



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ

ESCOLA DE CIÊNCIAS DA VIDA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO PERIODONTIA

ALINE DA MOTA DUCATE

BIOMODIFICAÇÃO QUÍMICA RADICULAR EM DENTES

PERIODONTALMENTE COMPROMETIDOS. ESTUDO COM MICROSCOPIA

ELETRÔNICA DE VARREDURA

Curitiba
2017

ALINE DA MOTA DUCATE

**BIOMODIFICAÇÃO QUÍMICA RADICULAR EM DENTES
PERIODONTALMENTE COMPROMETIDOS. ESTUDO COM MICROSCOPIA
ELETRÔNICA DE VARREDURA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia, Área de Concentração em Periodontia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sônia Mara Luczyszyn.

**Curitiba
2017**

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR
Biblioteca Central

Ducate, Aline da Mota
D824b 2017 Biomodificação química radicular em dentes periodontalmente comprometidos : estudo com microscopia eletrônica de varredura / Aline da Mota Ducate ; orientadora: Sônia Mara Luczyszyn. – 2017.
36 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 2017
Inclui bibliografias

1. Periodontia. 2. Doença periodontal. 3. Raspagem dentária. 4. Camada de esfregaço. I. Luczyszyn, Sônia Mara. II. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Pós-Graduação em Odontologia. III. Título.

CDD 20. ed. – 617.632



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Escola Saúde e Biotécnicas
Programa de Pós-Graduação em Odontologia


TERMO DE APROVAÇÃO

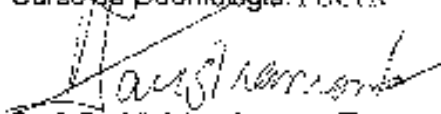
ALINE DA MOTA DUCATE

EFEITO DO CONDICIONAMENTO QUÍMICO DA SUPERFÍCIE RADICULAR EM DENTES PERIODONTALMENTE COMPROMETIDOS. ESTUDO COM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como parte dos requisitos parciais para a obtenção do Título de Mestre em Odontologia, Área de Concentração em Periodontia.

Orientador(a):


Prof. Dra. Sonia Mara Luczyszyn
Curso de Odontologia, PUCPR


Prof. Dr. Vinicius Augusto Tramontina
Curso de Odontologia, PUCPR


Prof. Dr. Sérgio Braga Fialal
Curso de Odontologia, UTP

Curitiba, 05 de maio de 2017.

Agradecimentos

Agradeço a Deus, pois sem ele não teria ao meu lado pessoas incríveis.

Agradeço aos meus pais, Jose Ducate e Maria, por todo apoio dado para que eu chegasse até aqui. Por todo amor e compreensão. Sem vocês eu não teria iniciado esta jornada, saibam que não seria nada sem vocês.

A minha irmã, pelas palavras de incentivo, e por me proporcionar os melhores momentos de distração e laser com meus pequenos sobrinhos, Rafael e Beatriz.

Agradeço a Pontificia Universidade Católica do Parana, a coordenação com a Professora Renata Iani Werneck, aos meus professores, em especial minha querida orientadora, Sonia Mara Luczyszyn, por permitir a cada dia a aplicação de meus conhecimentos.

Sumário

Resumo.....	1
Introdução	2
Materiais e Métodos.....	3
Resultados	8
Discussão.....	10
Conclusão	13
Referências.....	13
Artigo em Inglês	15
Summary.....	15
Introduction	16
Materials and methods.....	17
Results	21
Discussion.....	22
References.....	24
Anexo A - Parecer de comitê de ética.....	27
Anexo B- Metodologia Complementar	30
Análise Estatística.....	31

Resumo

O objetivo do presente estudo foi comparar, por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV), a remoção de *smear layer* de superfícies radiculares de dentes periodontalmente comprometidos após aplicação tópica de gel de EDTA a 24%, ácido fosfórico a 37%, ácido cítrico a 30% e gel de cloridrato de tetraciclina (50mg/ml). A partir de 135 dentes monorradiculares extraídos por comprometimento periodontal, 270 blocos (5mm x 5mm) foram obtidos e divididos aleatoriamente em 9 grupos: grupo controle, raspagem e alisamento (RAR); Ácido cítrico a 30% (RAR + 1 e 3 minutos); Ácido fosfórico a 37% (RAR + 1 e 3 minutos); EDTA a 24% (RAR + 1 e 3 minutos) e Cloridrato de tetraciclina 50mg/ml (RAR + 1 e 3 minutos). Após o tratamento, os espécimes foram preparados para análise por MEV. As fotomicrografias foram avaliadas por meio de um índice preconizado por Sampaio *et al.*, que considerou o grau de remoção de *smear layer*. Os dados foram analisados por meio dos testes de ANOVA ($p < 0,05$) e Games-Howell ($p < 0,05$). Todos os agentes foram capazes de remover a camada de *smear layer* e não houve diferença significativa entre a variação de tempo de 1 e 3 minutos para cada agente analisado ($p > 0,05$). O ácido fosfórico aplicado por 1 minuto promoveu maior remoção de *smear layer*, comparado aos outros agentes ($p < 0,05$).

Palavras-chave: Doença periodontal; raspagem radicular; biomodificação radicular; *smear layer*.

Introdução

A instrumentação e alisamento radicular com o uso de instrumentos manuais promove a formação de *smear layer* sobre a superfície radicular (1–3). Essa camada orgânica exerce efeito negativo sobre as células dos tecidos periodontais, interferindo sobre a migração e adesão celular, que são importantes para a cicatrização periodontal. Portanto, é possível que se complemente o tratamento mecânico com agentes químicos no intuito de melhorar a adesão das células do ligamento periodontal à superfície radicular (1,4). A implementação da terapia química sobre a superfície radicular exposta à doença periodontal pode ser uma alternativa adjunta ao tratamento mecânico convencional e tem como objetivo favorecer a estabilização do coágulo nos estágios iniciais da cicatrização periodontal, aumentando a adesão de células sanguíneas e de fibrina à superfície da raiz (3,5,6). Os agentes de desmineralização, quando aplicados sobre as superfícies radiculares, são capazes de remover o *smear layer*, eliminar endotoxinas, promover a abertura dos túbulos dentinários e expor a matriz de colágeno da dentina (2). Esta matriz de colágeno induz a quimiotaxia, a migração e a fixação de importantes células envolvidas no processo de cicatrização de feridas e na formação de nova inserção conjuntiva, contribuindo para a regeneração tecidual (3,5,6).

Diversos agentes têm sido estudados para uso conjunto ao tratamento periodontal convencional de raspagem e alisamento radicular a fim de remover a camada de *smear layer* e expôr os túbulos dentinários. Dentre estes agentes pode-se citar o ácido cítrico, o ácido etilenodiamino tetracético (EDTA), o cloridrato de tetraciclina e o ácido fosfórico (6,7).

O cloridrato de tetraciclina (pH 1,6) aplicado de forma tópica, é um antibiótico eficaz contra patógenos periodontais o qual pode permanecer sobre a superfície da raiz e então liberado lentamente em sua forma ativa, mantendo sua propriedade antimicrobiana durante pelo menos quatorze dias após seu uso. Ele pode agir com potencial para melhorar a cicatrização e regeneração periodontal como a desmineralização da superfície radicular e a remoção da camada *smear layer*, estabilização do coágulo de fibrina, aumento da quimiotaxia, adesão e crescimento de fibroblastos na superfície da raiz, inibição de metaloproteinases e aumento de fibronectina, que é uma glicoproteína da matriz extracelular (6–9).

O ácido cítrico possui ação bactericida e a desmineralização que ele promove sobre a dentina subjacente melhora a adesão do tecido conjuntivo e acelera a cementogênese (6–8), porém o baixo pH (pH 1) pode induzir efeitos citotóxicos quando em contato com o tecido conjuntivo, o que pode retardar a cicatrização do epitélio gengival (6,7,10).

O aumento no diâmetro dos orifícios dos túbulos dentinários observado após tratamento da superfície radicular com o uso de ácido cítrico e cloridrato de tetraciclina demonstrou que a exposição da matriz dentinária da raiz permite a formação de um coágulo de fibrina, considerado como fator importante para o processo de cura, uma vez que favorece a adesão de fibroblastos (2).

A solução de ácido etilenodiamino tetracético (EDTA) apresenta pH neutro (pH 7,0), é usada para remover seletivamente os componentes minerais da superfície da dentina. Esta característica ajuda a preservar as propriedades estruturais e bioquímicas da matriz de dentina exposta, não interferindo com a vitalidade do tecido circundante (7). A aplicação do gel de EDTA subgengivalmente após a raspagem e alisamento radicular não-cirúrgico pode remover a camada de *smear layer* e expor as fibras de colágeno em dentes humanos com periodontite (1).

O ácido fosfórico, com pH baixo (pH 1,94), tem sido amplamente utilizado na Odontologia Restauradora para remoção da camada de *smear layer* e desmineralização da dentina peritubular e intertubular. Por outro lado, não é frequentemente utilizado na terapia periodontal (10). Diversas concentrações de ácido fosfórico mostraram ser eficazes na remoção da *smear layer* (11).

Portanto, o objetivo do presente estudo foi comparar, por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV), a remoção de *smear layer* de superfícies radiculares de dentes periodontalmente comprometidos após aplicação tópica de gel de EDTA a 24%, ácido fosfórico a 37%, ácido cítrico a 30% e gel de cloridrato de tetraciclina (50mg/ml).

Materiais e Métodos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR) sob parecer número 1.583.340. (Anexo A)

Cento e trinta e cinco dentes monorradiculares provenientes do Banco de Dentes da PUCPR, extraídos por comprometimento periodontal, foram usados no estudo. Após a extração, os dentes foram mantidos em solução salina, a qual foi trocada semanalmente por até 2 meses.

Foram utilizados fragmentos dentários medindo aproximadamente 5 mm x 5 mm. Estes fragmentos foram obtidos com o uso do Disco Flex Diamantado (KG Sorensen[®], Barueri, SP, Brasil), fazendo-se dois cortes paralelos na superfície radicular vestibular do dente: um na junção cimento-esmalte (separando a coroa da raiz) e outro, 5 mm apicalmente (eliminando o ápice radicular). Foi realizado um corte longitudinal no sentido do canal radicular, separando os fragmentos correspondentes às faces vestibular e lingual. Com isso, foram obtidos 2 fragmentos de cada dente. Os fragmentos foram apreendidos utilizando-se uma pinça mosquito (Golgran[®], São Caetano do Sul, SP, Brasil) permitindo assim o procedimento de raspagem e alisamento radicular (RAR). Foram realizados 20 movimentos no sentido ápico-cervical, utilizando cureta de Gracey 5-6 (Hu-Friedy[®], Chicago, IL, EUA) para remoção do cálculo e cimento, de forma a promover a formação de *smear layer* sobre a superfície radicular. Em seguida, os espécimes foram distribuídos aleatoriamente em 9 grupos. (Tabela 1) (Anexo B- Metodologia)

Tabela 1: Distribuição dos grupos e tempo de observação

Grupos (n=30)	Tratamento	Tempo
Controle	RAR	
Ácido Cítrico 1	RAR + Ácido Cítrico 30%	1 minuto
Ácido Cítrico 3	RAR + Ácido Cítrico 30%	3 minutos
Ácido Fosfórico 1	RAR + Ácido Fosfórico 37%	1 minuto
Ácido Fosfórico 3	RAR + Ácido Fosfórico 37%	3 minutos
EDTA 1	RAR + EDTA 24%	1 minuto
EDTA 3	RAR + EDTA 24%	3 minutos
Cloridrato de Tetraciclina 1	RAR + Cloridrato de Tetraciclina 50mg/ml	1 minuto
Cloridrato de Tetraciclina 3	RAR + Cloridrato de Tetraciclina 50mg/ml	3 minutos

RAR: Raspagem e alisamento radicular, EDTA: ácido etilenodiamino tetracético

Após o condicionamento químico, com ácido cítrico 30% (FarmaAtiva, Fazenda Rio Grande, PR, Brazil), ácido fosfórico 37% (FGM[®]), EDTA (PrefGel[®]) e cloridrato de tetraciclina (FarmaAtiva, Fazenda Rio Grande, PR, Brazil), o qual foi realizado de forma passiva, todos os fragmentos foram lavados com 10 ml de solução salina e mantidos em estufa a 37°C por 24 horas para secagem. Em seguida, foram preparados para avaliação por meio de MEV.

Análise por microscopia eletrônica de varredura

O processamento para análise por microscopia eletrônica de varredura (Vega3/ Tescan[®]) foi realizado no Laboratório de Microscopia Eletrônica do CCEM - Centro de Caracterização e Ensaaios de Materiais da PUCPR.

As amostras de cada grupo foram posicionadas sobre o suporte porta amostras do MEV ("stub"), ajustando-se o feixe de elétrons que incidiu perpendicularmente à área central da amostra. Foi realizada impregnação metálica (Q150R ES/ Quorum[®]) com uma fina camada de ouro (20 a 30nm de espessura), a fim de promover o aumento da condutividade da superfície das amostras(12). Com as amostras preparadas, foram realizadas as fotomicrografias por meio de MEV, obtidas com ampliação de 3500 vezes.

Um único examinador, previamente calibrado usando método simples-cego, analisou 15% das amostras em 2 tempos diferentes com intervalo de 20 dias. Em seguida, foi aplicado o teste de erro de Dahlberg, nos casos onde a variância do erro for maior que 8%, a mensuração seria imprópria. Observa-se que o erro de Dahlberg foi de 5,11%, indicando que o avaliador reproduziu a medida de forma confiável ($p > 0,05$).

Para se determinar a remoção da *smear layer*, foi utilizado um modelo baseado em escores, preconizado por Sampaio *et al* (13). (Figura 1)

- Escore 1: superfície radicular sem camada de *smear layer* com os túbulos dentinários completamente abertos, sem evidências de camada de *smear layer* nos túbulos dentinários.
- Escore 2: superfície radicular sem camada de *smear layer* com os túbulos dentinários completamente abertos, mas com alguma evidência de camada de *smear layer* na entrada túbulos dentinários.
- Escore 3: superfície radicular sem camada de *smear layer* com os túbulos dentinários parcialmente abertos.

- Escore 4: superfície radicular coberta por camada de *smear layer* uniforme, com evidência de abertura dos túbulos dentinários.
- Escore 5: superfície radicular coberta por camada de *smear layer* uniforme, sem evidência de abertura dos túbulos dentinários.
- Escore 6: superfície radicular coberta por camada de *smear layer* irregular, com a presença de sulcos e/ ou detritos dispersos.

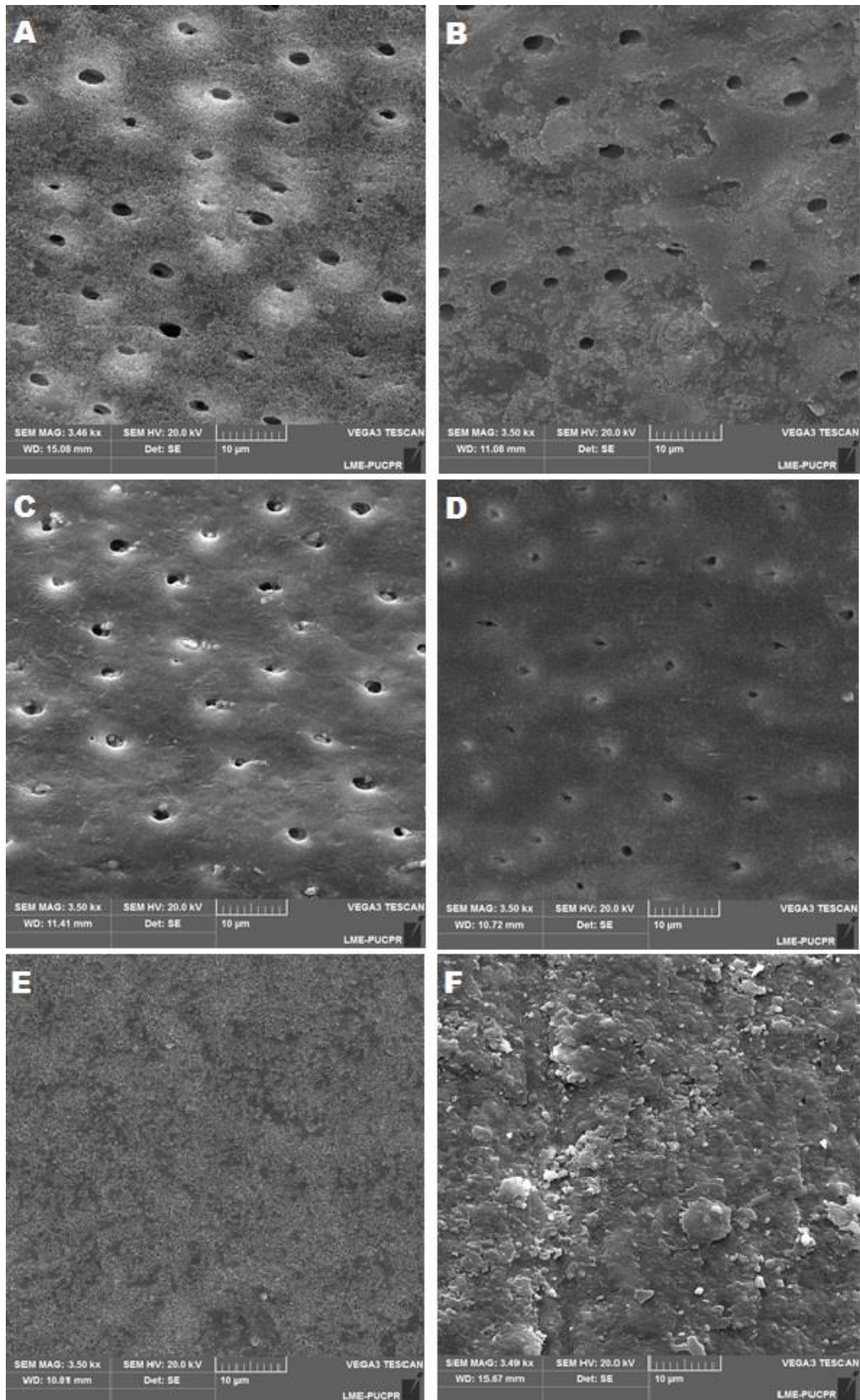


Figura 1: Exemplificação das fotomicrografias obtidas do próprio trabalho. (A) Escore 1, (B) Escore 2, (C) Escore 3, (D) Escore 4, (E) Escore 5, (F) Escore 6. (Ampliação 3500x)

Análise estatística

O grupo controle foi avaliado no tempo inicial e os grupos ácido fosfórico, ácido cítrico, EDTA e cloridrato de tetraciclina foram avaliados nos tempos de 1 e 3 minutos. Em cada um dos grupos e para cada tempo foi aplicado o teste ANOVA a 2 critérios (grupo e tempo) para avaliar se existia diferença no escore médio segundo grupo, tempo e na interação grupo *versus* tempo. Quando ANOVA indicou diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos, a comparação 2 a 2 foi feita utilizando o teste de comparações múltiplas paramétricas de Games-Howell para variâncias heterogêneas, uma vez que o teste de homogeneidade de variâncias de Levene indicou variâncias heterogêneas entre grupo e entre tempo e na interação grupo *versus* tempo. O nível de significância adotado em todos os testes foi de 5%.

Resultados

Foi possível observar que o grupo controle mostrou maior escore comparado aos demais grupos, independente de tempo e grupo ($p < 0,05$). Dentro de cada grupo que recebeu condicionamento ácido, comparando o tempo de aplicação do produto de 1 ou 3 minutos, não houve diferença estatística significativa ($p > 0,05$).

O grupo no qual foi utilizado cloridrato de tetraciclina obteve os maiores escores dentre todos os grupos tratados com agentes químicos nos 2 tempos. A diferença foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Considerando o tempo de aplicação de 1 minuto, foi observado que o ácido fosfórico obteve menor escore em relação ao ácido cítrico, com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). No entanto, comparado com o EDTA não houve diferença ($p > 0,05$).

Considerando o tempo de aplicação de 3 minutos, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ácido fosfórico, ácido cítrico e EDTA ($p > 0,05$).

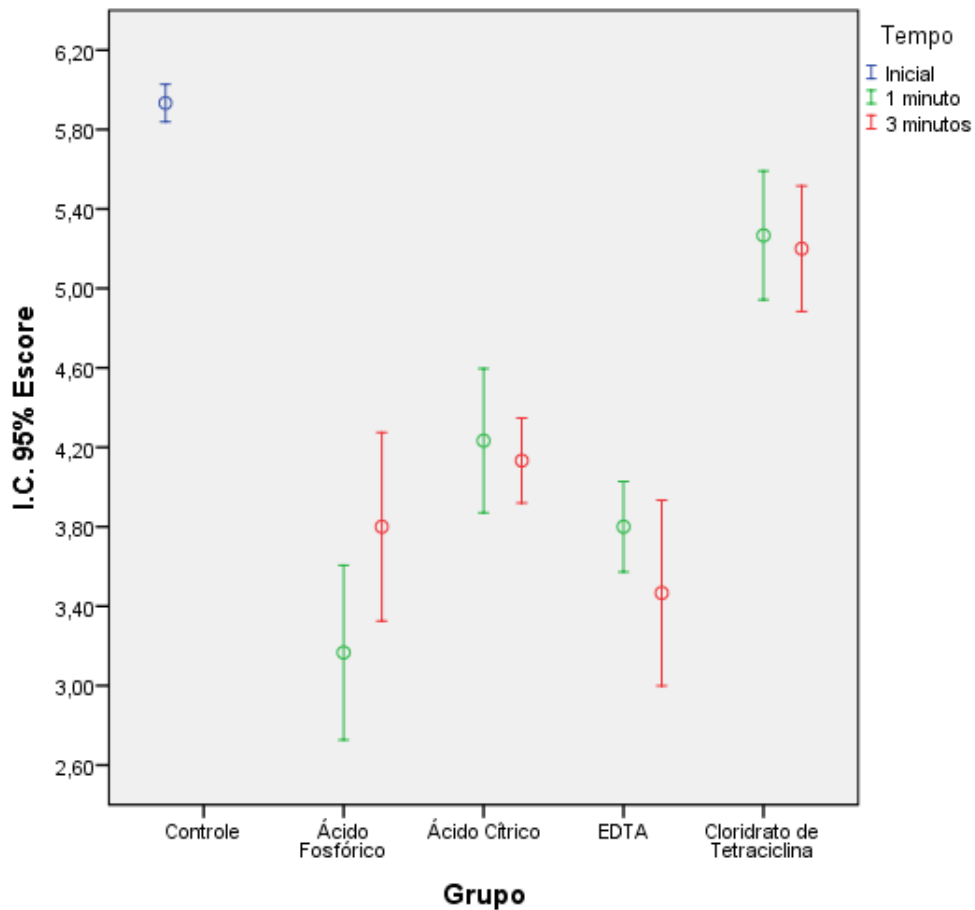


Tabela 2: Médias dos escores de cada grupo

Grupos (n=30)	Tempo	Média Escore
Controle		5,93
Ácido Fosfórico	1 minuto	3,16
Ácido Fosfórico	3 minutos	3,80
Ácido Cítrico	1 minuto	4,23
Ácido Cítrico	3 minutos	4,13
EDTA	1 minuto	3,80
EDTA	3 minutos	3,46
Cloridrato de Tetraciclina	1 minuto	5,26
Cloridrato de Tetraciclina	3 minutos	5,20

$p < 0,05$

Discussão

Apesar da literatura relevante disponível sobre o efeito desses agentes na remoção da *smear layer*, o pequeno número de estudos com metodologias semelhantes, intervalos de tempo e concentrações semelhantes limita a possibilidade de se fazer comparações válidas entre estes tratamentos (14).

O presente estudo foi realizado com o objetivo de avaliar os efeitos biológicos de diferentes agentes químicos utilizados para o condicionamento radicular na terapia periodontal. Para tanto, foram escolhidas substâncias já estudadas pela literatura, de fácil acesso e baixo custo (3). Dentro do que se pesquisou, não foram encontrados estudos na literatura que comparem EDTA, ácido cítrico, ácido fosfórico e o cloridrato de tetraciclina nos tempos utilizados no presente trabalho.

Foi observada no grupo controle (Figura 2), que recebeu apenas o tratamento mecânico, a presença de uma densa camada de *smear layer* irregular, com sulcos visíveis e muitos detritos. O tratamento tradicional de superfícies radiculares patologicamente alteradas tem sido baseado na remoção mecânica de placa, cálculo e cemento contaminado, produzindo uma camada de *smear layer* de aproximadamente $2,15\mu\text{m}$ de espessura, a qual está intimamente associada à superfície da raiz e pode removida apenas com o uso de agentes desmineralizantes (8,15). A biomodificação radicular utilizando substâncias ácidas ou agentes quelantes tem sido eficaz na remoção da camada de *smear layer* e na exposição de fibras de colágeno, contribuindo para a melhor qualidade na reparação tecidual (6).

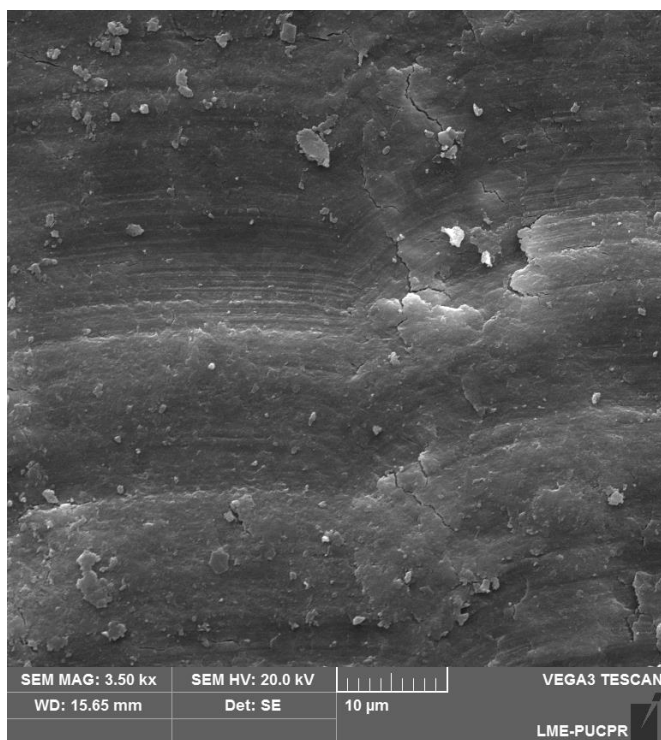


Figura 2: Exemplificação das fotomicrografias obtidas do próprio trabalho. Grupo controle. (Ampliação 3500x)

Há estudos onde o ácido cítrico e o EDTA foram aplicados por meio de fricção vigorosa e, com isso, levaram a uma desmineralização excessiva e consequente dissolução da superfície dentária, o que, ao contrário do que se deseja, produziu uma camada extensa de *smear layer* (13,16,17). No presente trabalho, cujo método de aplicação dos agentes foi feito de forma passiva, não foram observadas áreas hiperdesmineralizadas, uma vez que os túbulos dentinários estavam bem expostos. Portanto, a forma de aplicação passiva, na qual o agente químico é apenas aplicado e mantido em contato com a superfície da raiz pelo tempo determinado, pode ser indicada com segurança.

A remoção da *smear layer* e a desobstrução dos túbulos dentinários foi mais eficaz quando se utilizou o ácido fosfórico a 37% e o EDTA a 24%, seguida pelo ácido cítrico e o cloridrato de tetraciclina. O ácido fosfórico pode ser uma alternativa viável para a descontaminação da superfície radicular, por este motivo optou-se pelo seu uso. Estes resultados corroboram os de outros trabalhos, onde se relatou que a remoção da *smear layer* foi mais eficaz quando comparado com outras concentrações como 5%, 6%, 7%, 32%, pois estimulou a maior extração de íon de cálcio da dentina (11,14,18). No entanto, estes mesmos autores relatam

que a utilização de ácido fosfórico em altas concentrações, pode ter efeito citotóxico (11,14,18). Com isso, em procedimentos clínicos, deve-se ter cuidado ao aplica-lo sobre as raízes, de forma a evitar ao máximo seu contato com os tecidos adjacentes.

Neste trabalho, o grupo cloridrato de tetraciclina, aplicado tanto em 1 quanto em 3 minutos, na concentração de 50mg/ml foi o que mostrou o maior escore dentre todos os agentes. Foi observada a presença de grande quantidade de resíduos do produto os quais permaneceram mesmo após a lavagem e, por este motivo, os túbulos dentinários mostraram-se obliterados. No entanto, um estudo de Nagata *et al.*(19) relatou que o condicionamento radicular com 10 mg/ml de cloridrato de tetraciclina durante 4 minutos resultou na remoção de *smear layer*, abertura dos túbulos dentinários e exposição de fibrilas de colágeno. Estas diferenças podem estar relacionadas a fatores como a concentração, modo de aplicação e duração do período de condicionamento (9,19). Contudo, há evidências de que concentrações elevadas de tetraciclina sobre os tecidos podem prejudicar os estágios iniciais da cicatrização de feridas, impedindo a formação de nova inserção conjuntiva (19,20).

Neste trabalho, a aplicação dos agentes condicionantes no tempo de 1 minuto, mostrou que o ácido fosfórico teve um melhor comportamento na remoção da *smear layer*, comparado com o ácido cítrico ($p < 0,05$), porém não diferiu quando comparado com o EDTA ($p > 0,05$). O comportamento do EDTA sobre as raízes condicionadas neste estudo concorda com outro trabalho, onde a aplicação de EDTA foi eficaz na remoção de *smear layer* após aplicação por 1 minuto, e não foram observados sinais de erosão dentinária(11).

No presente estudo notou-se que para todos os agentes condicionantes individualmente, não houve diferença significativa entre a variação de tempo de 1 e 3 minutos. Com isso, considerando-se a otimização do tempo em ambiente clínico, sugere-se a utilização do tempo de 1 minuto. A escolha pelo ácido fosfórico a 37% deve considerar a importância de se evitar o contato do mesmo com os tecidos circundantes

É de extrema importância que os efeitos da biomodificação radicular continuem a ser investigados, a fim de se avaliar a viabilidade clínica aliada a resultados que venham a contribuir para uma melhor adesão celular sobre raízes de dentes tratados periodontalmente e, se possível, para a regeneração tecidual.

Conclusão

De acordo com os resultados do presente estudo, pode-se concluir que todos os agentes utilizados foram capazes de remover a camada de *smear layer*. Não houve diferença significativa entre os tempos de aplicação (1 e 3 minutos) para cada agente analisado.

Referências

1. Martins Júnior W, De Rossi A, Samih Georges Abi Rached R, Rossi MA. A scanning electron microscopy study of diseased root surfaces conditioned with EDTA gel plus Cetavlon after scaling and root planing. *Journal of Electron Microscopy*. 2011;167–75.
2. Amaral NG Do, Rezende MLR De, Hirata F, Rodrigues MGS, Sant'ana ACP, Greggi SLA, et al. Comparison among four commonly used demineralizing agents for root conditioning: a scanning electron microscopy. *Journal of applied oral science*. 2011;469–75.
3. Silva AC, Christian C, Moura G, Afonso J, Magalhães D De, Dechichi P, et al. Biological Effects of a Root Conditioning Treatment on Periodontally Affected Teeth - An In Vitro Analysis. *Braz Dent J*. 2016;27:160–8.
4. Cekici A, Maden I, Yildiz S, San T, Isik G. Evaluation of blood cell attachment on Er: Yag laser applied root surface using scanning electron microscopy. *Int J Med Sci*. 2013;10(5):560–6.
5. Amireddy R, Rangarao S, Madapusi BT. Efficacy of a root conditioning agent on fibrin network formation in periodontal regeneration: A SEM evaluation. *J Indian Soc Periodontol*. 2011;15:228–34.
6. Chahal GS, Chhina K, Chhabra V, Bhatnagar R, Chahal A. Effect of citric acid, tetracycline, and doxycycline on instrumented periodontally involved root surfaces: A SEM study. *J Indian Soc Periodontol*. 2014;18:32–7.
7. Cavassim R, Leite FRM, Zandim DL, Dantas AAR, Rached RSGA, Sampaio JEC. Influence of concentration, time and method of application of citric acid and sodium citrate in root conditioning. *J Appl Oral Sci*. 2012 Jun;20:376–83.
8. Shetty B, Dinesh A, Seshan H. Comparitive effects of tetracyclines and citric acid on dentin root surface of periodontally involved human teeth: A

- scanning electron microscope study. *J Indian Soc Periodontol.* 2008;12:8–15.
9. Ishi E de P, Dantas AAR, Carvalho Batista LH, Onofre MA, Sampaio JEC. Smear Layer Removal and Collagen Fiber Exposure Using Tetracycline Hydrochloride Conditioning. *J Contemp Dent Pract.* 2008;9:1–12.
 10. Soares PBF, Castro CG, Branco CA, Magalhães D, Neto AJF, Soares CJ. Mechanical and acid root treatment on periodontally affected human teeth - a scanning electronic microscopy. *Brazilian J Oral Sci.* 2010;9:128–32.
 11. Khalighinejad N, Hasheminia M, Feizinafar M. The efficacy of 5% maleic acid, 6% phosphoric acid and 17% EDTA in smear layer removal - a scanning electron microscopic investigation. *serbian Dent J.* 2013;60:191–9.
 12. Castro LAS de. *Processamento de Amostras para Microscopia Eletrônica de Varredura.* 1º Ed. Embrapa Clima Temperado, editor. 2002.
 13. Sampaio JEC, Campos FP, Pilatti GL, Theodoro LH, Leite FRM. A scanning electron microscopy study of root surface smear layer removal after topical application of EDTA plus a detergent. *J Appl oral Sci.* 2005;13:247–52.
 14. Prado M, Gusman H, Gomes BPFA, Simao RA. Scanning electron microscopic investigation of the effectiveness of phosphoric acid in smear layer removal when compared with EDTA and citric acid. *J Endod.* 2011;37:255–8.
 15. Minocha T, Rahul A. Comparison of fibrin clot adhesion to dentine conditioned with citric acid, tetracycline, and ethylene diamine tetra acetic acid: An in vitro scanning electron microscopic study. *J Indian Soc Periodontol.* 2012;16(3):333–41.
 16. Cavassim R, Leite FRM, Zandim DL, Dantas AAR, Sampaio JEC. Smear layer removal for collagen fiber exposure after citric acid conditionings. *J Contemp Dent Pract.* 2010;11:1–10.
 17. Fontanari LA, Pinto SCS, Cavassim R, Spin-Neto R, Ishi E de P, Sampaio JEC. Influence of dental exposure to oral environment on smear layer removal and collagen exhibition after using different conditioning agents. *Braz Dent J.* 2011;22(6):479–85.
 18. Pérez-Heredia M, Ferrer-Luque CM, González-Rodríguez MP, Martín-Peinado FJ, González-López S. Decalcifying effect of 15% EDTA, 15%

- citric acid, 5% phosphoric acid and 2.5% sodium hypochlorite on root canal dentine. *Int Endod J.* 2008 May;41:418–23.
19. Nagata MJ, Bosco AF, Leite CM, Melo LG, Sundefeld ML. Healing of dehiscence defects following root surface demineralization with tetracycline: a histologic study in monkeys. *J Periodontol.* 2005;76:908–14.
 20. Fernandes LA, Martins TM, Almeida JM de, Nagata MJH, Theodoro LH, Garcia VG, et al. Experimental periodontal disease treatment by subgingival irrigation with tetracycline hydrochloride in rats. *J Appl Oral Sci.* 2010;18:635–40.

Artigo em Inglês

Summary

The objective of the present study was to compare, by scanning electron microscopy (SEM), the removal of smear layer from root surfaces of periodontal impaired teeth after topical application of 24% EDTA gel, 37% phosphoric acid, citric acid to 30% and tetracycline hydrochloride gel (50mg / ml). From 135 monoradicular teeth extracted by periodontal involvement, 270 blocks (5mm x 5mm) were obtained and randomly divided into 9 groups: control group, scaling and smoothing (SRP); 30% citric acid (SRP + 1 and 3 minutes); 37% phosphoric acid (SRP + 1 and 3 minutes); 24% EDTA (SRP + 1 and 3 minutes) and tetracycline hydrochloride 50mg / ml (SRP +1 and 3 minutes). After treatment, the specimens were prepared for SEM analysis. The photomicrographs were evaluated by means of an Sampaio *et al.* index that considered the degree of removal of smear layer. Data was analyzed using the ANOVA ($p < 0,05$) and Games-Howell ($p < 0,05$) tests. All the agents were able to remove the smear layer and there was no significant difference between the time variation of 1 and 3 minutes for each agent analyzed ($p > 0.05$). Phosphoric acid applied for 1 minute promoted greater removal of smear layer, compared to other agents ($p < 0.05$).

Keywords: Periodontal disease; Root scaling; Root biomodification; Smear layer.

Introduction

The instrumentation and root planing with the use of manual instruments promotes smear layer formation on the root surface (1-3). This organic layer exerts a negative effect on the cells of the periodontal tissues, interfering on the cell migration and adhesion, which are important for the periodontal healing. Therefore, it is possible to complement the mechanical treatment with chemical agents in order to improve the adhesion of the cells of the periodontal ligament to the radicular surface (1,4). The implementation of chemical therapy with the use of chemical substances on the root surface exposed to periodontal disease may be an alternative to the conventional mechanical treatment and aims to promote the stabilization of the clot in the early stages of periodontal healing, increasing the adhesion of blood cells and fibrin on the root surface (3,5,6). The demineralization agents, when applied on the root surfaces, are able to remove the smear layer, eliminate endotoxins, promote the opening of the dentinal tubules and expose the dentin collagen matrix (2). This collagen matrix induces the chemotaxis, migration and fixation of important cells involved in the wound healing process and the formation of new conjunctive insertion, contributing to tissue regeneration (3,5,6).

Several agents have been studied for joint use in conventional periodontal treatment of scaling and root planing in order to remove the smear layer and expose the dentinal tubules. These agents include citric acid, ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), tetracycline hydrochloride and phosphoric acid (6,7).

Tetracycline hydrochloride (pH 1.6) applied topically is an effective antibiotic against periodontal pathogens which can remain on the root surface and then released slowly into its active form, maintaining its antimicrobial property for at least fourteen days after its use. It may act with potential to improve healing and periodontal regeneration such as demineralization of the root surface and removal of the smear layer, stabilization of the fibrin clot, increased chemotaxis, adhesion and growth of fibroblasts on the root surface, inhibition of metalloproteinases and fibronectin, which is an extracellular matrix glycoprotein. (6-9)

Citric acid has a bactericidal action and the demineralization that it promotes on the underlying dentin improves connective tissue adhesion and accelerates cementogenesis (6-8), but low pH (pH 1) may induce cytotoxic effects when in contact with connective tissue, which may delay the healing of the gingival epithelium (6,7,10).

The increase in the diameter of the holes of the dentinal tubules observed after treatment of the root surface with the use of citric acid and tetracycline hydrochloride showed that the exposure of the dentinal matrix of the root allows the formation of a fibrin clot, considered as important factor for the process of cure, since it favors adhesion of fibroblasts (2).

The solution of ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) which presents neutral pH (pH 7.0), used to selectively remove the mineral components from the surface of the dentin. This feature helps to preserve the structural and biochemical properties of the exposed dentin matrix, not interfering with the vitality of the surrounding tissue (7). Applying EDTA gel subgingivally after scaling and non-surgical root planing can remove the smear layer and expose the collagen fibers in human teeth with periodontitis (1).

Phosphoric acid, with low pH (pH 1.94), has been widely used in restorative dentistry to remove the smear layer and demineralize peritubular and intertubular dentin. On the other hand, it is not frequently used in periodontal therapy (10). Several concentrations of phosphoric acid have been shown to be effective in removing the smear layer (11).

Therefore, the objective of the present study was to compare, by scanning electron microscopy (SEM), the removal of smear layer from root surfaces of periodontally impaired teeth after topical application of 24% EDTA gel, 37% phosphoric acid, 30% citric acid and tetracycline hydrochloride gel (50mg / ml)

Materials and methods

This study was approved by the Research Ethics Committee of the Pontifical Catholic University of Paraná (PUCPR) under opinion number 1,583,340. (Annex A)

One hundred and thirty-five monoradicular teeth from the PUCPR's Teeth Bank, extracted by periodontal compromise, were use in the study. After extraction, the teeth were keep in saline solution, which was change weekly for up to 2 months.

Dental fragments measuring approximately 5 mm x 5 mm were use. These fragments were obtained with the use of Diamond Flexed Disc (KG Sorensen®, Barueri, SP, Brazil), making two parallel cuts on the vestibular root surface of the tooth: one at the cementum-enamel junction (separating the crown from the root) and Another, 5 mm apically (eliminating the root apex). A longitudinal cut was make in the direction of the root canal, separating the fragments corresponding to the buccal and lingual surfaces. Two fragments of each tooth were obtain. The fragments were seized using a mosquito forceps (Golgran®, São Caetano do Sul, SP, Brazil), thus allowing the scaling and root planing (SRP) procedure. Twenty movements were perform in the apico-cervical direction, using Gracey's curette 5-6 (Hu-Friedy®, Chicago, IL, USA) to remove the stone and cement, in order to promote smear layer formation on the root surface. Then, the specimens were randomized into 9 groups. (Table 1)

Table1: Distribiotion of groups and observation time

Groups (n=30)	Treatment	Time
Control	SRP	
Citric Acid 1	SRP + Citric Acid 30%	1 minute
Citric Acid 3	SRP + Citric Acid 30%	3 minutes
Phosphoric Acid 1	SRP + Phosphoric Acid 37%	1 minute
Phosphoric Acid 3	SRP + Phosphoric Acid 37%	3 minutes
EDTA 1	SRP + EDTA 24%	1 minute
EDTA 3	SRP + EDTA 24%	3 minutes
Tetracycline Hydrochloride 1	SRP + Tetracycline Hydrochloride 50mg/ml	1 minute
Tetracycline Hydrochloride 3	SRP + Tetracycline Hydrochloride 50mg/ml	3 minutes

SRP: scaling and root planing, EDTA: ethylenediamine tetraacetic acid

After the chemical conditioning, with citric acid 30% (FarmaAtiva, Fazenda Rio Grande, PR, Brazil), phosphoric acid 37% (FGM®), EDTA (PrefGel®) and tetracycline hydrochloride (FarmaAtiva, Fazenda Rio Grande, PR, Brazil), which

was carried out passively, all the fragments were washed with 10 ml of saline solution and kept in an oven at 37 ° C for 24 hours for drying. They were then prepared for evaluation by means of MEV.

Scanning electron microscopy analysis

The scanning electron microscopy (Vega3 / Tescan®) processing was carry out at the Electronic Microscopy Laboratory of the CCEM - Materials Characterization and Testing Center of PUCPR.

The samples of each group were position on the sample holder of the SEM ("stub"), adjusting the electron beam that was perpendicular to the central area of the sample. Metal impregnation (Q150R ES / Quorum®) was perform with a thin layer of gold (20 to 30 nm thick) in order to increase the surface conductivity of the samples. With the samples prepared, the photomicrographs were to do by means of SEM, obtained with a magnification of 3500 times.

A single examiner, previously calibrated using a single-blind method, analyzed 15% of samples at 2 different times with a 20 day interval. Then, the Dahlberg error test was applie, in cases where the error variance was greater than 8%, the measurement would be inappropried. It is observed that Dahlberg's error was 5.11%, indicating that the evaluator reproduced the measure reliably ($p > 0.05$).

In order to determine the removal of the smear layer, a model based on scores was use, as recommended by Sampaio et al. (12). (Figure 1)

- Score 1: root surface without smear layer with the dentin tubules completely open, with no evidence of a layer of smear layer in the dentin tubules.
- Score 2: root surface without smear layer with the dentin tubules completely open, but with some evidence of a layer of smear layer at the entrance of dentinal tubules.
- Score 3: root surface without smear layer with partially opened dentinal tubules.
- Score 4: root surface covered by a layer of uniform smear layer, with evidence of opening of the dentinal tubules.
- Score 5: root surface covered by layer of uniform smear layer, with no evidence of opening of dentinal tubules.
- Score 6: root surface covered by layer of irregular smear layer, with the presence of furrows and / or scattered debris.

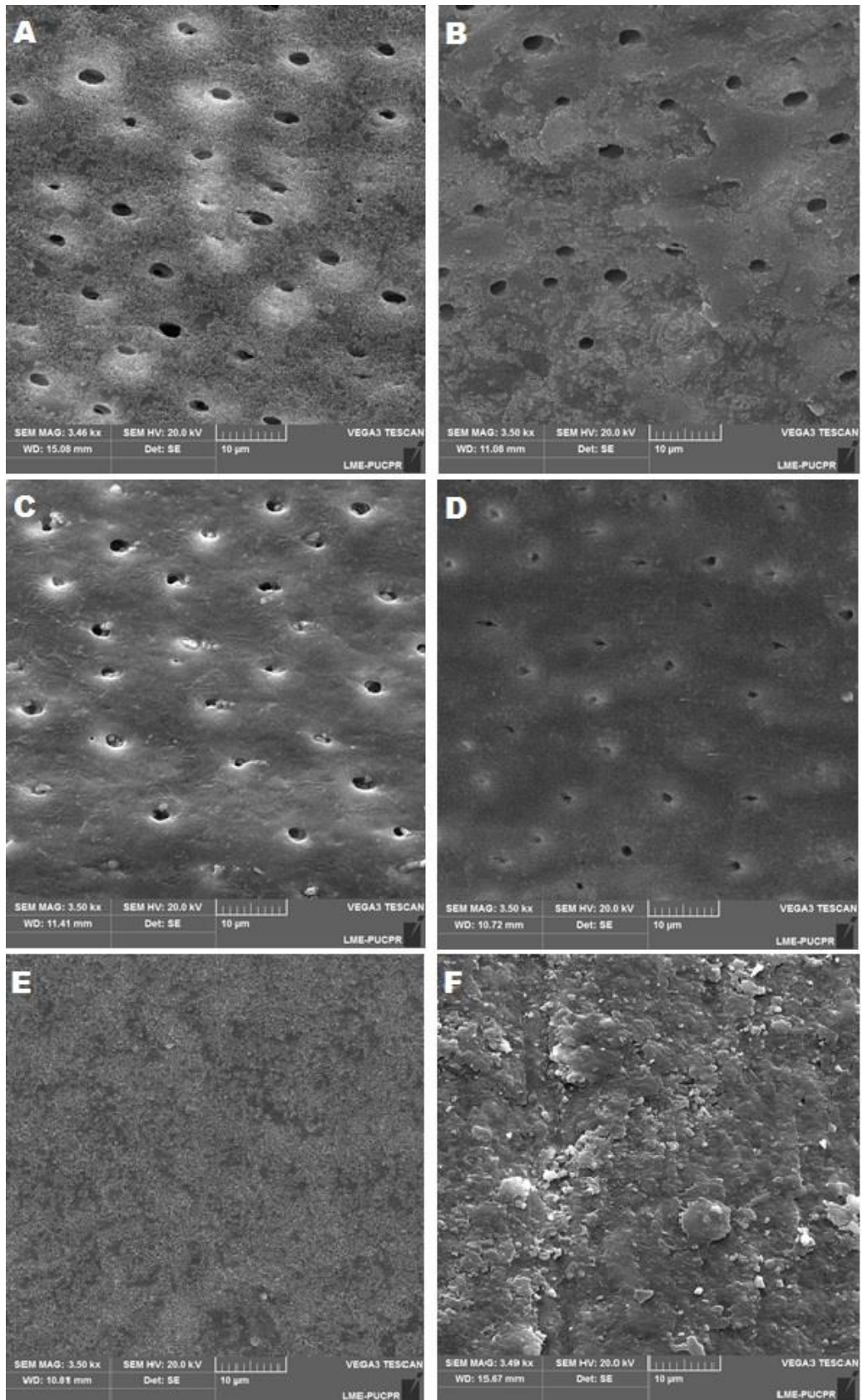


Figure 1: Exemplification of the photomicrographs obtained from the work itself. (A) Score 1, (B) Score 2, (C) Score 3, (D) Score 4, (E) Score 5, (F) Score 6. (Magnification 3500x)

Statistical analysis

The control group was evaluate at the initial time and the groups phosphoric acid, citric acid, EDTA and tetracycline hydrochloride were evaluated at the time of 1 and 3 minutes. In each of the groups and for each time the ANOVA test was applied to 2 criteria (group and time) to evaluate if there was difference in the mean score according to group, time and group interaction versus time. When ANOVA indicated a statistically significant difference between treatments, comparison 2 to 2 was made using Games-Howell's multiple parametric comparison test for heterogeneous variances, since the Levene variance homogeneity test indicated heterogeneous variances between group and between Time and group interaction versus time. The level of significance adopted in all tests was 5%.

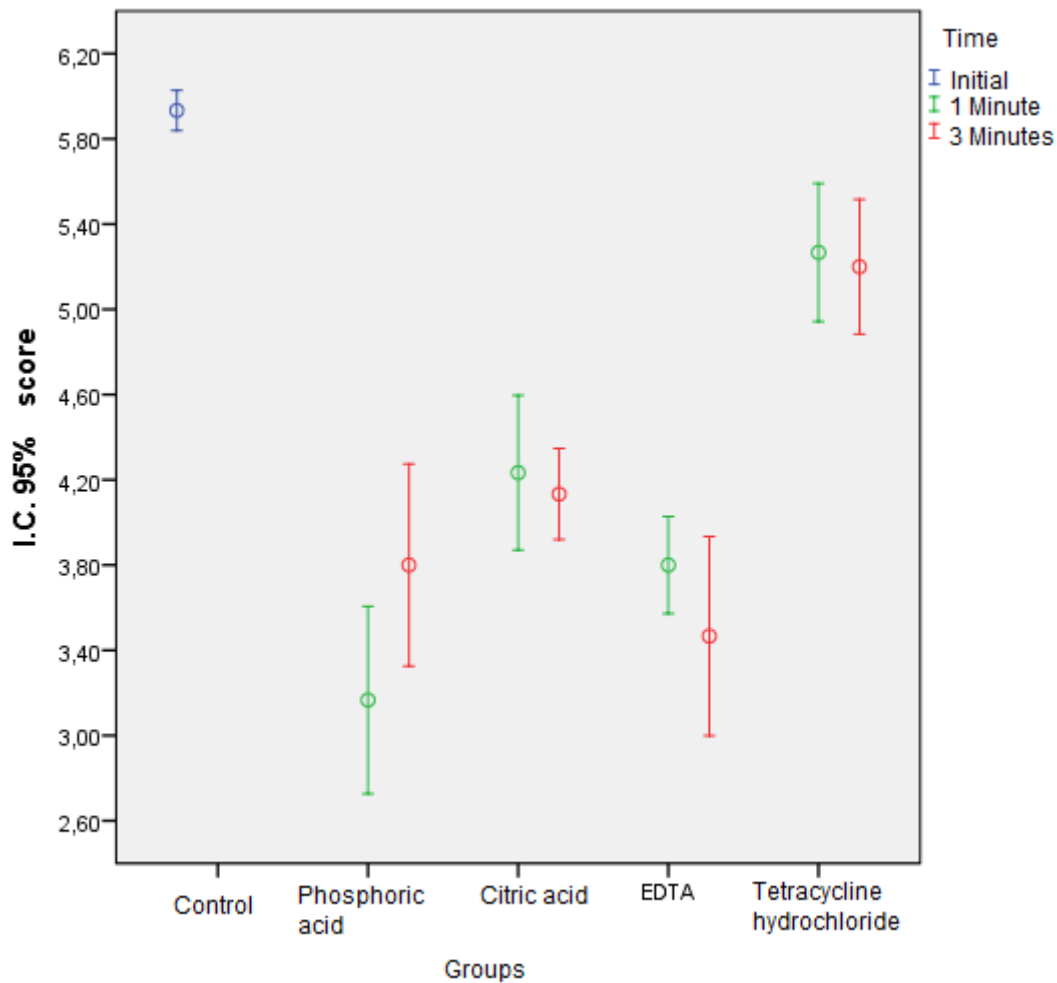
Results

It was observed that the control group showed a higher score compared to the other groups, independent of time and group ($p < 0.05$). Within each group that received acid conditioning, comparing the time of application of the product of 1 or 3 minutes, there was no significant statistical difference ($p > 0.05$).

The group in which tetracycline hydrochloride was used had the highest scores among all groups treated with chemical agents in the 2 times. The difference was statistically significant ($p < 0.05$).

Considering the time of application of 1 minute, it was observed that phosphoric acid obtained a lower score in relation to citric acid, with a statistically significant difference ($p < 0.05$). However, compared with EDTA, there was no difference ($p > 0.05$).

Considering the time of application of 3 minutes, there was no statistically significant difference between the groups phosphoric acid, citric acid and EDTA ($p > 0.05$).



Discussion

Despite the relevant literature on the effect of these agents on smear layer removal, the small number of studies with similar methodologies, time intervals, and similar concentrations limits the possibility of making valid comparisons between these treatments (13).

The present study was carried out with the objective of evaluating the biological effects of different chemical agents used for root conditioning in periodontal therapy. For this purpose, substances already studied in the literature were chosen, with easy access and low cost (3). In this study, no studies were found in the literature comparing EDTA, citric acid, phosphoric acid and tetracycline hydrochloride at the times used in the present study.

It was observed in the control group, which received only the mechanical treatment, the presence of a dense layer of irregular smear layer, with visible furrows and many debris. The traditional treatment of pathologically altered root

surfaces has been based on the mechanical removal of plaque, calculus and contaminated cement, producing a smear layer of approximately 2.15µm thick, which is closely associated with the surface of the root and can be removed only with The use of demineralizing agents (8,14). Root biomodification using substances acid or chelating agents has been effective in removing the smear layer and exposing collagen fibers, contributing to the better quality of tissue repair (6).

There are studies where citric acid and EDTA were applied by means of vigorous friction and, with this, led to an excessive demineralization and consequent dissolution of the dental surface, which, contrary to what is desired, produced an extensive layer of smear layer (12,15,16). In the present study, which method of application of the agents was done passively, no hyperdensalised areas were observed, since the dentinal tubules were well exposed. Therefore, the passive application form, in which the chemical agent is only applied and maintained in contact with the surface of the root for the given time, can be safely indicated.

Removal of the smear layer and the unblocking of the dentinal tubules were more effective when using 37% phosphoric acid and 24% EDTA, followed by citric acid and tetracycline hydrochloride. Phosphoric acid may be a viable alternative for the decontamination of the root surface, for this reason it was chosen for its use. These results corroborate those of other studies, where it was reported that the removal of smear layer was more effective when compared to other concentrations such as 5%, 6%, 7%, 32%, as it stimulated the greater extraction of calcium ion from the dentin (11,13,17). However, these same authors report that the use of phosphoric acid in high concentrations may have a cytotoxic effect (11,13,17). Therefore, in clinical procedures, care must be taken when apply it on the roots, in order to avoid to the maximum its contact with the adjacent tissues.

In this study, the tetracycline hydrochloride group, applied in 1 and 3 minutes at a concentration of 50mg / ml was the one that showed the highest score among all the agents. The presence of large amounts of residues of the product were observe, which remained even after washing and, for this reason, the dentinal tubules were obliterate. However, a study by Nagata et al. (18) reported that root conditioning with 10 mg / ml of tetracycline hydrochloride for 4

minutes resulted in the removal of smear layer, opening of dentinal tubules and exposure of collagen fibrils. These differences may be related to factors such as concentration, mode of application and duration of the conditioning period (9,18). However, there is evidence that high concentrations of tetracycline on tissues may impair the initial stages of wound healing, preventing the formation of new conjunctival insertion (18,19).

In this work, the application of the conditioning agents in the time of 1 minute, showed that the phosphoric acid had a better behavior in the removal of the smear layer, compared to the citric acid ($p < 0.05$), but did not differ when compared to the EDTA ($p > 0.05$). The behavior of the EDTA on the conditioned roots in this study agrees with another work, where the application of EDTA was effective in the removal of smear layer after application for 1 minute, and no signs of dentin erosion were observed (11).

In the present study it was noticed that for all the conditioning agents individually, there was no significant difference between the time variation of 1 and 3 minutes. Thus, considering the optimization of the time in clinical environment, it is suggested to use the time of 1 minute. The choice of 37% phosphoric acid should consider the importance of avoiding contact with the surrounding tissues.

It is of extreme importance that the effects of root biomodification continue to be investigated in order to evaluate the clinical feasibility associated with results that contribute to a better cell adhesion on roots of teeth treated periodontally and, if possible, for tissue regeneration. According to the results of the present study, it can be concluded that all the agents used were able to remove the layer of smear layer. There was no significant difference between application times (1 and 3 minutes) for each agent analyzed.

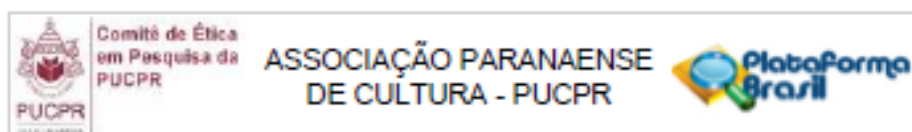
References

1. Martins Júnior W, De Rossi A, Samih Georges Abi Rached R, Rossi MA. A scanning electron microscopy study of diseased root surfaces conditioned with EDTA gel plus Cetavlon after scaling and root planing. *Journal of Electron Microscopy*. 2011;167–75.
2. Amaral NG Do, Rezende MLR De, Hirata F, Rodrigues MGS, Sant'ana

- ACP, Greggi SLA, et al. Comparison among four commonly used demineralizing agents for root conditioning: a scanning electron microscopy. *Journal of applied oral science*. 2011;469–75.
3. Silva AC, Christian C, Moura G, Afonso J, Magalhães D De, Dechichi P, et al. Biological Effects of a Root Conditioning Treatment on Periodontally Affected Teeth - An In Vitro Analysis. *Braz Dent J*. 2016;27:160–8.
 4. Cekici A, Maden I, Yildiz S, San T, Isik G. Evaluation of blood cell attachment on Er: Yag laser applied root surface using scanning electron microscopy. *Int J Med Sci*. 2013;10(5):560–6.
 5. Amireddy R, Rangarao S, Madapusi BT. Efficacy of a root conditioning agent on fibrin network formation in periodontal regeneration: A SEM evaluation. *J Indian Soc Periodontol*. 2011;15:228–34.
 6. Chahal GS, Chhina K, Chhabra V, Bhatnagar R, Chahal A. Effect of citric acid, tetracycline, and doxycycline on instrumented periodontally involved root surfaces: A SEM study. *J Indian Soc Periodontol*. 2014;18:32–7.
 7. Cavassim R, Leite FRM, Zandim DL, Dantas AAR, Rached RSGA, Sampaio JEC. Influence of concentration, time and method of application of citric acid and sodium citrate in root conditioning. *J Appl Oral Sci*. 2012 Jun;20:376–83.
 8. Shetty B, Dinesh A, Seshan H. Comparative effects of tetracyclines and citric acid on dentin root surface of periodontally involved human teeth: A scanning electron microscope study. *J Indian Soc Periodontol*. 2008;12:8–15.
 9. Ishi E de P, Dantas AAR, Carvalho Batista LH, Onofre MA, Sampaio JEC. Smear Layer Removal and Collagen Fiber Exposure Using Tetracycline Hydrochloride Conditioning. *J Contemp Dent Pract*. 2008;9:1–12.
 10. Soares PBF, Castro CG, Branco CA, Magalhães D, Neto AJF, Soares CJ. Mechanical and acid root treatment on periodontally affected human teeth - a scanning electronic microscopy. *Brazilian J Oral Sci*. 2010;9:128–32.
 11. Khalighinejad N, Hasheminia M, Feizinafar M. The efficacy of 5% maleic acid, 6% phosphoric acid and 17% EDTA in smear layer removal - a scanning electron microscopic investigation. *serbian Dent J*. 2013;60:191–9.
 12. Sampaio JEC, Campos FP, Pilatti GL, Theodoro LH, Leite FRM. A scanning

- electron microscopy study of root surface smear layer removal after topical application of EDTA plus a detergent. *J Appl oral Sci.* 2005;13:247–52.
13. Prado M, Gusman H, Gomes BPFA, Simao RA. Scanning electron microscopic investigation of the effectiveness of phosphoric acid in smear layer removal when compared with EDTA and citric acid. *J Endod.* 2011;37:255–8.
 14. Minocha T, Rahul A. Comparison of fibrin clot adhesion to dentine conditioned with citric acid, tetracycline, and ethylene diamine tetra acetic acid: An in vitro scanning electron microscopic study. *J Indian Soc Periodontol.* 2012;16(3):333–41.
 15. Cavassim R, Leite FRM, Zandim DL, Dantas AAR, Sampaio JEC. Smear layer removal for collagen fiber exposure after citric acid conditionings. *J Contemp Dent Pract.* 2010;11:1–10.
 16. Fontanari LA, Pinto SCS, Cavassim R, Spin-Neto R, Ishi E de P, Sampaio JEC. Influence of dental exposure to oral environment on smear layer removal and collagen exhibition after using different conditioning agents. *Braz Dent J.* 2011;22(6):479–85.
 17. Pérez-Heredia M, Ferrer-Luque CM, González-Rodríguez MP, Martín-Peinado FJ, González-López S. Decalcifying effect of 15% EDTA, 15% citric acid, 5% phosphoric acid and 2.5% sodium hypochlorite on root canal dentine. *Int Endod J.* 2008 May;41:418–23.
 18. Nagata MJ, Bosco AF, Leite CM, Melo LG, Sundefeld ML. Healing of dehiscence defects following root surface demineralization with tetracycline: a histologic study in monkeys. *J Periodontol.* 2005;76:908–14.
 19. Fernandes LA, Martins TM, Almeida JM de, Nagata MJH, Theodoro LH, Garcia VG, et al. Experimental periodontal disease treatment by subgingival irrigation with tetracycline hydrochloride in rats. *J Appl Oral Sci.* 2010;18:635–40.

Anexo A - Parecer de comitê de ética



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Efeito do condicionamento ácido da superfície radicular em dentes periodontalmente comprometidos. Estudo com microscopia eletrônica de varredura

Pesquisador: Aline da mota ducate

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 55369416.6.0000.0020

Instituição Proponente: Pontifícia Universidade Católica do Paraná

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.583.340

Apresentação do Projeto:

O objetivo do presente projeto de pesquisa é comparar, por microscopia eletrônica de varredura (MEV) a remoção do smear layer e a abertura dos túbulos dentinários após a aplicação tópica de ácido etileno diamino tetracético (EDTA), ácido fosfórico, ácido cítrico e tetraciclina sobre raízes de dentes humanos periodontalmente comprometidos.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: O objetivo do presente estudo é comparar, por microscopia eletrônica de varredura (MEV) a remoção do smear layer e a abertura dos túbulos dentinários após a aplicação tópica de ácido etileno diamino tetracético (EDTA), ácido fosfórico, ácido cítrico e tetraciclina sobre raízes de dentes humanos periodontalmente comprometidos.

Objetivo Secundário: Avaliar a influência do tempo de aplicação destas substâncias na remoção do smear layer.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos e benefícios foram adequadamente apresentados, estando em acordo com a Res. CNS

Endereço: Rua Imaculada Conceição 1155
Bairro: Prado Velho CEP: 80.215-901
UF: PR Município: CURITIBA
Telefone: (41)3271-2103 Fax: (41)3271-2103 E-mail: nep@pucpr.br

Continuação do Parecer: 1.583.340

466/12.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto de pesquisa usará dentes do banco de dentes da PUC, apresentando metodologia em consonância com os objetivos propostos e estando em acordo com a Res. CNS 466/12. Entretanto, não apresentou o termo de autorização para uso dos dentes do Banco de Dentes da PUC.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Termo de autorização do banco de dentes foi apresentado, agora. Foi apresentado, ainda, um termo de conhecimento feito pelo pesquisador principal, onde consta que o mesmo tem conhecimento que o Banco de Dentes da PUC não fará nenhum tratamento nos dentes a serem utilizados, bem como que todo o estudo se realizará no laboratório de Técnica Operatória da Escola de Ciências da Vida.

Recomendações:

Não há recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto está em plena consonância com a Res. CNS 466/12.

Considerações Finais a critério do CEP:

Lembramos aos senhores pesquisadores que, no cumprimento da Resolução 466/12, o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) deverá receber relatórios anuais sobre o andamento do estudo, bem como a qualquer tempo e a critério do pesquisador nos casos de relevância, além do envio dos relatos de eventos adversos, para conhecimento deste Comitê. Salientamos ainda, a necessidade de relatório completo ao final do estudo.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEPPUCPR de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciá-la antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requerido por este CEP em qualquer tempo.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Endereço: Rua Imaculada Conceição 1155	CEP: 80.215-901
Bairro: Prado Velho	
UF: PR	Município: CURITIBA
Telefone: (41)3271-2103	Fax: (41)3271-2103
	E-mail: nep@puopr.br

Continuação do Parecer: 1.583.340

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_697728.pdf	31/05/2016 21:23:13		Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	BANCO1.jpg	31/05/2016 21:19:16	Aline da mota ducate	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	BANCO.jpg	31/05/2016 21:17:13	Aline da mota ducate	Aceito
Folha de Rosto	assDecano0001.pdf	14/04/2016 20:51:57	Aline da mota ducate	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetoat.docx	13/04/2016 09:56:53	Aline da mota ducate	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Aprovação da CONEP:

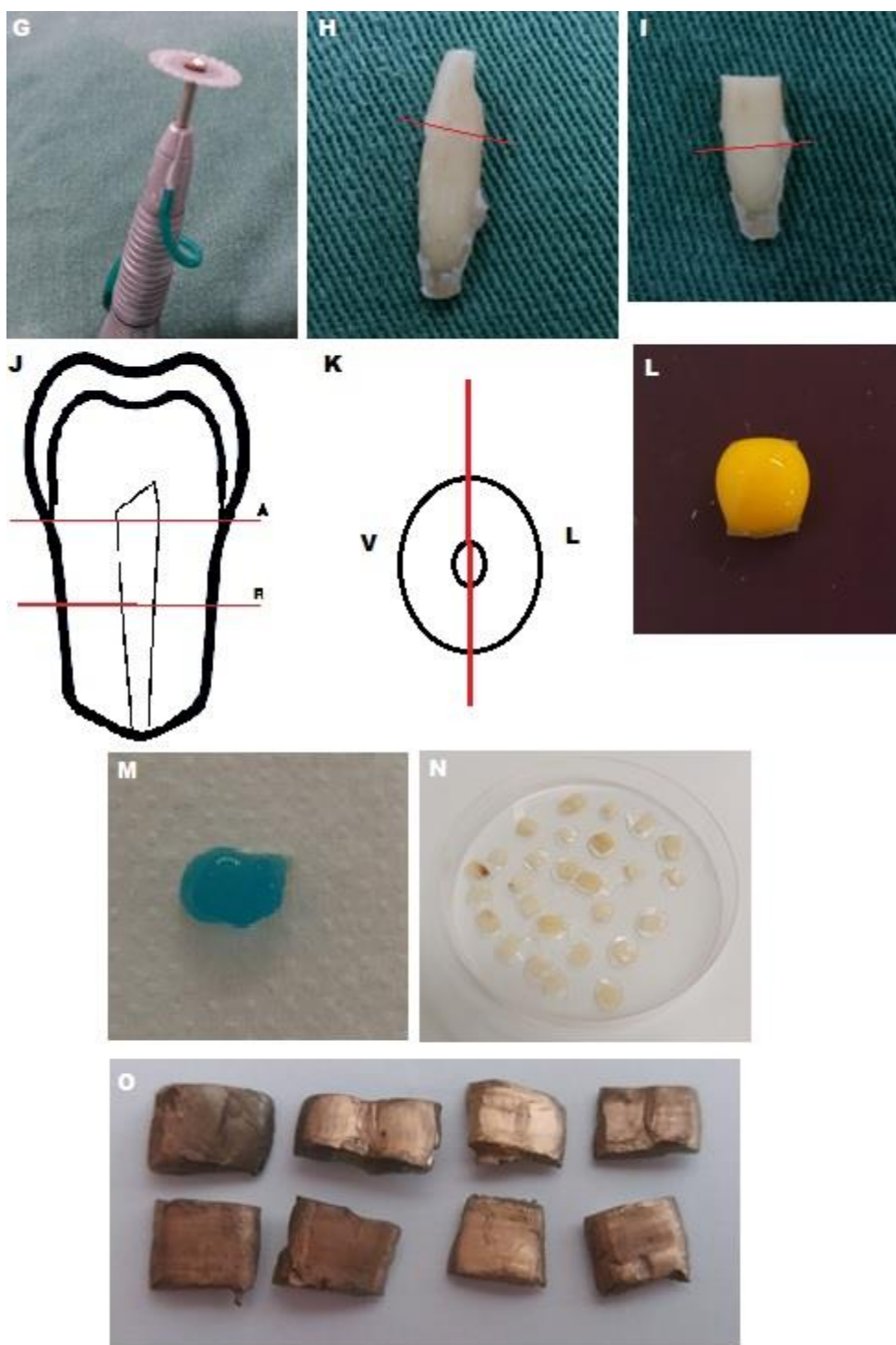
Não

CURITIBA, 09 de Junho de 2016

Assinado por:
NAIM AKEL FILHO
(Coordenador)

Endereço: Rua Imaculada Conceição 1155	CEP: 80.215-901
Bairro: Prado Velho	
UF: PR	Município: CURITIBA
Telefone: (41)3271-2103	Fax: (41)3271-2103
E-mail: nep@pucpr.br	

Anexo B- Metodologia Complementar



(G) Disco Flex Diamantado (KG Sorensen, Barueri, SP, Brasil), (H) Corte Junção cimento-esmalte, eliminando a coroa, (I) Corte 5mm abaixo, eliminando porção apical, (J) Esquema corte A e corte B, (K) Corte longo eixo dividindo a vestibular e lingual/palatina, (L) Fragmento com Cloridrato de Tetraciclina 50mg/ml, (M) Fragmento com Ácido fosfórico 37% (N) Fragmentos já lavados

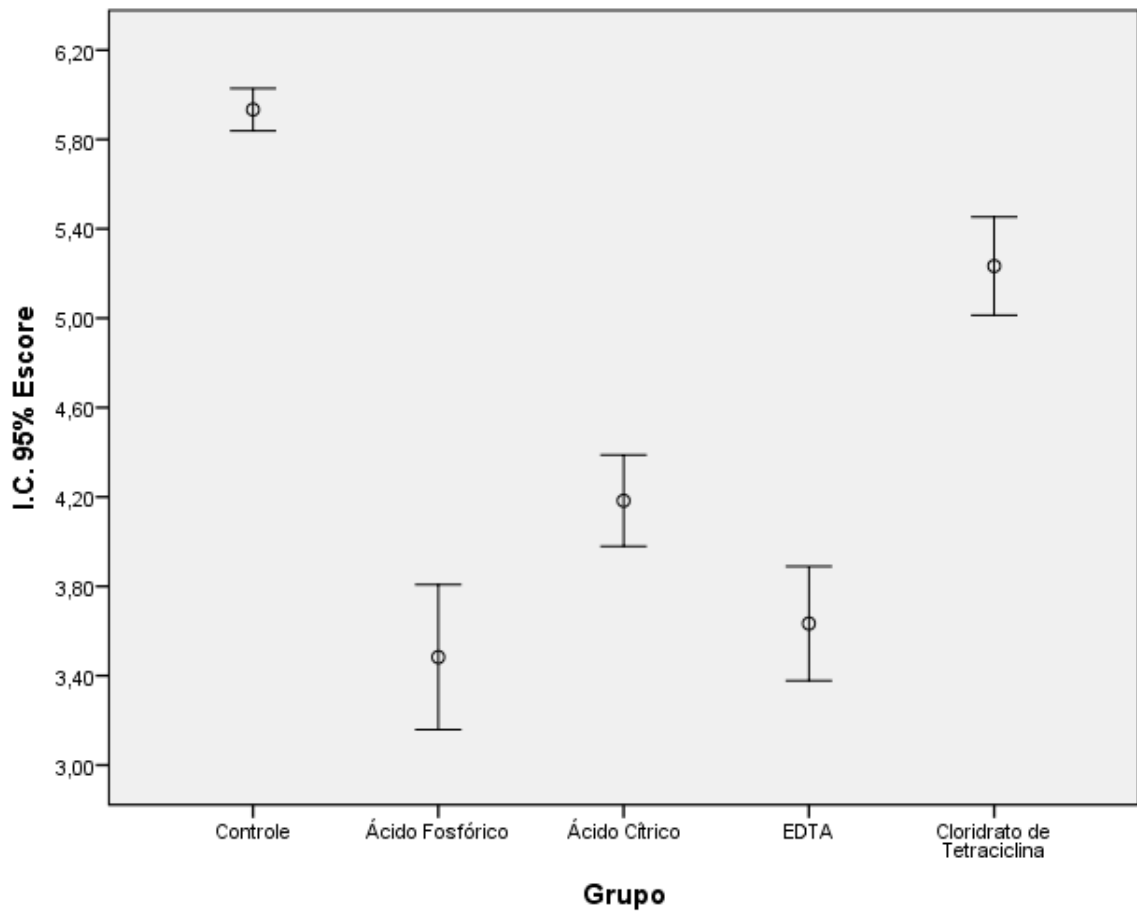
preparados para secagem em estufa, (O) Fragmentos metalizados, prontos para avaliação no MEV.

Análise Estatística

Variável
Dependente:
Games-Howell

(I) Grupo		Diferença média (I-J)	Erro Padrão	Valor p	Intervalo de Confiança 95%	
					Limite inferior	Limite superior
Controle	Ácido Fosfórico	2,45000*	,16856	0,0000	1,9777	2,9223
	Ácido Cítrico	1,75000*	,11222	0,0000	1,4367	2,0633
	EDTA	2,30000*	,13605	0,0000	1,9194	2,6806
	Cloridrato de Tetraciclina	,70000*	,11924	0,0000	,3669	1,0331
Ácido Fosfórico	Controle	-2,45000*	,16856	0,0000	-2,9223	-1,9777
	Ácido Cítrico	-,70000*	,19161	0,0037	-1,2324	-,1676
	EDTA	-,15000	,20647	0,9499	-,7225	,4225
	Cloridrato de Tetraciclina	-1,75000*	,19580	0,0000	-2,2936	-1,2064
Ácido Cítrico	Controle	-1,75000*	,11222	0,0000	-2,0633	-1,4367
	Ácido Fosfórico	,70000*	,19161	0,0037	,1676	1,2324
	EDTA	,55000*	,16375	0,0093	,0960	1,0040
	Cloridrato de Tetraciclina	-1,05000*	,15006	0,0000	-1,4658	-,6342
EDTA	Controle	-2,30000*	,13605	0,0000	-2,6806	-1,9194
	Ácido Fosfórico	,15000	,20647	0,9499	-,4225	,7225
	Ácido Cítrico	-,55000*	,16375	0,0093	-1,0040	-,0960
	Cloridrato de Tetraciclina	-1,60000*	,16863	0,0000	-2,0673	-1,1327
Cloridrato de Tetraciclina	Controle	-,70000*	,11924	0,0000	-1,0331	-,3669
	Ácido Fosfórico	1,75000*	,19580	0,0000	1,2064	2,2936
	Ácido Cítrico	1,05000*	,15006	0,0000	,6342	1,4658
	EDTA	1,60000*	,16863	0,0000	1,1327	2,0673

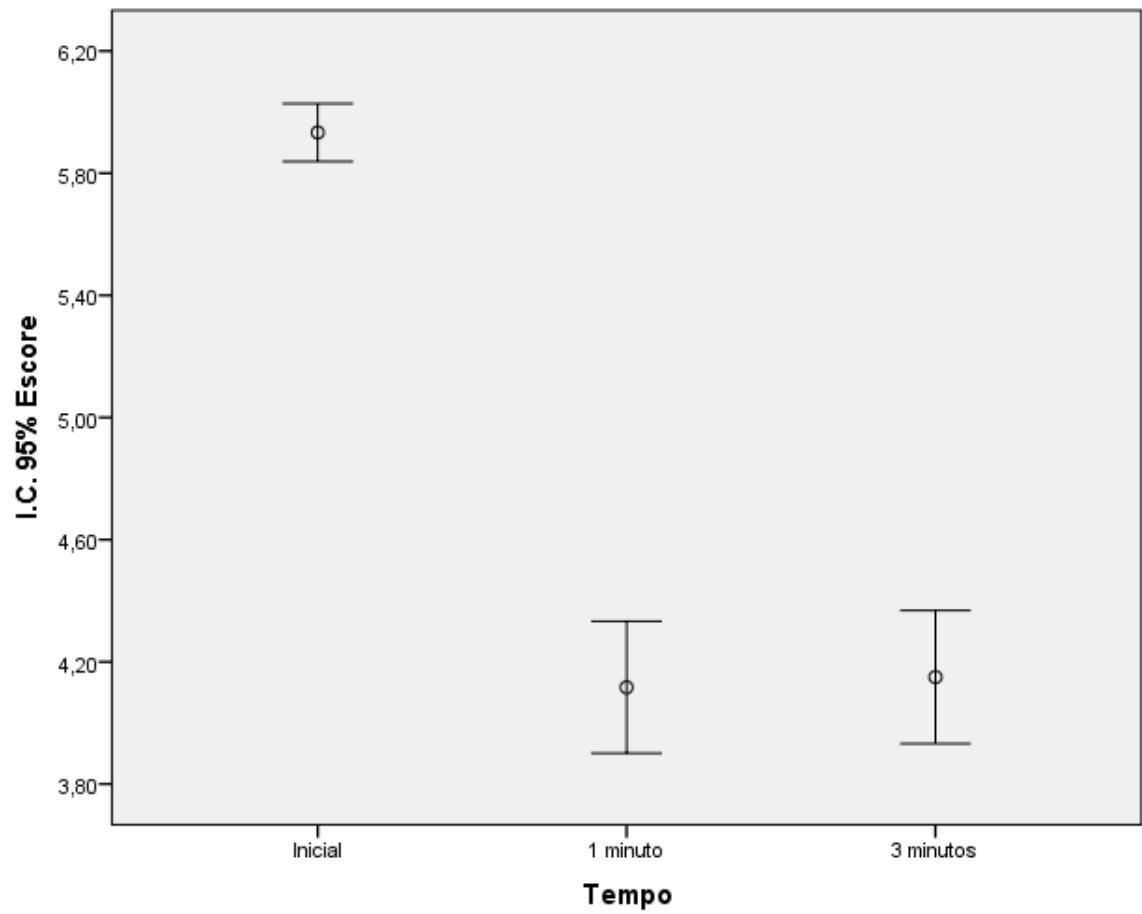
*. A diferença média é significativa no nível 0.05.



Variável dependente: Escore
Games-Howell

(I) Tempo		Diferença média (I-J)	Erro Padrão	Valor p	Intervalo de Confiança 95%	
					Limite inferior	Limite superior
Inicial	1 minuto	1,81667*	,11864	0,0000	1,5357	2,0976
	3 minutos	1,78333*	,11951	0,0000	1,5004	2,0663
1 minuto	Inicial	-1,81667*	,11864	0,0000	-2,0976	-1,5357
	3 minutos	-,03333	,15513	0,9749	-,3992	,3325
3 minutos	Inicial	-1,78333*	,11951	0,0000	-2,0663	-1,5004
	1 minuto	,03333	,15513	0,9749	-,3325	,3992

*. A diferença média é significativa no nível 0.05.



Variável dependente: **Escore**
Games-Howell

(I) Grupo x Tempo	Diferença média (I-J)	Erro Padrão	Valor p	Intervalo de Confiança 95%		
				Limite inferior	Limite superior	
Controle / Inicial	Ácido Fosfórico / 1 minuto	2,76667*	,21980	0,0000	2,0359	3,4974
	Ácido Fosfórico / 3 minutos	2,13333*	,23651	0,0000	1,3464	2,9203
	Ácido Cítrico / 1 minuto	1,70000*	,18331	0,0000	1,0922	2,3078
	Ácido Cítrico / 3 minutos	1,80000*	,11414	0,0000	1,4260	2,1740
	EDTA / 1 minuto	2,13333*	,12066	0,0000	1,7372	2,5295
	EDTA / 3 minutos	2,46667*	,23325	0,0000	1,6907	3,2426
	Cloridrato de Tetraciclina / 1 minuto	,66667*	,16517	0,0079	,1201	1,2133
	Cloridrato de Tetraciclina / 3 minutos	,73333*	,16141	0,0019	,1994	1,2673
Ácido Fosfórico / 1 minuto	Controle / Inicial	-2,76667*	,21980	0,0000	-3,4974	-2,0359
	Ácido Fosfórico / 3 minutos	-,63333	,31617	0,5476	-1,6522	,3855
	Ácido Cítrico / 1 minuto	-1,06667*	,27861	0,0092	-1,9655	-,1678
	Ácido Cítrico / 3 minutos	-,96667*	,23885	0,0061	-1,7474	-,1859
	EDTA / 1 minuto	-,63333	,24204	0,2094	-1,4230	,1563
	EDTA / 3 minutos	-,30000	,31373	0,9883	-1,3109	,7109
	Cloridrato de Tetraciclina / 1 minuto	-2,10000*	,26703	0,0000	-2,9631	-1,2369
	Cloridrato de Tetraciclina / 3 minutos	-2,03333*	,26472	0,0000	-2,8894	-1,1772
Ácido Fosfórico / 3 minutos	Controle / Inicial	-2,13333*	,23651	0,0000	-2,9203	-1,3464
	Ácido Fosfórico / 1 minuto	,63333	,31617	0,5476	-,3855	1,6522
	Ácido Cítrico / 1 minuto	-,43333	,29197	0,8579	-1,3764	,5098
	Ácido Cítrico / 3 minutos	-,33333	,25431	0,9222	-1,1664	,4998
	EDTA / 1 minuto	0,00000	,25731	1,0000	-,8413	,8413
	EDTA / 3 minutos	,33333	,32566	0,9820	-,7158	1,3825
	Cloridrato de Tetraciclina / 1 minuto	-1,46667*	,28094	0,0001	-2,3763	-,5570
	Cloridrato de Tetraciclina / 3 minutos	-1,40000*	,27875	0,0002	-2,3031	-,4969
Ácido Cítrico / 1 minuto	Controle / Inicial	-1,70000*	,18331	0,0000	-2,3078	-1,0922
	Ácido Fosfórico / 1 minuto	1,06667*	,27861	0,0092	,1678	1,9655
	Ácido Fosfórico / 3 minutos	,43333	,29197	0,8579	-,5098	1,3764
	Ácido Cítrico / 3 minutos	,10000	,20576	0,9999	-,5689	,7689
	EDTA / 1 minuto	,43333	,20945	0,5054	-,2463	1,1130
	EDTA / 3 minutos	,76667	,28934	0,1906	-,1677	1,7010

	Cloridrato de Tetraciclina / 1minuto	-1,03333*	,23789	0,0018	-1,8001	-,2666
	Cloridrato de Tetraciclina / 3 minutos	-,96667*	,23530	0,0038	-1,7253	-,2081
Ácido Cítrico / 3 minutos	Controle / Inicial	-1,80000*	,11414	0,0000	-2,1740	-1,4260
	Ácido Fosfórico / 1minuto	,96667*	,23885	0,0061	,1859	1,7474
	Ácido Fosfórico / 3 minutos	,33333	,25431	0,9222	-,4998	1,1664
	Ácido Cítrico / 1minuto	-,10000	,20576	0,9999	-,7689	,5689
	EDTA / 1minuto	,33333	,15263	0,4295	-,1585	,8251
	EDTA / 3 minutos	,66667	,25128	0,1972	-,1562	1,4895
	Cloridrato de Tetraciclina / 1minuto	-1,13333*	,18978	0,0000	-1,7484	-,5183
	Cloridrato de Tetraciclina / 3 minutos	-1,06667*	,18652	0,0000	-1,6708	-,4626
EDTA / 1minuto	Controle / Inicial	-2,13333*	,12066	0,0000	-2,5295	-1,7372
	Ácido Fosfórico / 1minuto	,63333	,24204	0,2094	-,1563	1,4230
	Ácido Fosfórico / 3 minutos	0,00000	,25731	1,0000	-,8413	,8413
	Ácido Cítrico / 1minuto	-,43333	,20945	0,5054	-1,1130	,2463
	Ácido Cítrico / 3 minutos	-,33333	,15263	0,4295	-,8251	,1585
	EDTA / 3 minutos	,33333	,25431	0,9225	-,4978	1,1645
	Cloridrato de Tetraciclina / 1minuto	-1,46667*	,19377	0,0000	-2,0937	-,8397
	Cloridrato de Tetraciclina / 3 minutos	-1,40000*	,19058	0,0000	-2,0163	-,7837
EDTA / 3 minutos	Controle / Inicial	-2,46667*	,23325	0,0000	-3,2426	-1,6907
	Ácido Fosfórico / 1minuto	,30000	,31373	0,9883	-,7109	1,3109
	Ácido Fosfórico / 3 minutos	-,33333	,32566	0,9820	-1,3825	,7158
	Ácido Cítrico / 1minuto	-,76667	,28934	0,1906	-1,7010	,1677
	Ácido Cítrico / 3 minutos	-,66667	,25128	0,1972	-1,4895	,1562
	EDTA / 1minuto	-,33333	,25431	0,9225	-1,1645	,4978
	Cloridrato de Tetraciclina / 1minuto	-1,80000*	,27820	0,0000	-2,7005	-,8995
	Cloridrato de Tetraciclina / 3 minutos	-1,73333*	,27599	0,0000	-2,6272	-,8395
Cloridrato de Tetraciclina / 1minuto	Controle / Inicial	-,66667*	,16517	0,0079	-1,2133	-,1201
	Ácido Fosfórico / 1minuto	2,10000*	,26703	0,0000	1,2369	2,9631
	Ácido Fosfórico / 3 minutos	1,46667*	,28094	0,0001	,5570	2,3763
	Ácido Cítrico / 1minuto	1,03333*	,23789	0,0018	,2666	1,8001
	Ácido Cítrico / 3 minutos	1,13333*	,18978	0,0000	,5183	1,7484
	EDTA / 1minuto	1,46667*	,19377	0,0000	,8397	2,0937
	EDTA / 3 minutos	1,80000*	,27820	0,0000	,8995	2,7005
	Cloridrato de	,06667	,22145		-,6468	,7801

Tetraciclina / 3 minutos				1,0000		
Cloridrato de Tetraciclina / 3 minutos	Controle / Inicial	-,73333*	,16141	0,0019	-1,2673	-,1994
	Ácido Fosfórico / 1minuto	2,03333*	,26472	0,0000	1,1772	2,8894
	Ácido Fosfórico / 3 minutos	1,40000*	,27875	0,0002	,4969	2,3031
	Ácido Cítrico / 1minuto	,96667*	,23530	0,0038	,2081	1,7253
	Ácido Cítrico / 3 minutos	1,06667*	,18652	0,0000	,4626	1,6708
	EDTA / 1minuto	1,40000*	,19058	0,0000	,7837	2,0163
	EDTA / 3 minutos	1,73333*	,27599	0,0000	,8395	2,6272
	Cloridrato de Tetraciclina / 1minuto	-,06667	,22145	1,0000	-,7801	,6468

*. A diferença média é significativa no nível 0.05.

