polarizada (PLM). A análise em PLM não foi incluída nesta revisão. A análise em MEV revelou que todos os grupos onde foi utilizado EDTA 17% apresentaram regiões com perda estrutural, diminuição da dentina intertubular e, conseqüentemente, aumento do diâmetro dos túbulos dentinários.

Qian, Shen e Haapasalo (2011) compararam o nível de erosão das paredes do canal após o uso das soluções de NaOCl 5,25%, EDTA 17%, EGTA 17% e ácido cítrico 10%. Foram obtidas secções de 5 mm a partir do terço médio da raiz de 84 dentes unirradiculados de humanos. O espaço referente ao canal radicular foi preparado com instrumento de calibre #40 e, em seguida, os segmentos foram seccionados em duas metades e aleatoriamente divididos em grupos experimentais de acordo com a solução irrigadora utilizada. Cada bloco foi colocado em um tubo de ensaio de 15 mL contendo

uma das soluções citadas anteriormente e o tubo foi constantemente agitado. O espécime foi lavado com água destilada e seco com algodão. Após os tratamentos, as amostras foram desidratadas com álcool 100% durante toda a noite, seguido por 3 horas em um forno a 58°C. Os blocos secos foram montados em placas de alumínio e recobertos por ouro/paládio. Três amostras de cada grupo foram observadas em MEV operando em 8 kV e as imagens, obtidas em ampliação de 2000x, foram transmitidas ao computador e examinadas. Em cada grupo, a área de superfície com um mínimo de 500 aberturas tubulares foi medida. As amostras que foram expostas primeiro ao NaOCl 5,25% seguido por um dos agentes quelantes, utilizados por 1 minuto, apresentaram a superfície de dentina lisa, não porosa e túbulos dentinários regulares e bem separados um do outro. As aberturas tubulares eram, ligeiramente, maiores quando o ácido cítrico foi utilizado depois do NaOCl 5,25%. A erosão da dentina peritubular e intertubular foi observada quando foram utilizados como irrigantes iniciais o EDTA 17%, o EGTA 17% ou o ácido cítrico 10%, durante 1 minuto. Os túbulos dentinários tornaram-se mais largos, irregulares e rugosos. Não houve diferenças significativas entre EDTA 17%, EGTA 17% e ácido cítrico 10% quando utilizados durante 5 minutos após o NaOCl 5,25%. No entanto, diferenças significativas foram encontradas quando o NaOCl 5,25% foi utilizado como irrigante final. A análise das amostras do grupo em que foi utilizado EGTA 17% revelou menos erosão do que a observada nas amostras em que foi utilizado EDTA 17% e ácido cítrico 10%. Os autores concluíram, também, que o grau de erosão da dentina aumentou quando o tempo de uso de qualquer solução foi estendido.

4.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA AMBIENTAL (ESEM)

Reis et al. (2008) usaram ESEM e CSOM (dados expostos mais adiante) em uma abordagem longitudinal destinada a comparar o efeito quelante de quatro substâncias ácidas em tempos de exposição cumulativos (15, 30, 60, 180 e 300 segundos). Dezesesseis molares superiores de humanos foram inseridos em resina epóxi e tiveram suas coroas removidas na junção cimento-esmalte, expondo a porção de dentina radicular cervical. Em seguida, o *smear layer* foi produzido de forma padronizada com uso de lixas de carboneto de silício e pasta de polimento. As amostras foram divididas, aleatoriamente, de acordo com o agente quelante utilizado (n=4/grupo): Grupo 1 - EDTA 17% (pH 7,7); Grupo 2 - ácido cítrico 1% (pH 2,3); Grupo 3 - ácido cítrico 5% (pH 2,0) e; Grupo 4 - ácido cítrico 10% (pH 1,8). As amostras de cada grupo, colocadas

juntas em um recipiente especial que permitia a aplicação dos quelantes sem removê-las do microscópio, foram observadas em ampliações de 1000x e 2000x. Uma imagem de cada ampliação foi obtida de cada amostra e as posições específicas x-y-z foram registradas. Em seguida, o microscópio foi aberto e as soluções foram aplicadas na superfície de cada amostra por 15 segundos. O produto foi removido com água destilada, as amostras foram secas e as câmaras microscópicas fechadas para nova observação. Essa sequência foi repetida em todos os tempos de desmineralização. A análise das amostras do grupo 1 mostrou remoção do *smear layer*, de forma mais evidente, após 60 segundos. No entanto, para as amostras dos grupos que utilizaram ácido cítrico, a remoção completa do *smear layer* foi observada após 15 segundos e o alargamento dos túbulos dentinários foi evidente após 60 segundos. Nas amostras do grupo 1 não houve evidência de alargamento dos túbulos com o aumento do tempo de exposição. A erosão da dentina peritubular foi observada nas amostras dos grupos 3 e 4 após 60 segundos e nas amostras do grupo 2 após 300 segundos.

4.3 MICROSCOPIA ÓPTICA CO-SITE (CSOM)

De-Deus et al. (2008a) avaliaram a eficácia do EDTA 17% (pH 7,7), EDTAC 17% (pH 7,7), EDTAT 17% (pH 7,7) e SmearClear na redução do *smear layer* em tempos de exposição cumulativos (15, 30, 60, 180 e 300 segundos). Discos de dentina de aproximadamente 3 mm de espessura foram obtidos da região cervical das raízes de 12 molares. A produção de *smear layer* foi padronizada com o uso de lixas de carbetto de silício e pasta de polimento. As amostras foram, aleatoriamente, divididas em quatro grupos de acordo com o agente quelante utilizado (n=3). Imagens de cada amostra foram realizadas em posições específicas x-y. Um recipiente especial permitiu aplicação das soluções sem remover as amostras de dentina do microscópio. Uma rotina padrão de análise das imagens foi utilizada para aumentar o contraste, discriminar e medir os túbulos dentinários abertos. A razão entre a área total da abertura tubular e a área do campo de imagem (fração de área tubular - AF) foi medida e o seu tempo de evolução foi usado para quantificar o processo de desmineralização. A rotina foi aplicada sem a influência do operador para a vasta maioria das imagens adquiridas de diferentes amostras em diferentes tempos. A análise das imagens obtidas dos espécimes tratados, em todos os regimes de irrigação, mostrou que após 15 a 30 segundos de condicionamento houve alargamento dos túbulos dentinários, conforme esperado em um

típico processo de desmineralização. No tempo de 15 segundos o EDTAT 17% e o SmearClear mostraram resultados similares enquanto o efeito de EDTAC 17% foi, significativamente, mais fraco. Entre 15 e 60 segundos, o EDTAT 17% e o SmearClear mostraram efeitos similares. Entretanto entre 180 e 300 segundos o EDTAT 17% revelou um efeito quelante mais forte do que o EDTAC 17% e o SmearClear. No tempo de 180 segundos, O EDTAC 17% ainda mostrava um efeito quelante mais fraco que o SmearClear, embora aos 300 segundos ambas as soluções tiveram efeitos similares. Em todos os tempos experimentais a solução de EDTA 17% teve efeito quelante mais forte.

Utilizando metodologia semelhante, De-Deus et al. (2008b) compararam o poder quelante do EDTA 17% (pH 7,7), EDTAC 17% (pH 7,7) e ácido cítrico 1% (pH 1,7) em tempos de exposição cumulativos (15, 30, 60 e 300 segundos). Nove molares de humanos foram selecionados e discos de dentina de aproximadamente 3 mm de espessura foram obtidos do terço cervical da raiz. Um procedimento metalográfico padrão foi empregado nas superfícies seccionadas, envolvendo lixas e pastas para polimento, para preparar as superfícies para o processo experimental e produzir *smear layer* padronizado. As amostras foram, aleatoriamente, divididas de acordo com a agente quelante utilizado (n=3). Um suporte especial foi construído para permitir a aplicação das soluções quelantes sem a remoção da amostra de dentina do microscópio. A amostra de referência (t=0), coberta com *smear layer*, foi colocada no recipiente e focada no microscópio. Foi aplicado 1 mL da solução quelante com uma pipeta e deixada em contato com a amostra por um certo período de tempo e, logo após, o processo foi interrompido utilizando 2 mL de água destilada. Os passos foram repetidos nos diferentes tempos cumulativos de desmineralização que revelam a evolução completa do tempo de efeito de cada solução quelante na superfície de dentina. A análise das amostras revelou que o ácido cítrico 1% mostrou ser mais eficaz em todos os períodos de tempo, exceto após 300 segundos, quando o EDTA 17% teve efeito similar. O EDTA 17% foi mais eficaz que o EDTAC 17% em todos os tempos experimentais, sendo este o quelante menos eficaz. A cinética de desmineralização promovida pelo ácido cítrico 1% foi, claramente, maior do que as outras substâncias analisadas, porém os autores observaram uma tendência de saturação da capacidade desmineralizadora do ácido cítrico 1% após o contato com as superfícies de dentina a partir dos 60 segundos.

Em estudo realizado em 2008, Reis et al. avaliaram, por meio de ESEM (já mencionado anteriormente) e CSOM, imagens de amostras tratadas com ácido cítrico 1% (pH 2,3), 5% (pH 2,0) e 10% (pH 1,8) e EDTA 17% (pH 7,7) utilizando tempos de

exposição cumulativos (15, 30, 60, 180 e 300 segundos). Entre 15 e 30 segundos, todas as amostras estavam livres de *smear layer* e, a análise das amostras que foram tratadas com ácido cítrico 10% revelou túbulos dentinários fortemente abertos. As três soluções de ácido cítrico foram mais eficazes que o EDTA 17%, exceto após 300 segundos, quando nenhuma diferença estatística foi observada entre EDTA 17% e ácido cítrico 1%. Entre as soluções de ácido cítrico, a concentração de 1% foi a menos eficaz para todos os tempos e as concentrações de 5% e 10% tiveram efeitos similares para 15 e 30 segundos.

4.4 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (AFM)

De-Deus et al. (2006) exploraram o potencial da AFM no exame das mudanças na microestrutura da superfície de dentina durante o processo de desmineralização. As sequências de imagens foram adquiridas para avaliar, qualitativamente, o efeito do EDTA 17% (pH 7,7), EDTAC 17% (pH 7,7) e ácido cítrico 10% (pH 1,4) na dentina radicular. O desenvolvimento desta metodologia, empregando microscopia em tempo real, foi o principal objetivo da pesquisa. Nove caninos superiores de humanos foram selecionados e armazenados em formalina 10% e, posteriormente, cada amostra foi embutida em um cilindro de resina epóxi para facilitar a manipulação e melhorar o preparo metalográfico. Discos de aproximadamente 5 mm foram cortados em baixa rotação com irrigação contínua. O procedimento metalográfico padrão foi empregue nas superfícies para prepará-las para o processo experimental e produzir um *smear layer* padronizado. As amostras foram divididas em 2 metades e distribuídas, aleatoriamente, em três grupos (n = 6 dentes) de acordo com o agente quelante utilizado. A ponta do microscópio foi colocada em contato com a amostra usando a menor força possível para minimizar qualquer modificação indesejada na superfície. Uma primeira imagem da superfície da dentina foi obtida a fim de escolher uma área adequada, livre de defeitos. A ponta foi recolhida e 5 mL de solução quelante foram inseridos no recipiente para fluidos do microscópio que continha a amostra. As imagens topográficas foram adquiridas continuamente durante o processo de desmineralização, permitindo a observação em tempo real da superfície da dentina. A sequência de aquisição das imagens levou de 400 a 550 segundos. Após análise das imagens obtidas das amostras, os autores concluíram que o ácido cítrico 10% foi a substância quelante mais eficaz, seguido do EDTA 17% e EDTAC 17%. A cinética de desmineralização do ácido cítrico

10% foi, claramente, maior do que as outras substâncias e causou danos maiores à matriz dentinária, principalmente, após 50 segundos. O EDTA 17% e o EDTAC 17% não tiveram diferenças estatísticas significativas.

4.5 ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO DE MASSA (ICP-AES)

Machado-Silveiro, Gonzalez-Lopez e Gonzalez-Rodriguez (2004) avaliaram *in vitro* a capacidade de desmineralização do ácido cítrico 1% (pH 2,2) e 10% (pH 1,8), do citrato de sódio 10% (pH 7,6) e do EDTA 17% (pH 7,2), após tempos de exposição de 5, 10 e 15 min. Oito caninos superiores recém-extraídos de humanos foram armazenados em água até a sua utilização e foram seccionados na junção cimento-esmalte usando um disco de diamante com constante irrigação. O canal foi ampliado com brocas de largo em baixa rotação e uma secção transversal de 3 mm foi feita no terço cervical de cada raiz utilizando um disco de diamante. Cada secção foi dividida igualmente em quatro porções de mesmo tamanho e forma, cada uma constituindo um modelo de prova e armazenadas em água destilada. Cada espécime foi submetido a três sucessivas imersões de 5 minutos (T5, T10 e T15) em 5 mL dos ácidos em temperatura ambiente. A solução não foi renovada entre as imersões. Para quantificar o cálcio, 2 mL de solução foram coletados de todas as amostras. Foram adicionados 2 mL de óxido de lantânio 0,2%, exceto à solução que continha citrato de sódio 10%, que foram adicionados 2 mL de óxido de lantânio 0,5% devido à quantidade escassa de cálcio neste extrato. O óxido de lantânio é usado como um tampão para evitar falsos positivos que podem ser produzidos em soluções aquosas que contém sódio, potássio e magnésio. Esses elementos podem comprometer a precisão da leitura da quantificação do cálcio através da formação de outros compostos. Uma mistura de acetileno foi usada como oxidante para todos os grupos, exceto para o grupo que continha solução de citrato de sódio que foi empregada uma mistura de óxido nitroso e acetileno. A leitura dos extratos foi expressa em mg/L e os resultados foram convertidos em mg de Ca. A eficácia do EDTA 17% e do ácido cítrico 1% e 10% na remoção do cálcio diminuiu ao longo dos três períodos de tempo, embora o ácido cítrico tenha apresentado resultados significantemente diferentes. O ácido cítrico 1% mostrou maior eficácia em 5 minutos (0,1050 mg), depois sua ação foi reduzida significantemente e manteve-se inalterada entre 10 e 15 minutos (0,0744 e 0,0763 mg, respectivamente). O ácido cítrico 10% apresentou comportamento semelhante, porém removeu duas vezes mais cálcio do que o

ácido cítrico 1% em cada período de tempo [0,2138 mg (5 minutos), 0,1950 mg (10 minutos) e 0,1475 mg (15 minutos)] . Não houve diferenças significativas na ação desmineralizadora do EDTA durante os três períodos de tempo [0,0563 mg (5 minutos), 0,0544 mg (10 minutos) e 0,0513 mg (15 minutos)]. O citrato de sódio, em comparação com as outras substâncias, removeu pouca quantidade de cálcio, embora sua ação tenha aumentado com o tempo [0,0035 mg (5 minutos), 0,0041 mg (10 minutos) e 0,0046 mg (15 minutos)].

Sousa e Silva (2005) compararam *in vitro* o efeito desmineralizante do ácido cítrico 1% (pH 1,0 e 7,4), EDTA 1% (pH 7,4), EGTA 1% (pH 7,4), CDTA 1% (pH 7,4) e solução salina (controle) sobre a dentina radicular. Foram utilizados 48 dentes de humanos, unirradiculados, com canais retos, recém-extraídos e com comprimentos similares. As coroas foram removidas transversalmente na junção cimento-esmalte e o comprimento de trabalho foi estabelecido utilizando uma lima #15 inserida até o forame apical e reduzindo-se 1 mm. Os canais foram instrumentados utilizando a técnica escalonada até o instrumento #70 tendo como memória o instrumento #45. Durante a instrumentação cada canal foi irrigado com 20 mL de NaOCl 1%. Em seguida, as raízes foram divididas, aleatoriamente, em seis grupos experimentais (n=8) de acordo com a solução irrigadora testada. Foram pipetados em todos os grupos 30 µL de cada solução no canal radicular e mantidos estáveis por 5 minutos. Após este tempo, 15 µL das soluções foram removidos e colocados em um recipiente com 5 mL de água deionizada. A concentração de cálcio foi determinada utilizando ICP-AES e expressa em µg/mL. De acordo com o estudo, o ácido cítrico 1% (pH 1,0) (11.93 ± 1.10 µg/mL) mostrou-se o mais eficaz na remoção do cálcio da dentina. Baixas concentrações de EDTA (2.63 ± 0.24 µg/mL) e EGTA (2.68 ± 0.35 µg/mL) tiveram efeitos similares entre si e foram mais eficazes que o CDTA (1.45 ± 0.09 µg/mL). Não foram observadas diferenças significativas entre o ácido cítrico 1% (pH 7,4) (0.18 ± 0.02 µg/mL) e a solução salina (0.82 ± 0.44 µg/mL), sendo o agente de menor eficácia na desmineralização da dentina.

Lottanti et al. (2008) avaliaram o cálcio dissolvido do sistema de canais após o tratamento com diferentes protocolos de irrigação (NaOCl 1% durante toda a instrumentação seguido por água, NaOCl 1% durante toda a instrumentação seguido de EDTA 17%, mistura 1:1 de NaOCl 2% e ácido etidrônico 18% durante toda a instrumentação e como irrigante final e NaOCl 1% durante toda a instrumentação seguido de ácido peracético 2,25%). O total de 20 mL de solução irrigante foi utilizado por amostra. Após a instrumentação e irrigação de uma amostra de cada grupo, os

produtos foram centrifugados em 4000 x g por 10 minutos. Na sequência, 10 mL foi transferido para um tubo de polipropileno com tampa e armazenado a 20°C até análise posterior. Após todos os produtos da diluição terem sido recolhidos, eles foram descongelados e analisados quanto ao teor de cálcio dissolvido utilizando um espectrofotômetro de absorção de massa. Os resultados foram expressos em ppm de íons cálcio no fluido. A irrigação com NaOCl 1% durante a instrumentação seguida por água como irrigante final não removeu o cálcio do sistema de canais (1±1 ppm). Os protocolos com EDTA 17% e ácido peracético 2,25 % dissolveram 62±13 e 57±10 ppm, respectivamente. O protocolo de irrigação com a mistura 1:1 de NaOCl 2% e ácido etidrílico 18% resultou em uma dissolução de 32±14 ppm de cálcio, que foi, significativamente, menor do que os outros dois protocolos de irrigação, porém, significativamente maior que o NaOCl/água.

Tabela 1 – Resumo

ANO	AUTORES	METODOLOGIA	ÁCIDOS	TEMPO	RESULTADOS	EXTRA
2011	Qian, Shen e Haapasalo	MEV	NaOCl 5,25% + EDTA 17% pH 7	5'	+	
			NaOCl 5,25% + EGTA 17% pH 7	5'	+	
			NaOCl 5,25% + ácido cítrico 10%	5'	+	
			EDTA 17% pH 7 + NaOCl 5,25%	1'	++	
			EGTA 17% pH 7 + NaOCl 5,25%	1'	++	
			ácido cítrico 10% + NaOCl 5,25%	1'	+++	
2009	Lottanti et al.	MEV e ICP-AES	NaOCl 1% + água deionizada	15' + 3'	0	
			NaOCl 1% + EDTA 17%	15' + 3'	++	
			Solução NaOCl 1%/ácido etidrílico 9%	15' + 3'	0	
			NaOCl 1% + ácido peracético 2,25%	15' + 3'	+	
2009	Moreira et al.	MEV e PLM	NaOCl 5,25% + EDTA 17%	30' + 5'	+	
			NaOCl 5,25%	30'	0	
			EDTA 17%	5'	+	
			Cloreto de sódio 0,9%	30'	0	
2008b	De-Deus et al.	CSOM	EDTA 17% pH 7,7	15", 30", 60", 180", 300"	++	
			EDTAC 17% pH 7,7	15", 30", 60", 180", 300"	+	
			ácido cítrico 1% pH 1,7	15", 30", 60", 180", 300"	+++	
2008a	De-Deus et al.	CSOM	EDTA 17% pH 7,7	15", 30", 60", 180", 300"	+++	
			EDTAC 17%	15", 30", 60", 180", 300"	+	
			EDTAT 17% pH 7,7	15", 30", 60", 180", 300"	++	
			SmearClear	15", 30", 60", 180", 300"	+	
2008	Reis et al.	CSOM e ESEM	EDTA 17% pH 7,7	15", 30", 60", 180", 300"	+	
			ácido cítrico 1% pH 2,3	15", 30", 60", 180", 300"	+	
			ácido cítrico 5% pH 2	15", 30", 60", 180", 300"	++	
			ácido cítrico 10% pH 1,8	15", 30", 60", 180", 300"	+++	
2008	Susin et al.	MEV	sem tratamento		0	
			ácido fosfórico 37%	20"	+++	
			iBond		+	
			Clearfil SE Bond		++	
2008	Brajdic et al.	MEV	ácido fosfórico 35%	10"	+	
			ácido fosfórico 35%	30"	+++	
2007	Tay, Gutmann e Pashley	MEV	NaOCl 5,25% (controle positivo)	2'	0	
			EDTA 17%	2'	++	Irrigação inicial NaOCl 1,3% 20'
			BIOPURE MTAD	2'	++	Irrigação inicial NaOCl 1,3% 20'
			NaOCl 5,25% (controle negativo)	2'	+++	Irrigação final EDTA 17%
2006	De-Deus et al.	AFM	EDTA 17% pH 7,7	400" a 550"	++	
			EDTAC 17% pH 7,7	400" a 550"	+	
			ácido cítrico 10% pH 1,4	400" a 550"	+++	
2005	Sousa e Silva	ICP-AES	EDTA 1% pH 7,4	5'	++	
			EGTA 1% pH 7,4	5'	++	
			CDTA 1% pH 7,4	5'	+	
			ácido cítrico 1% pH 1	5'	+++	
			ácido cítrico 1% pH 7,4	5'	0	
2004	Machado-Silveiro, Gonzalez-Lopez e Gonzalez-Rodriguez	ICP-AES	ácido cítrico 1% pH 2,2	5', 10', 15'	++	
			ácido cítrico 10% pH 1,8	5', 10', 15'	+++	
			Citrato de sódio 10% pH 7,6	5', 10', 15'	+	
			EDTA 17% pH 7,2	5', 10', 15'	++	
2001	Ayad	MEV	ácido poliacrílico 25%	10"	0	
			ácido fosfórico 10%	10"	0	
			ácido cítrico 10%	10"	+	
			ácido láctico 20%	10"	++	
			ácido fosfórico 32%	10"	+++	
1997	Matos et al.	MEV	ácido fosfórico 10%	15"	+++	
			ácido fosfórico 35%	15"	+++	
			ácido fosfórico 37,5%	15"	++	
			ácido maleico 10%	15"	0	

LEGENDA
 0 = sem desmineralização
 + = desmineralização superficial
 ++ = desmineralização moderada
 +++ = desmineralização severa

5 DISCUSSÃO

De acordo com os estudos analisados nesta revisão, o processo de desmineralização afeta tanto a dentina peritubular quanto a intertubular, provocando perda de conteúdo mineral e exposição de componentes orgânicos (MATOS et al., 1997; AYAD, 2001; MACHADO-SILVEIRO; GONZALEZ-LOPEZ; GONZALEZ-RODRIGUEZ, 2004; SOUSA; SILVA, 2005; DE-DEUS et al., 2006; 2008a; 2008b; TAY; GUTMANN; PASHLEY, 2007; BRAJDIC et al., 2008; SUSIN et al., 2008; REIS et al., 2008; LOTTANTI et al., 2009; MOREIRA et al., 2009; QIAN; SHEN; HAAPASALO, 2011) como a *lamina limitans*, filamentos e macromoléculas (THOMAS, 1984; BERTASSONI; STANKOSKA; SWAIN 2012). Por sua vez, a perda mineral promove aumento do diâmetro dos túbulos e, conseqüentemente, um aumento da permeabilidade, fator que pode ser determinante na adesão química e/ou mecânica de diferentes materiais à dentina (SAURO et al., 2010; HASHEMINIA et al., 2012; TEZVERGIL-MUTLUAY et al., 2013; AHUJA et al., 2014).

As matrizes orgânica e inorgânica da dentina podem ser afetadas pelo uso dos ácidos cítrico, fosfórico e EDTA (MATOS et al., 1997; AYAD, 2001; MACHADO-SILVEIRO; GONZALEZ-LOPEZ; GONZALEZ-RODRIGUEZ, 2004; SOUSA; SILVA, 2005; DE-DEUS et al., 2006; 2008a; 2008b; TAY; GUTMANN; PASHLEY, 2007; BRAJDIC et al., 2008; SUSIN et al., 2008; REIS et al., 2008; LOTTANTI et al., 2009; MOREIRA et al., 2009; QIAN; SHEN; HAAPASALO, 2011), porém o grau de interferência depende de vários fatores.

Segundo Qian, Shen e Haapasalo (2011), quando o NaOCl é utilizado antes da solução quelante, o revestimento de hidroxiapatita protege as fibras colágenas da ação de dissolução do NaOCl. No entanto, em situação oposta, quando o NaOCl é utilizado após a solução quelante, ataca diretamente o colágeno que já foi exposto pelos agentes ácidos, causando maiores alterações na dentina. Reis et al. (2008) verificaram uma relação direta entre concentração e desmineralização, corroborando os achados de De-Deus et al. (2006; 2008c). O tempo de exposição da dentina aos ácidos também é um fator determinante. A análise dos resultados de Brajdic et al. (2008) mostrou que o aumento do tempo de exposição causa maior alteração na morfologia dentinária, como demonstrado por De-Deus et al. (2006; 2008a; 2008b) e Reis et al. (2008). Porém, De-Deus et al. (2008a) afirmaram que o efeito desmineralizante pode ter sido superestimado, porque as soluções foram renovadas a cada tempo experimental.

Em contrapartida, Machado-Silveiro, Gonzalez-Lopez e Gonzalez-Rodriguez (2004) afirmaram que a eficácia do EDTA e do ácido cítrico na remoção do cálcio diminui ao longo do tempo. Essa diferença de resultados pode ser explicada pelo efeito auto-limitante das soluções quelantes e/ou pelo uso de diferentes metodologias. Enquanto a ICP-AES apenas quantifica o cálcio dissolvido da dentina (MACHADO-SILVEIRO; GONZALEZ-LOPEZ; GONZALEZ-RODRIGUEZ, 2004; SOUSA; SILVA, 2005), outras metodologias como a CSOM proporcionam a aquisição de dados quantitativos ligados à observação longitudinal do substrato (De-Deus et al., 2008a; 2008b; REIS et al., 2008). A possibilidade de observar as alterações microscópicas na morfologia da dentina durante o processo de desmineralização é determinante para ajudar no estabelecimento de um tempo ideal de aplicação clínica das soluções quelantes (De-Deus et al., 2008).

Outro fator que apresentou influência sobre o efeito das soluções na morfologia da dentina foi o pH (MACHADO-SILVEIRO; GONZALEZ-LOPEZ; GONZALEZ-RODRIGUEZ, 2004; SOUSA; SILVA, 2005; DE-DEUS et al., 2006; 2008; SUSIN et al., 2008; REIS et al., 2008). Susin et al. (2008) verificaram que soluções com pH mais baixo causam maiores alterações na dentina. Para Reis et al. (2008), as soluções com concentrações mais baixas e menor pH são mais eficazes e causam maior destruição da dentina peri e intertubular.

Diante da revisão realizada, todos os ácidos analisados mostraram-se capazes de causar alterações na dentina peritubular, desde a desmineralização superficial até sua completa remoção (MATOS et al., 1997; AYAD, 2001; DE-DEUS et al., 2006; 2008a; 2008b; TAY; GUTMANN; PASHLEY, 2007; BRAJDIC et al., 2008; SUSIN et al., 2008; REIS et al., 2008; LOTTANTI et al., 2009; MOREIRA et al., 2009; QIAN; SHEN; HAAPASALO, 2011), com a consequente exposição de fibras de colágeno na junção dentina peritubular-intertubular (AYAD, 2001).

Alterações importantes também foram observadas na dentina intertubular com o uso dos ácidos cítrico, fosfórico e EDTA (MATOS et al., 1997; DE-DEUS et al., 2006; 2008a; 2008b; TAY; GUTMANN; PASHLEY, 2007; BRAJDIC et al., 2008; SUSIN et al., 2008; REIS et al., 2008; LOTTANTI et al., 2009; MOREIRA et al., 2009; QIAN; SHEN; HAAPASALO, 2011). A desmineralização em diferentes graus dessa estrutura teve como consequências o aumento no número e no diâmetro dos túbulos dentinários e no percentual de superfícies com túbulos dentinários expostos. Além disso, foi possível observar uma diminuição no percentual de dentina intertubular e um colapso da rede

colagenosa, tornando as superfícies rugosas e irregulares, caracterizadas, em graus mais elevados, pelo processo de erosão (MATOS et al., 1997; AYAD, 2001; TAY; GUTMANN; PASHLEY, 2007; BRAJDIC et al., 2008; SUSIN et al., 2008; DE-DEUS et al., 2008; REIS et al., 2008; LOTTANTI et al., 2009; MOREIRA et al., 2009; QIAN; SHEN; HAAPASALO, 2011).

Teoricamente, a desmineralização observada poderia ser um fator contribuinte para a fratura de raiz, dependendo da profundidade, da espessura da raiz e da quantidade de dentina esclerosada presente (MAI et al., 2010; QIAN; SHEN; HAAPASALO, 2011). Por outro lado, a desmineralização ajuda na obtenção de paredes dentinárias limpas e livre de detritos e bactérias (QIAN; SHEN; HAAPASALO, 2011). Porém, segundo Marending et al. (2007), que mediram a resistência à flexão de suas amostras, a utilização do EDTA por curtos períodos de tempo não enfraquece a dentina e, além disso, Susin et al. (2008) afirmaram que a consequente desmineralização fornece um substrato ideal para a adesão dos variados materiais de uso odontológico.

Alguns autores demonstraram/afirmaram que os biomateriais são capazes de interagir químico-mecanicamente com a dentina radicular (REYES-CARMONA; FELIPPE; FELIPPE, 2009; DREGER et al., 2012). Nesses estudos, imagens obtidas por meio de MEV sugerem que essa interação resulta na formação de uma camada intermediária e de prolongamentos (*tags*) que se projetam para o interior dos túbulos dentinários (REYES-CARMONA; FELIPPE; FELIPPE, 2009; DREGER et al., 2012). Reyes-Carmona, Felipe e Felipe (2009) verificaram que a interação do MTA-dentina-PBS resultou na deposição de apatita carbonatada na interface material/dentina e no interior dos túbulos dentinários. Os autores afirmaram que foi possível distinguir, por meio de MEV, estruturas tipo *tags* que lembravam a dentina peritubular desmineralizada.

Em um estudo *in vivo*, Felipe (2012) também relatou a formação de estruturas similares aos *tags* na interface material-dentina. Porém, atentou para o fato de que tais estruturas também foram encontradas nas amostras do grupo-controle, nas quais não foi utilizado qualquer biomaterial. Este achado levantou a hipótese de que a suposta deposição intratubular fosse, na verdade, parte da dentina peritubular que remanesceu após a ação do ácido clorídrico empregado no preparo das amostras para MEV. Conforme Felipe (2012) é possível que nos estudos mencionados anteriormente (REYES-CARMONA; FELIPPE; FELIPPE, 2009; DREGER et al., 2012), tenha havido falha na interpretação de imagens, ou seja, que remanescentes da dentina peritubular

possam ter sido confundidos com deposição de apatita carbonatada no interior dos túbulos dentinários ou com a presença de adesivos ou materiais obturadores no interior dos túbulos. Essa hipótese é baseada nos achados de outros pesquisadores (ISOKAWA; TODA; KUBOTA, 1970; THOMAS & CARELLA, 1983; THOMAS, 1984; BERTASSONI; STANKOSKA; SWAIN, 2012), que observaram que a *lamina limitans* e outros componentes orgânicos da dentina peritubular remanesecem após o processo de desmineralização.

6 CONCLUSÃO

De acordo com a literatura revisada, conclui-se que os ácidos cítrico, fosfórico e EDTA:

- Afetam a estrutura da dentina;
- Atuam nos componentes orgânicos e inorgânicos da dentina;
- Causam a desmineralização das dentinas intertubular e peritubular.

REFERÊNCIAS

AHUJA, P. et al. Effectiveness of four different final irrigation activation techniques on smear layer removal in curved root canals: A scanning electron microscopy study. **Journal of Dentistry** (Tehran, Iran), v. 11, n. 1, p. 1, 2014.

AYAD, M. F. Effects of rotary instrumentation and different etchants on removal of smear layer on human dentin. **The Journal of Prosthetic Dentistry**, v. 89, p. 67-72, 2001.

BERTASSONI, L. E. et al. The dentin organic matrix – limitations of restorative dentistry hidden on the nanometer scale. **Acta Biomaterialia**, v. 8, n. 7, p. 2419–2433, 2012.

BERTASSONI, L. E.; STANKOSKA, K.; SWAIN, M. V. Insights into the structure and composition of the peritubular dentin organic matrix and the lamina limitans. **Micron**, v. 43, n. 2-3, p. 229–236, 2012.

BOSKEY, A. L. The role of extracellular matrix components in dentin mineralization. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 2, n. 3, p. 369–387, 1991.

BRAJDIC, D. et al. Influence of different etching times on dentin surface morphology. **Collegium Antropologicum**, v. 32, n. 3, p. 893-900, 2008.

ÇALT, S.; SERPER, A. Dentinal tubule penetration of root canal sealers after root canal dressing with calcium hydroxide. **Journal of Endodontics**, v. 25, n. 6, p. 431-433, 1999.

DAI, X. F.; CATE, A. R. T.; LIMEBACK, H. The extent and distribution of intratubular collagen fibrils in human dentine. **Archs Oral Biology**, v. 36, n. 10, p. 775–778, 1991.

DE DEUS, G. et al. The influence of filling technique on depth of tubule penetration by root canal sealer: A study using light microscopy and digital image processing. **Australian Endodontic Journal**, v. 30, n. 1, p. 23-28, 2004.

DE-DEUS, G. et al. Real-time atomic force microscopy of root dentine during demineralization when subjected to chelating agents. **International Endodontic Journal**, v. 39, p. 683–692, 2006.

DE-DEUS, G. et al. Co-site digital optical microscopy and image analysis: an approach to evaluate the process of dentine demineralization. **International Endodontic Journal**, v. 40, p. 441–452, 2007.

DE-DEUS, G. et al. Longitudinal and quantitative evaluation of dentin demineralization when subjected to EDTA, EDTAC, and citric acid: a co-site digital optical microscopy study. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology Endodontics**, v. 105, p. 391-397, 2008a.

DE-DEUS, G. et al. Dentine demineralization when subjected to EDTA with or without various wetting agents: a co-site digital optical microscopy study. **International Endodontic Journal**, v. 41, p. 279–287, 2008b.

DE DEUS, G. et al. Soft chelating irrigation protocol optimizes bonding quality of resilon/Epiphany root fillings. **Journal of Endodontics**, v. 34, n. 6, p. 703-705, 2008c.

DREGER, L. A. S. et al. Mineral trioxide aggregate and portland cement promote biomineralization In Vivo. **Journal of Endodontics**, v. 38, p. 324–329, 2012.

FELIPPE, G. S. Análise da biomineralização de diferentes bioagregados com a dentina. [Dissertação de Mestrado] Florianópolis: 2012.

GARBEROGLIO, R.; BECCE, C. Smear layer removal by root canal irrigants: a comparative scanning electron microscopic study. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Endodontics**, v. 78, n. 3, p. 359-367, 1994.

GOLDBERG, M. et al. Dentin: structure, composition and mineralization: The role of dentin ECM in dentin formation and mineralization. **Frontiers in bioscience** (Elite edition), v. 3, p. 711, 2012.

GOLDBERG, F.; SPIELBERG, C. The effect of EDTAC and the variation of its working time analyzed with scanning electron microscopy. **Oral Surgery**, v. 53, n. 1, p. 74-77, 1982.

GOTLIV, B. A.; VEIS, A. The composition of bovine peritubular dentin: Matching TOF-SIMS, scanning electron microscopy and biochemical component distributions. **Cells Tissues Organs**, v. 189, n. 1-4, p. 12–19, 2009.

HABELITZ, S. et al. Peritubular dentin lacks piezoelectricity. **Journal of Dental Research**, v. 86, n. 9, p. 908–911, 2007.

HASHEMINIA, S. M. et al. A comparative study of the removal of smear layer by two endodontic irrigants and Nd:YAG laser: A scanning electron microscopic study. **ISRN Dentistry**, v. 2012, p. 1–7, 2012.

IMBENI, V. et al. The dentin–enamel junction and the fracture of human teeth. **Nature Materials**, v. 4, n. 3, p. 229–232, 2005.

ISOKAWA, S.; TODA, Y.; KUBOTA, K. A scanning electron microscopic observation of etched human peritubular dentine. **Archs Oral Biology**, v. 15, p. 1303-1306, 1970.

LOPES, G. C. et al. Dental adhesion: Present state of the art and future perspectives. **Quintessence International**, v. 33, n. 3, p. 213-224, 2002.

LOTTANTI, S. et al. Effects of ethylenediaminetetraacetic, etidronic and peracetic acid irrigation on human root dentine and the smear layer. **International Endodontic Journal**, v. 42, p. 335–343, 2009.

MACHADO-SILVEIRO, L. F.; GONZALEZ-LOPEZ, S.; GONZALEZ-RODRIGUEZ, M. P. Decalcification of root canal dentine by citric acid, EDTA and sodium citrate. **International Endodontic Journal**, v. 37, p. 365–369, 2004.

MAI, S. et al. Differential aggressiveness of ethylenediamine tetraacetic acid in causing canal wall erosion in the presence of sodium hypochlorite. **Journal of Dentistry**, n. 38, p. 201–206, 2010.

MARSHALL, G. W. et al. The dentin substrate: structure and properties related to bonding. **Journal of Dentistry**, v. 25, n. 6, p. 441-458, 1997.

MARSHALL, G. W. et al. Nanomechanical properties of hydrated carious human dentin. **Journal of Dental Research**, v. 80, n. 8, p. 1768-1771, 2001.

MARENDING, M. et al. Impact of Irrigant Sequence on mechanical properties of human root dentin. **Journal of Endodontics**, v. 33, n. 11, p. 1325–1328, 2007.

MATOS, A. B. et al. Effects of acid etching on dentin surface: SEM morphological study. **Braz Dentistry Journal**, v. 8, n. 1, p. 35-41, 1997.

MEERBEEK, B. V. et al. Morphological aspects of the resin-dentin interdiffusion zone with different dentin adhesive systems. **Journal of Dental Research**, v. 71, n. 8, p. 1530–1540, 1992.

MOREIRA, D. M. et al. Structural analysis of bovine root dentin after use of different endodontics auxiliary chemical substances. **Journal of Endodontics**, v. 35, n. 7, p. 1023-1027, 2009.

MORRIS, M. D. et al. Effects of sodium hypochlorite and RC-prep on bond strengths of resin cement to endodontic surfaces. **Journal of Endodontics**, v. 27, n. 12, 2001.

PASHLEY, D. H. Clinical correlations of dentin structure and function. **The Journal of prosthetic dentistry**, v. 66, n. 6, p. 777–781, 1991.

PATIL, C.; UPPIN, V. Effect of endodontic irrigating solutions on the microhardness and roughness of root canal dentin: An in vitro study. **Indian Journal of Dental Research**, v. 22, n. 1, p. 22, 2011.

PERDIGÃO, J. et al. Morphological field emission-SEM study of the effect of six phosphoric acid etching agents on human dentin. **Dental Materials**, v. 12, p. 262-271, 1996.

QIAN, W.; SHEN, Y.; HAAPASALO, M. Quantitative analysis of the effect of irrigant solution sequences on dentin erosion. **Journal of Endodontics**, v. 37, n. 10, p. 1437-1441, out. 2011.

REIS, C. et al. Strong effect on dentin after the use of high concentrations of citric acid: An assessment with co-site optical microscopy and ESEM. **Dental Materials**, v. 24, p. 1608–1615, 2008.

REYES-CARMONA, J. F.; FELIPPE, M.S.; FELIPPE, W. T. Biomineralization ability and interaction of mineral trioxide aggregate and white portland cement with dentin in a phosphate-containing fluid. **Journal of Endodontics**, v. 35, n. 5, p. 731-736, 2009.

ROTSTEIN, I. et al. Histochemical analysis of dental hard tissues following bleaching. **Journal of Endodontics**, v. 22, n. 1, p. 23-26, 1996.

SANO, H. et al. Microporous dentin zone beneath resin-impregnated layer. **Operative dentistry**, v. 19, n. 2, p. 59–64, 1993.

SAURO, S. et al. Resin–dentin bonds to EDTA-treated vs. acid-etched dentin using ethanol wet-bonding. **Dental Materials**, v. 26, n. 4, p. 368–379, 2010.

SAYIN, T. C. et al. The effect of EDTA, EGTA, EDTAC, and tetracycline-HCl with and without subsequent NaOCl treatment on the microhardness of root canal dentin. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology Endodontics**, v. 104, n. 3, p. 418–424, 2007.

SEN, B. H.; WESSELINK, P. R.; TURKUN, M. The smear layer: a phenomenon in root canal therapy. **International Endodontic Journal**, v. 28, p. 141-148. 1995.

SHEN, Y.; HAAPASALO, M. Three-dimensional analysis of cutting behavior of nickel-titanium rotary instruments by microcomputed tomography. **Journal of Endodontics**, v. 34, n. 5, 2008.

SOUSA, S. M. G.; SILVA, T. L. Demineralization effect of EDTA, EGTA, CDTA and citric acid on root dentin: a comparative study. **Braz Oral Research**, v. 19, n. 3, p. 188-192, 2005.

SUSIN, A. H. et al. Comparative scanning electron microscopic study oh the effect of different dental conditioners on dentin micromorphology. **Journal of Applied Oral Science**, v. 16, n. 2, p. 100-105, 2008.

TAY, F. R.; GUTMANN, J. L.; PASHLEY, D. H. Microporous, demineralized collagen matrices in intact radicular dentin created by commonly used calcium-depleting endodontic irrigants. **Journal of Endodontics**, v. 33, n. 9, p. 1086-1090, 2007.

TEZVERGIL-MUTLUAY, A. et al. Effect of phosphoric acid on the degradation of human dentin matrix. **Journal of Dental Research**, v. 92, n. 1, p. 87–91, 2013.

THOMAS, H. F.; CARELLA, P. A scanning electron microscope study of dentinal tubules from un-erupted human teeth. **Archs Oral Biology**, v. 28, n. 12, p. 1125-1130, 1983.

THOMAS, H. F. The lamina limitans of human dentinal tubules. **Journal of Dental Research**, v. 63, n. 8, p. 1064-1066, 1984.

TJÄDERHANE, L. et al. Optimizing dentin bond durability: Control of collagen degradation by matrix metalloproteinases and cysteine cathepsins. **Dental Materials**, v. 29, n. 1, p. 116–135, 2013.

WHITE, R. R.; GOLDMAN, M.; LIN, P. S. The influence of the smeared layer upon dentinal tubule penetration by endodontic filling materials. Part II. **Journal of Endodontics**, v. 13, n. 8, p. 369-374, 1987.

ZEHNDER, M. et al. Chelation in root canal therapy reconsidered. **Journal of Endodontics**, v. 31, n. 11, p. 817-820, 2005.