

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA

Rodrigo Cavassim

Avaliação da descontaminação com ácido cítrico e tetraciclina e da rugosidade, na adesão de coágulo a superfícies radiculares submetidas a diferentes tipos de instrumentação

ARARAQUARA  
2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

*FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA*



**RODRIGO CAVASSIM**

AVALIAÇÃO DA DESCONTAMINAÇÃO COM ÁCIDO CÍTRICO E TETRACICLINA E DA RUGOSIDADE, NA ADESÃO DE COÁGULO A SUPERFÍCIES RADICULARES SUBMETIDAS A DIFERENTES TIPOS DE INSTRUMENTAÇÃO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Área de Periodontia, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Periodontia.

Orientador: *Prof. Dr. José Eduardo Cezar Sampaio*

ARARAQUARA

2012

Cavassim, Rodrigo

Avaliação da descontaminação com ácido cítrico e tetraciclina e da rugosidade, na adesão de coágulo a superfícies radiculares submetidas a diferentes tipos de instrumentação / Rodrigo Cavassim.-- Araraquara: [s.n.], 2012.

146 f. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Odontologia

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Cezar Sampaio

1. Raiz dentária 2. Cálculos dentários 3. Raspagem dentária  
4. Coagulação sanguínea 5. Microscopia eletrônica de varredura  
I. Título

**RODRIGO CAVASSIM**

**AVALIAÇÃO DA DESCONTAMINAÇÃO COM ÁCIDO CÍTRICO E TETRACICLINA E  
DA RUGOSIDADE NA ADESÃO DE COÁGULO A SUPERFÍCIES RADICULARES  
SUBMETIDAS A DEFERENTES TIPOS DE INSTRUMENTAÇÃO**

**COMISSÃO JULGADORA**

**TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR**

Presidente e Orientador .....Prof. Dr. José Eduardo Cezar Sampaio  
2º Examinador.....Prof. Dra. Juliana Rico Pires  
3º Examinador .....Prof. Dr. Fábio André dos Santos  
4º Examinador .....Prof. Dra. Rosemary Adriana Chierici Marcantonio  
5º Examinador .....Prof. Dr. Carlos Rossa Junior

Araraquara, 22 de março de 2012.

# DADOS CURRICULARES

## RODRIGO CAVASSIM

Nascimento	22/05/1980	Prudentópolis – PR
Filiação	Agostinho Cavassim Janete Maria Cavassim	
1999/2003	<b><i>Graduação em Odontologia</i></b> Universidade Estadual de Ponta Grossa – UEPG	
2005/2007	<b><i>Curso de Especialização em Periodontia</i></b> Associação Brasileira de Odontologia – ABO Regional de Ponta Grossa – PR	
2006/2008	<b><i>Curso de Pós-Graduação em Odontologia</i></b> Área de Periodontia, Nível Mestrado, Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP	
2008/2012	<b><i>Curso de Pós-Graduação em Odontologia</i></b> Área de Periodontia, Nível Doutorado, Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP	
2010/2012	<b><i>Curso de Especialização em Implantodontia</i></b> Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas – APCD Regional de Araraquara - SP	

## **DEDICATÓRIA**

**Aos meus pais Janete e Agostinho que,  
incondicionalmente, apoiaram todas as minhas  
decisões e que mesmo distantes, sempre estiveram ao  
meu lado**

**A minha irmã Daiane, pela força e incentivo sempre  
que precisei**

**A minha noiva, Diulie Graziela. Pelo amor  
incondicional demonstrado sempre que necessitei.  
Por estar sempre ao meu lado, dando forças para  
elaborar este trabalho!**

*Sem vocês nada disso seria possível..*

**Muito Obrigado!!!!**

# AGRADECIMENTOS

## A Deus

Pela vida...

Pela sabedoria...

Pelo Seu infinito amor...

Por ter me permitido chegar até aqui...

Por ter me permitido voar e alcançar todos os meus sonhos

Ao orientador e amigo José Eduardo Cezar Sampaio. Pela confiança depositada em todas as atividades que a mim confiou no curso de pós-graduação. Agradeço pela participação e incentivo durante todo o curso.

Pela postura exemplar como professor e orientador.

Aos professores da Disciplina de Periodontia da Faculdade de Odontologia de Araraquara: **Adriana, Carlinhos, Egbert, Élcio, Joni, José Eduardo, Silvana e Ricardo**, sempre incentivando a pesquisa e desenvolvimento da área.

À **Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP**, nas pessoas do Diretor Prof<sup>ª</sup>. Dr. José Cláudio Martins Segalla e do sua Vice-Diretora Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Andréia Afonso Montandon, pela competência com que conduziram esta faculdade nos últimos anos.

Ao coordenador do curso de Pós-Graduação em Odontologia, **Prof. Dr. Mario Tanomaru Filho**, pela competência e dedicação como conduz este curso de Pós-Graduação.

Aos **professores do Curso de Pós-Graduação** da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP, pela atenção dedicada.

A todos os funcionários do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia, em especial, à **Cláudia, Maria do Rosário, Regina Lúcia, Terezinha, Zezé, Estér e Leandro**, pelos momentos agradáveis que me proporcionam durante nosso convívio.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, **Alexandre, Mara, Sylvia e Rosângela**, por serem sempre prestativos e atenciosos.

Aos funcionários da Biblioteca, em especial a **Marley** que prontamente tirou todas as dúvidas em relação às normas de redação.

Aos meus colegas de turma: **Ana Lúcia, Marina, Roberta, Rubens, Sabrina, Wagner, Ándres, Yeon, Humberto e Shelon**.

**À nossa equipe de trabalho:**

**Shelon Cristina de Souza Pinto**, sempre pronta a ajudar em todas as etapas da realização deste trabalho.

**Lucas Amaral Fontanari**, que auxiliou em importantes etapas deste trabalho.

A todos os **amigos do curso de Pós-Graduação e da disciplina de Periodontia**, pelos agradáveis momentos que passamos ao longo destes anos.

Ao Sr. **Sebastião Anésio Dametto**, técnico em microscopia eletrônica, do Instituto de Química do Campus de Araraquara – UNESP, pela ajuda na obtenção das fotomicrografias.



Ao **Luís**, pela amizade e ajuda na revelação das fotomicrografias.

Aos pacientes que cederam seus dentes ao Banco de Dentes da FOAr/UNESP, dando condições para realização desta pesquisa.

A toda a equipe envolvida na criação e manutenção do Banco de Dentes da FOAr/UNESP.

A **CAPES**, pelo apoio financeiro.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

***Muito Obrigado!***

Às vezes a vida te acerta na cabeça com um tijolo.

Não perca a fé.

Estou convencido de que a única coisa que me permitiu seguir adiante foi o meu amor que eu fiz.

Você tem que encontrar o que você ama.

E isso é tão verdadeiro para o seu trabalho, como é para seus amantes.

Seu trabalho vai preencher uma parte grande da sua vida, e a única maneira de ficar realmente satisfeito é fazer o que você acredita ser um ótimo trabalho.

E a única maneira de fazer um excelente trabalho é amar o que você faz.

Se você ainda não encontrou ainda, continue procurando.

Não se acomode.

Como em todos os assuntos do coração, você saberá quando encontrá-lo.

E, como qualquer grande relacionamento, só fica melhor e melhor à medida que os anos passam.

Então continue procurando até encontrá-lo.

Não se acomode.

Steve Jobs

## ***SUMÁRIO***

LISTA DE FIGURAS.....	10
RESUMO.....	12
ABSTRACT.....	16
INTRODUÇÃO.....	19
PROPOSIÇÃO.....	28
CAPÍTULO 1.....	29
CAPÍTULO 2.....	41
CAPÍTULO 3.....	59
MATERIAL E MÉTODOS.....	80
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	116
CONCLUSÃO.....	127
REFERÊNCIAS.....	128
ANEXOS.....	142

## **LISTA DE FIGURAS**

<b>FIGURA 1</b> - A) Seleção dos dentes. B) Demarcação dos sulcos. C) Área de trabalho. D) Raspagem e alisamento radicular.....	<b>82</b>
<b>FIGURA 2</b> - A) Corte transversal ao longo eixo do dente, na altura do primeiro sulco. B) Coroa seccionada. C) Corte longitudinal ao longo eixo do dente, separando as faces preparadas. D) Corte longitudinal ao longo eixo do dente, na altura do segundo sulco.....	<b>82</b>
<b>FIGURA 3</b> - Espécimes preparados.....	<b>83</b>
<b>FIGURA 4</b> - A) Aplicação passiva. B) Fricção vigorosa. C) Fricção sua... <b>85</b>	
<b>FIGURA 5</b> - A) Desidratação em concentrações crescentes de álcool. B) e C) Placas de acrílico codificadas para aplicação do HMDS.....	<b>86</b>
<b>FIGURA 6</b> - . A) Secagem em papel de filtro. B) Espécime tratado, colado em “stub” metálico. C) Dessecador a vácuo. D) Espécime metalizado....	<b>88</b>
<b>FIGURA 7</b> - Fotomicrografia com aumento de 1500x representando o grau 1.....	<b>89</b>
<b>FIGURA 8</b> - Fotomicrografia com aumento de 3500x representando o grau 1.....	<b>89</b>
<b>FIGURA 9</b> - Fotomicrografia com aumento de 1500x representando o grau 2.....	<b>89</b>
<b>FIGURA 10</b> - Fotomicrografia com aumento de 3500x representando o grau 2.....	<b>89</b>
<b>FIGURA 11</b> - Fotomicrografia com aumento de 1500x representando o grau 3.....	<b>90</b>
<b>FIGURA 12</b> - Fotomicrografia com aumento de 3500x representando o grau 3.....	<b>90</b>
<b>FIGURA 13</b> - Fotomicrografia com aumento 1500x representando o grau 4.....	<b>90</b>
<b>FIGURA 14</b> - Fotomicrografia com aumento de 3500x representando o grau 4.....	<b>90</b>
<b>FIGURA 15</b> - Fotomicrografia com aumento de 1500x representando o grau 5.....	<b>91</b>
<b>FIGURA 16</b> - Fotomicrografia com aumento de 3500x representando o grau 5.....	<b>91</b>
<b>FIGURA 17</b> - Fotomicrografia com aumento de 1500x representando o grau 6.....	<b>91</b>
<b>FIGURA 18</b> - Fotomicrografia com aumento de 3500x representando o grau 6.....	<b>91</b>
<b>FIGURA 19</b> - Fotomicrografia com aumento de 1500x representando o grau 7.....	<b>92</b>
<b>FIGURA 20</b> - - Fotomicrografia com aumento de 3500x representando o grau 7.....	<b>92</b>
<b>FIGURA 21</b> - Fotomicrografia com aumento de 1500x representando o grau 8.....	<b>92</b>
<b>FIGURA 22</b> - - Fotomicrografia com aumento de 3500x representando o grau 8.....	<b>92</b>
<b>FIGURA 23</b> - Dente com cálculo radicular selecionado para o estudo. M1 – delimitação da porção mais coronário do cálculo. M2 – delimitação da porção mais apical do cálculo. C – Cálculo dental... <b>95</b>	

<b>FIGURA 24</b> - Fluxograma, mostrando os grupos e seus subgrupos utilizados nos estudos II e III.....	<b>96</b>
<b>FIGURA 25</b> - A) Corte com disco diamantado para remoção da coroa. B) Coroa removida.....	<b>98</b>
<b>FIGURA 26</b> - A) Corte separando a face de trabalho do restante do dente. B) Vista lateral após separação das faces. C) Visualização aproximada após o corte.....	<b>99</b>
<b>FIGURA 27</b> - A) e B) Corte transversal, separando o primeiro espécime. C) Primeiro espécime separado.....	<b>99</b>
<b>FIGURA 28</b> - A) Corte separando o segundo espécime. B) Os dois espécimes originados do mesmo dente, de área adjacente.....	<b>100</b>
<b>FIGURA 29</b> - Aplicação do ácido cítrico a 25%, com pincel suave pelo tempo de 3 minutos.....	<b>102</b>
<b>FIGURA 30</b> - Aplicação do cloridrato de tetraciclina na concentração de 50 mg/mL por fricção de bolinha de algodão pelo tempo de 3 minutos.....	<b>102</b>
<b>FIGURA 31</b> - Coleta do sangue. B) Aplicação de uma gota de sangue sobre o espécime. C) Espécime metalizado.....	<b>103</b>
<b>FIGURA 32 - Índice de adesão de elementos sanguíneos.</b> A) Escore 1 – ausência de fibrina e de células sanguíneas. B) Escore 2 – escassa rede de fibrina e/ou de células sanguíneas. Escore 3 – moderada quantidade de células sanguíneas e rede de fibrina mais fina com pequeno entrelaçamento. Escore 4 – densa rede de fibrina com grande entrelaçamento e células sanguíneas aprisionadas.....	<b>105</b>
<b>FIGURA 33</b> - Aplicação do ácido cítrico a 25%, com pincel suave pelo tempo de 3 minutos.....	<b>108</b>
<b>FIGURA 34</b> - Aplicação do cloridrato de tetraciclina na concentração de 50 mg/mL por fricção de bolinha de algodão pelo tempo de 3 minutos..	<b>108</b>
<b>FIGURA 35</b> - Direção das três mensurações realizadas utilizado-se o rugosímetro.....	<b>110</b>
<b>FIGURA 36</b> - <i>Ra</i> – rugosidade média. É a distância média de um perfil desde sua linha média, sobre um comprimento medido ( <i>l<sub>m</sub></i> ). Média aritmética entre picos e vales.....	<b>112</b>
<b>FIGURA 37</b> - <i>Rt</i> – rugosidade total. Distância vertical entre o pico mais alto e o vale mais baixo no percurso de medição <i>l<sub>m</sub></i> , medido por duas linhas paralelas à linha média independente dos valores de <i>Z<sub>i</sub></i> . <i>Rt</i> = <i>R<sub>p</sub></i> + <i>R<sub>v</sub></i> .....	<b>112</b>
<b>FIGURA 38</b> - <i>Ry</i> – rugosidade máxima. maior rugosidade entre as rugosidades parciais ( <i>Z<sub>i</sub></i> ) que se apresenta no percurso de medição ( <i>l<sub>m</sub></i> ) <i>Ry</i> = <i>Z<sub>2</sub></i> .....	<b>112</b>
<b>FIGURA 39</b> - <i>Rz</i> (DIN) – é a média aritmética dos valores de rugosidade parcial ( <i>Z<sub>i</sub></i> ) medidos por linhas paralelas à linha média. <i>Rz</i> (DIN) = ( <i>Z<sub>1</sub></i> + <i>Z<sub>2</sub></i> + ... + <i>Z<sub>n</sub></i> )/ <i>n</i> .....	<b>112</b>
<b>FIGURA 40 - Índice de Morfologia Radicular.</b> A) <u>Escore 1</u> – superfície com cálculo de aspecto muito rugoso. B) <u>Escore 2</u> – superfície com cálculo de aspecto pouco rugoso. C) <u>Escore 3</u> – cálculo desmineralizado. D) <u>Escore 4</u> - superfície radicular hiperdesmineralizada. E) <u>Escore 5</u> – presença de smear layer.....	<b>114</b>

Cavassim R. Avaliação da descontaminação com ácido cítrico e tetraciclina e da rugosidade, na adesão de coágulo a superfícies radiculares submetidas a diferentes tipos de instrumentação [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2012.

## ***RESUMO***

O tratamento periodontal engloba o processo de raspagem e alisamento radicular, podendo ser realizado por diferentes meios que além de remover o cálculo dental, produzem diferentes características na superfície radicular como ranhuras e concavidades e também a formação de smear layer. O uso de agentes químicos é proposto na literatura para remover essa smear layer, e descontaminar a superfície radicular, aumentando assim as chances de formação de nova inserção conjuntiva. O objetivo do Estudo 1 foi avaliar, por meio de microscopia eletrônica de varredura, a influência de diferentes concentrações, modos e tempos de aplicação de ácido cítrico na biomodificação de superfícies radiculares submetidas à raspagem e alisamento radicular. Neste estudo, 270 amostras foram divididas em 6 grupos (45 amostras/grupo): soro fisiológico (controle), ácido cítrico (0.5%, 1%, 2%, 15% e 25%), com tempos de 1, 2 ou 3 minutos para cada grupo, nos modos de aplicação: a) aplicação passiva (bolinha de algodão); b) fricção suave (pincel); c) fricção vigorosa (bolinha de algodão), com renovação da solução a cada 30 segundos. As amostras foram

submetidas à desidratação em concentrações crescentes de álcool etílico e HMDS, sendo em seguida metalizadas e levadas para observação em microscopia eletrônica de varredura. Um examinador treinado, calibrado ( $\kappa=0,93$ ) e cego avaliou as fotomicrografias obtidas. A análise estatística foi realizada utilizando-se os testes de Kruskal- Wallis e Dunn.

No estudo 2, investigou-se a influência da biomodificação radicular associada a diferentes meios de instrumentação na adesão de coágulo e elementos sanguíneos. Cento e cinquenta dentes afetados periodontalmente foram divididos em 5 grupos: Grupo I, instrumentação com curetas; Grupo II, instrumentação com curetas removendo cálculo superficial; Grupo III, remoção do cálculo superficial com ultrassom; Grupo IV, remoção do cálculo superficial com instrumento ultrassônico seguido pela instrumentação com curetas Grupo V, superfície com cálculo. Estes cinco grupos foram divididos em três subgrupos (10 amostras cada) de acordo com o condicionamento químico: a) sem condicionamento químico; b) condicionamento químico com ácido cítrico; c) condicionamento químico com cloridrato de tetraciclina. Em seguida, uma gota de sangue humano da circulação periférica foi aplicada à superfície radicular das amostras. Foi aguardado o período para coagulação e as amostras foram então preparadas para microscopia eletrônica de varredura. As fotomicrografias obtidas foram avaliadas por um examinador treinado, calibrado ( $\kappa=0,87$ ) e cego e os escores obtidos submetidos à análise estatística (Kruskal-Wallis e Dunn). No

estudo 3 , investigou-se a influência dos diferentes meios de instrumentação e da biomodificação na rugosidade e morfologia radicular. Neste estudo foram utilizados cento e cinquenta dentes comprometidos periodontalmente. Os dentes foram divididos em cinco grupos: Grupo I, instrumentação com curetas; Grupo II, instrumentação com curetas removendo cálculo superficial; Grupo III, remoção do cálculo superficial com ultrassom; Grupo IV, remoção do cálculo superficial com instrumento ultrassônico seguido pela instrumentação com curetas Grupo V, superfície com cálculo. Estes cinco grupos foram divididos em três subgrupos (10 amostras cada) de acordo com o condicionamento químico: a) sem condicionamento químico; b) condicionamento químico com ácido cítrico; c) condicionamento químico com cloridrato de tetraciclina. As amostras obtidas foram avaliadas por meio de rugosímetro, obtendo-se valores de rugosidade para os parâmetros (Ra, Rt, Ry e Rz) e por meio de microscopia eletrônica de varredura para avaliação da morfologia. Os resultados mostraram que: o ácido cítrico a 25% aplicado por pincel, por 1 ou 3 minutos foi mais eficiente na obtenção da biomodificação radicular; o condicionamento químico favoreceu a formação de rede de fibrina e adesão de componentes sanguíneos após raspagem e alisamento radicular, apesar de não haver diferenças entre os meios de instrumentação avaliados; os grupos instrumentados por raspagem vigorosa apresentaram menores valores de rugosidades que os grupos que tiveram o cálculo apenas destacado. A avaliação da



morfologia mostrou um aspecto mais rugoso da superfície radicular foi observado no grupo controle e nos grupos que tiveram o cálculo apenas destacado. Presença de smear layer e hiperdesmineralização, com aspecto de maior lisura de superfície foi observadas nos grupos após raspagem, com e sem condicionamento químico da superfície.

**Palavras-chave:** Raiz dentária, Cálculos dentários, Raspagem dentária, Coagulação sanguínea, Microscopia eletrônica de varredura

Cavassim R. Evaluation of decontamination with citric acid and tetracycline and roughness on clot adhesion to root surfaces after different types of instrumentation [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2012.

## ***ABSTRACT***

Periodontal treatment encompasses the scaling and root planning process and can therefore be carried out by various means. In addition to removing dental calculus, the root instrumentation produces different characteristics in the radicular surface as the formation of concavities and smear layer. The use of chemical agents is proposed in the literature to remove the smear layer, and detoxify the radicular surface, thereby increasing the chances of forming new connective attachment. The aim of the Study 1 was to assess, through scanning electron microscopy, the influence of different concentrations, application methods and application times of citric acid in the root conditioning after scaling and root planning. Two hundred seventy (270) samples were equally divided into six groups (n=45) for treatment with saline solution (control) and five different concentrations of citric acid (0.5, 1, 2, 15, and 25 percent). Three acid application methods were used (passive, brushing, and burnishing) as well as three application periods (1, 2, and 3 minutes). A previously trained, calibrated (kappa score = 0.93), and blind examiner subsequently scored scanning electron micrographs (SEMs) of the samples. Statistical

analyses were performed by using Kruskal-Wallis and Dunn's post-hoc tests. In Study 2, was investigated the influence of root conditioning associated with different modes of instrumentation in the adhesion of clot and blood elements. One hundred and fifty periodontally affected teeth were divided into five groups: Group I, instrumentation with curettes; Group II, instrumentation with curettes removing the superficial calculus; Group III, ultrasonic scaler with removal of the superficial calculus; Group IV, ultrasonic scaler for removal of the superficial calculus and after that, instrumentation with curettes; Group V, calculus surface. These five groups were further divided into three subgroups (10 samples each) according to the root conditioning method used: a) no root conditioning; b) root conditioning with citric acid; c) root conditioning with tetracycline hydrochloride. After treatments, a drop of fresh human whole peripheral blood was applied to the external root surface. The blood was allowed to clot onto the root samples and then, the samples were prepared for SEM analyses. In Study 3, was investigated the influence of the different means of instrumentation and of root conditioning in root morphology and roughness. One hundred and fifty human teeth lost due to periodontal disease were use in this study The teeth were divided into five groups: Group I, instrumentation with curettes; Group II, instrumentation with curettes removing the superficial calculus; Group III, ultrasonic scaler with removal of the superficial calculus; Group IV, ultrasonic scaler for removal of the superficial calculus and after that, instrumentation with curettes;

Group V, calculus surface. These five groups were further divided into three subgroups (10 samples each) according to the root conditioning method used: a) no root conditioning; b) root conditioning with citric acid; c) root conditioning with tetracycline hydrochloride. After that, teeth were evaluated according to roughness parameters (Ra, Rt, Ry, Rz) and surface morphology. The results showed that exposure of collagen fibers were obtained with application of citric acid at 25 percent by brushing for one or three minutes; chemical root conditioning favored the fibrin network formation and adhesion of blood components after scaling and root planning, although there are no differences between the Instrumentation means; the groups instrumented by vigorous scaling and root planning have smaller roughness values than the groups that had only the superficial dental calculus removed. Morphology evaluation showed a rough aspect of radicular surface, observed in the control group and the groups that had only the superficial dental calculus removed. Presence of smear layer and chemical demineralization, with respect to greater surface smoothness were observed in the groups after scaling, with and without chemical conditioning of the surface.

**Keywords:** dental: root, calculus, scaling and root planning, clot formation, scanning electron microscopy

## ***INTRODUÇÃO***

As doenças periodontais inflamatórias crônicas acometem os tecidos de proteção e sustentação dos dentes e, segundo a Academia Americana de Periodontologia, compreendem respectivamente a gengivite e periodontite<sup>8</sup>.

A periodontite é uma doença infecciosa que resulta na inflamação dos tecidos de suporte dos dentes com perda progressiva de inserção, formação de bolsa periodontal e presença de processo inflamatório ativo<sup>41</sup>.

A etiologia da periodontite é multifatorial, estando relacionada aos periodontopatógenos presente na placa bacteriana e no cálculo dental<sup>7,65</sup>, e um hospedeiro susceptível. A adsorção de minerais e proteínas salivares, bem como proteínas séricas leva à mineralização da placa bacteriana e formação do cálculo dental. Este se adere às superfícies dentárias por imbricamento mecânico e atua como reservatório das bactérias responsáveis pela inflamação dos tecidos periodontais<sup>7,11,34</sup>.

Após a instalação da periodontite, ocorre uma sucessão de eventos nos tecidos periodontais, incluindo a perda de inserção de tecido conjuntivo ao elemento dental, perda do osso alveolar de suporte e a migração apical do epitélio juncional ao longo da superfície radicular<sup>5,26,65</sup>.

O tratamento periodontal básico baseia-se na remoção mecânica do cálculo dental por meio de procedimentos clínicos de raspagem e alisamento radicular (RAR), que pode ser realizada por instrumentos manuais, rotatórios, sônicos ou ultrassônicos<sup>62-63</sup>.

Os principais objetivos do tratamento periodontal são a completa remoção do cálculo dental e o restabelecimento das estruturas de suporte (ligamento periodontal, cemento e osso alveolar) perdidas em decorrência do processo inflamatório<sup>2-3,6-7</sup>. Entretanto, estudos têm demonstrado dificuldades em alcançar esses objetivos<sup>5,52,71,78,81-82</sup>. Mesmo após raspagem vigorosa e alisamento radicular ainda são encontrados remanescentes de cálculo aderidos à superfície radicular<sup>33,55</sup>. Além disso, enzimas e metabólitos bacterianos presentes na superfície radicular contaminada levam a alterações na composição e densidade mineral, reabsorção localizada, perda da matriz colágena e proteínas não colágenas, retenção de bactérias e adsorção de endotoxinas<sup>2,6,93</sup>. Além disso, endotoxinas e bactérias também podem ser encontradas no interior de túbulos dentinários<sup>2-3,6,77,79-80</sup>.

Uma vez que o tratamento periodontal não restaura a anatomia original do periodonto, resultando apenas em reparo periodontal no qual os tecidos não reproduzem a arquitetura original dos tecidos perdidos<sup>5,26,65</sup>, sugeriu-se a utilização de outros procedimentos com intuito de complementar o tratamento periodontal básico. Tais procedimentos descritos na literatura propõem a utilização de substâncias químicas para

condicionar a superfície radicular hipermineralizada e também expor as fibras colágenas da matriz dentinária. A esse procedimento denomina-se biomodificação radicular<sup>16,19,47</sup>.

A biomodificação radicular assim como a regeneração tecidual guiada, os enxertos ósseos, os fatores de crescimento e a combinação dos mesmos são modalidades terapêuticas que buscam estabelecer condições favoráveis à regeneração periodontal<sup>107</sup>.

Além da remoção da smear layer formada durante a raspagem, as substâncias químicas utilizadas para se obter a biomodificação radicular teriam uma função secundária e de grande importância à terapia periodontal, que seria a descontaminação da superfície radicular. Uma vez que não se obtém a remoção completa do cálculo dentário, a biomodificação radicular poderia atuar sobre o cálculo residual, promovendo sua descontaminação ou mesmo sua remoção por desmineralização e favorecendo ao reparo periodontal<sup>55</sup>.

Após a instrumentação periodontal, inicia-se o processo de reparo dos tecidos adjacentes. O primeiro evento a ocorrer é a formação de um coágulo sobre a superfície radicular, como resposta imediata a qualquer tipo de trauma, constituindo assim a fase inicial do processo de cicatrização dos tecidos periodontais<sup>80,106</sup>.

Dentro do processo cicatricial, o coágulo exerce duas funções: protege temporariamente os tecidos e atua como matriz para migração celular<sup>76</sup>. A rápida aderência do coágulo sanguíneo sobre a raiz

promove a formação de uma barreira capaz de diminuir a migração apical do tecido epitelial<sup>26,105</sup>.

No entanto, o processo de reparo é bastante complexo nesta situação em que há o tecido conjuntivo em contato a superfície radicular, após a instrumentação periodontal. A raiz dental apresenta-se desprovida das células do ligamento periodontal e encontra-se hipermineralizada e recoberta por smear layer<sup>42,76,78</sup>.

A formação do coágulo na interface raiz tecido conjuntivo inicia-se quando elementos do sangue aderem-se à superfície radicular, representando os eventos iniciais do processo de adesão do coágulo e de reparo. Neste estágio temos a absorção e adesão de proteínas plasmáticas à superfície radicular, seguida da formação de um coágulo fibrinoso ligado à raiz. Dentro de algumas horas pode ser observada uma fase inflamatória inicial, onde predominam neutrófilos e monócitos. Dentro de aproximadamente três dias pode-se observar uma fase inflamatória com migração de macrófagos e formação de um tecido de granulação. Após sete dias pode ser observado um início de nova inserção conjuntiva à raiz, porém, remanescente do coágulo e fibrina ainda estão presentes<sup>76</sup>.

Polson, Proye (1983)<sup>80</sup> mostraram, em um modelo experimental com macacos, a importância da adesão e maturação do coágulo no reparo em retalhos periodontais. Os resultados deste estudo mostraram que raízes instrumentadas e biomodificadas com ácido cítrico apresentaram uma ligação de fibrina e maturação de nova inserção



conjuntiva, enquanto raízes apenas instrumentadas (controle) apresentaram formação de epitélio juncional longo. Aparentemente, a biomodificação radicular proporciona uma ancoragem estável do coágulo sanguíneo e rede de fibrina à superfície radicular instrumentada, proporcionando assim a maturação de nova inserção conjuntiva.

Reafirmando os autores anteriores, Baker et al.<sup>10</sup> (2005) sugerem que a smear layer interposta entre a raiz e o tecido conjuntivo pode impedir a aderência do coágulo sanguíneo à superfície radicular, podendo atuar como uma barreira física à nova inserção periodontal<sup>45</sup>.

Rocha et al. (dados não publicados) demonstrou que a smear layer formada após instrumentação manual passa por duas fases de eliminação. Em um primeiro momento ocorre uma rápida redução da quantidade de smear layer formada sobre a superfície radicular e esta continua a ser eliminada de forma mais lenta ao longo do tempo, subsequente à instrumentação periodontal. Estes autores mostraram que após raspagem e alisamento radicular, a smear layer é reabsorvida ao longo do tempo, sendo que ao final da avaliação de 28 dias houve a reabsorção de cerca de 60% da smear layer formada sobre a superfície radicular. Por outro lado, no período inicial de 7 dias após raspagem radicular, foi observado a presença de smear layer em cerca de 70% dos dentes avaliados. Este resultado sugere que a presença de smear layer sobre a superfície radicular pode ser um fator desfavorável ao processo de reparo periodontal, uma vez que nos primeiros dias observa-se uma

fase inflamatória e somente após 7 dias pode-se observar o início de formação de nova inserção<sup>76</sup>.

Outros autores<sup>45,65,78</sup> também sugerem que a permanência da smear layer demonstrou ser desfavorável à estabilização da rede de fibrina e formação de coágulo sanguíneo, atrasando essa fase inicial da regeneração periodontal.

Ao que parece, a formação de um coágulo estável aderido à superfície radicular por meio de uma rede de fibrina, é de vital importância para o desenvolvimento de nova inserção conjuntiva. A biomodificação radicular, além de remover a smear layer e expor fibras colágenas da matriz dentinária, atua na inativação das endotoxinas bacterianas, favorecendo a agregação plaquetária e formação de uma rede de fibrina insolúvel, a qual atua como arcabouço para adesão e proliferação de células do tecido conjuntivo<sup>10,48,95</sup>.

As características da superfície radicular parecem influenciar diretamente ao processo cicatricial e de regeneração periodontal, no entanto ainda não há na literatura estudos que avaliaram os diferentes meios de instrumentação quanto às características e rugosidade de superfícies produzidas, associadas à biomodificação radicular.

A instrumentação periodontal pode ser realizada utilizando-se instrumentos manuais, dispositivos sônicos e ultrassônicos ou associações entre estes. Os estudos existentes que avaliaram os

diferentes meios de instrumentação mostraram que dispositivos ultrassônicos são tão efetivos quanto a instrumentação manual na remoção de cálculo e placa bacteriana<sup>21,25,37,58,72,88</sup>. Outros estudos que utilizaram instrumentos sônicos e ultrassônicos relatam o efeito cavitacional ocasionado pela oscilação de bolhas de ar em meio líquido, entretanto, esse efeito cavitacional parece não ter influência em estudos in vivo, tendo contribuído para remoção de placa bacteriana em avaliações in vitro apenas<sup>38,49,57,72,88,101,103,110</sup>.

Durante a instrumentação periodontal é considerado adequado que a superfície radicular se apresente tão lisa quanto possível<sup>61</sup>, uma vez que estudos demonstraram que a rugosidade da superfície radicular influencia significativamente no estabelecimento do biofilme dental<sup>53,61</sup>.

Estudos que avaliaram a instrumentação radicular realizada por meio de instrumentos manuais, sônicos e ultrassônicos, mostraram diferenças nas características de rugosidade obtidas. Estes estudos apresentam controvérsias quanto ao tipo de instrumentação capaz de produzir uma superfície mais regular. Na grande maioria dos estudos, os instrumentos ultrassônicos produziram superfícies com maior rugosidade que os instrumentos manuais ou sônicos<sup>50,56,69,102</sup>. Outros estudos mostraram resultados em que não houve diferença na instrumentação manual ou ultrassônica<sup>43,89</sup>, ou ainda que a instrumentação ultrassônica produziu superfícies mais regulares que a

instrumentação manual<sup>37,51,74</sup>, sendo que este meio de instrumentação produziu sulcos e ranhuras na superfície radicular<sup>54,87</sup>.

Clinicamente é muito difícil detectar pequenas variações na lisura de superfície, visto que os instrumentos utilizados (sonda exploradora) não possuem precisão para isso<sup>50</sup>, porém uma superfície com maior rugosidade parece favorecer ao acúmulo de placa<sup>61,83</sup>, enquanto uma superfície mais lisa parece favorecer a cicatrização dos tecidos periodontais pois, possivelmente, apresenta uma menor quantidade de depósitos aderidos, o que resulta em uma condição mais aceitável biologicamente<sup>35</sup>. Esta condição é particularmente importante quando observada em uma região radicular próxima à margem gengival e de grande importância quando sua localização é em uma porção supragengival, visto que nestas localizações uma superfície de maior rugosidade facilitaria também o acúmulo do biofilme dental e dificultaria o controle mecânico de placa realizado pelo paciente. Por outro lado, uma região de maior rugosidade localizada no fundo de uma bolsa periodontal, pode não afetar significativamente a cicatrização periodontal.

Assim, considerando-se o conjunto de fatores relacionados à regeneração periodontal não se encontram completamente elucidados, parece oportuno avaliar alguns dos fatores envolvidos neste processo, tais como a adesão do coágulo sobre a superfície radicular, após a descontaminação química, de modo a analisar o comportamento da formação inicial de coágulo sobre superfícies que apresentam cálculo

ou cálculo residual e conseqüente contaminação. Também, julga-se oportuno avaliar o efeito da descontaminação radicular química e mecânica, em relação à lisura da superfície radicular após sua realização.

## ***PROPOSIÇÃO***

**Capítulo 1:** o objetivo deste estudo in vitro foi avaliar, por meio de microscopia eletrônica de varredura, a influência de diferentes concentrações, modos e tempos de aplicação de ácido cítrico na biomodificação de superfícies radiculares submetidas à raspagem e alisamento radicular.

**Capítulo 2:** o objetivo deste estudo foi avaliar a influência da descontaminação química radicular e de diferentes meios de instrumentação, na adesão de coágulo e elementos sanguíneos.

**Capítulo 3:** o objetivo deste estudo foi avaliar a influência dos diferentes meios de descontaminação, mecânica e química, na rugosidade e morfologia radicular.

# Capítulo 1

Artigo publicado no Journal of Contemporary Dental Practice





## Smear Layer Removal for Collagen Fiber Exposure after Citric Acid Conditionings

Rodrigo Cavassim,\* DDS, MSc; Fábio Renato Manzolli Leite, DDS, MSc; Daniela Leal Zandim, DDS, MSc; Andrea Abi Rached Dantas, DDS, MSc; José Eduardo Cezar Sampaio, DDS, PhD

### Abstract

**Aim:** The aim of the present study was to compare the removal of the smear layer and exposure of collagen fibers of the root surface following the application of five citric acid solution concentrations.

**Methods and Materials:** Two hundred seventy (270) samples were equally divided into six groups (n=45) for treatment with saline solution (control) and five different concentrations of citric acid (0.5, 1, 2, 15, and 25 percent). Three acid application methods were used (passive, brushing, and burnishing) as well as three application periods (1, 2, and 3 minutes). A previously trained, calibrated (kappa score = 0.93), and blind examiner subsequently scored scanning electron micrographs (SEMs) of the samples. Statistical analyses were performed by using Kruskal-Wallis and Dunn's post-hoc tests.

**Results:** According to the results obtained and within the limitations of the methodology used, the citric acid applications were more effective than the control treatment of applying saline solution ( $p < 0.05$ ). However, no statistically significant differences were observed among the three application methods and three application periods. Descriptive analyses showed that best results for exposure of collagen fibers were obtained with the application of citric acid at 25 percent by brushing for 1 or 3 minutes.

**Conclusions:** The best results for exposure of collagen fibers in this study were obtained with application of citric acid at 25 percent by brushing



for 1 or 3 minutes, even though there were no statistically significant differences among the groups.

**Clinical Significance:** The best results for exposure of collagen fibers on root surfaces noted in this study were obtained with application of citric acid at 25 percent by brushing for 1 or 3 minutes.

**Keywords:** Acid conditioning collagen fibers, citric acid, laboratory study, root surfaces, smear layer

**Citation:** 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 [Internet].



2010 December; 11(6):001-008. Available from <http://www.theicdp.com/journal/view/volume11-issu6-cv0001>

\*Submitted in partial fulfillment of the requirements for the Master of Science (MSc) degree from the Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculty of Dentistry.

## Introduction

Periodontal therapy is intended to eliminate periodontal disease, restore periodontal tissues to a healthy and functional state, and ensure the subsequent maintenance of these tissues in that healthy state. Literature has clearly demonstrated that current modes of periodontal therapy are successful in achieving these goals. However, success in periodontal therapy not only seeks to arrest periodontal disease but also to achieve predictable regeneration of the periodontium at the sites of the previous breakdown.<sup>1,2</sup>

Treatment of periodontal disease by mechanical scaling and root planning produces a smear layer on the root surface that can impair healing and soft tissue regeneration.<sup>3,4</sup> To address this situation, substances can be applied to the root surface to remove the smear layer and expose collagen fibers in the dentin matrix.<sup>5-7</sup> One such substance capable of removing the smear layer and opening dentinal tubules is citric acid.<sup>8-12</sup> In addition, citric acid also can be used with other regenerative techniques to optimize results, enhancing periodontal regeneration.<sup>13-16</sup> However, citric acid's low pH may induce cytotoxic effects when in direct contact with periodontal cells.<sup>17</sup>

It has been shown that citric acid produces more clot stabilization on the dentin surface than tetracycline hydrochloride, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), sodium citrate, or a saline solution.<sup>18</sup>

Despite the ability of citric acid to promote root demineralization and to remove the smear layer, studies have not achieved a consensus for the parameters of the citric acid application, which has resulted in different reported outcomes.<sup>19,20,21,22</sup> Therefore, the objective of this *in vitro* study was to evaluate smear layer removal and exposure of collagen fibers using scanning electron microscopy (SEM) after citric acid application on

root surfaces to determine the most effective acid concentration and application method.

## Methods and Materials

This study was approved by the Research Ethics Committee of Araraquara Dentistry School—UNESP—Brazil (protocol # 31/06). A total of 135 teeth were obtained from the Human Tooth Bank of the institution. These teeth had no evidence of dental caries, restorations below the cemento-enamel junction (CEJ), or any other cervical root lesions.

### Sample Preparation

The cervical third of roots was chosen for the sample preparation. Samples were prepared by making two parallel grooves, approximately 0.5 mm wide, on the buccal and lingual root surfaces of each tooth using a high-speed cylindrical diamond bur (KG Sorensen, Barueri, SP, Brazil) under copious water irrigation. The first groove was made horizontally at the cemento-enamel junction, and the second groove was made approximately 3 mm from the first in the apical direction. The same bur was used to remove the surface layer of the root between the two grooves (Figure 1). The area between the two grooves was then scaled with 50 apical-cervical strokes using a sharp # 5-6 Gracey curette (Hu-Friedy, Chicago, IL, USA) (Figure 2).

Two samples were obtained from each tooth and all of them were stored in containers with saline solution.



**Figure 1.** Preparation of the first groove at the CEJ and the second groove placed 3 mm apical from the first. After groove preparation, the surface layer of the root between the grooves was removed with the same bur.

Two hundred seventy dentin samples, approximately  $3 \times 4 \times 1$  mm in size, were obtained and randomly divided into five experimental groups ( $n=45$  for each group) and one control group (Figure 3).

The control group was conditioned with saline solution and the experimental groups were conditioned with different citric acid

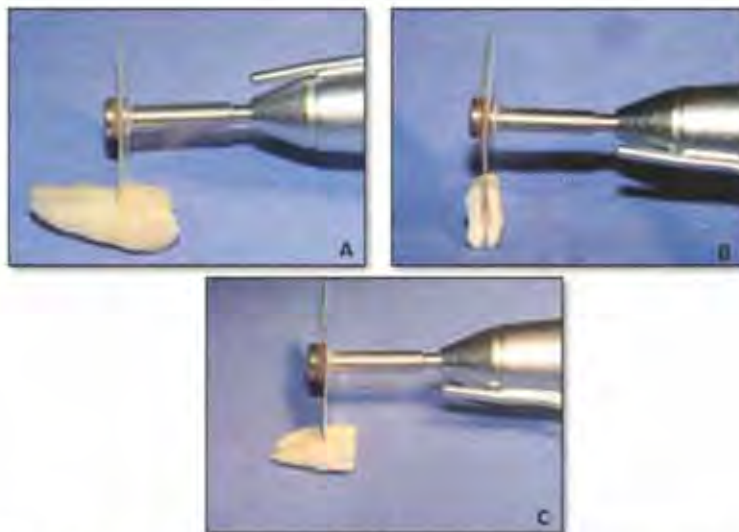


**Figure 2.** Fifty apical-cervical scraping strokes made on the area between the two grooves with the curette.

concentrations (0.5, 1, 2, 15, or 25 percent). These six groups were further divided into three subgroups (15 samples each) according to the application method of the solutions used. There were also three application methods used: (1) passive application with a small, cotton pellet; (2) brushing application with a soft brush; and (3) burnishing application with a small, cotton pellet. Each of these three subgroups was further divided into three application periods of 1, 2, or 3 minutes with 5 samples in each subgroup.

During each application period, solutions were renewed on the cotton pellet or brush every 30 seconds. A new pellet or brush was used for each solution. Thereafter each sample was rinsed with 10 ml of saline solution and identified with a code for blind scoring of the SEMs.

All samples were then dehydrated in an increasingly graded series of alcohols (30, 50, 70, 80, 95, and 100 percent) for 1 hour each. After immersion in the 100 percent ethanol concentration, samples were placed in a 50 percent (v/v) solution of 100 percent ethanol and



**Figure 3.** Sample preparation procedure. (A) The dental crown above the first groove was removed. (B) Then a longitudinal cut was made in the central part of the tooth. (C) Finally, a horizontal cut was made to produce the samples.

hexamethyldisilazane (HMDS) (Sigma, Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA) for 30 minutes with a final immersion in 100 percent HMDS for 10 minutes. Finally, samples were dried overnight in a dehydration jar (Corning, Sao Paulo, SP, Brazil), mounted on metallic stubs (Serial, Sao Paulo, SP, Brazil), and sputter-coated with a thin 25 nm layer of 99.99 percent pure gold.

#### SEM Analysis

Two photomicrographs were obtained from the center area of each sample under 1,500X and 3,500X magnifications, using a scanning electron microscope operated at an accelerating voltage of 20 kV (Jeol T330 A, Jeol Ltd., Peabody, MA, USA). The photomicrographs were scored according to a root surface modification index (Figure 4) adapted for this study.<sup>20</sup> Three evaluations at 15-day intervals were performed by one previously calibrated and experienced examiner. The examiner was blind to the experimental groups. The final score actually recorded for each sample was the most prevalent score among the three evaluations. The scoring criteria for the adapted root modification index used for this study consisted of eight scores, ranging from 1 to 8, as shown in Figure 4. Good reproducibility was achieved for use of the index with a weighted kappa score of 0.93.

#### Statistical Analysis

The nonparametric analysis of variance (Kruskal-Wallis test) was applied to independently evaluate the effect of the three dependent variables: solution concentration, application mode, and application period, at a 5 percent significance level. If a *p* value was  $\leq 0.05$ , Dunn's Multiple Comparison post-hoc test was applied to detect statistically significant differences among the groups. The statistical analyses were performed with the GraphPad Prism 5.00 software (San Diego, CA, USA).

## Results

Citric acid demineralization produced a variety of surface topographies. The surface appearance ranged from a rough amorphous surface with no evidence of fiber material to a surface made up of collagen fibers, best described as a "shag carpet" appearance of tufted fibers. Samples that exhibited exposure of collagen fibers and opening

of dentinal tubules corresponded to concentrations of 1, 15, and 25 percent (Figure 5).

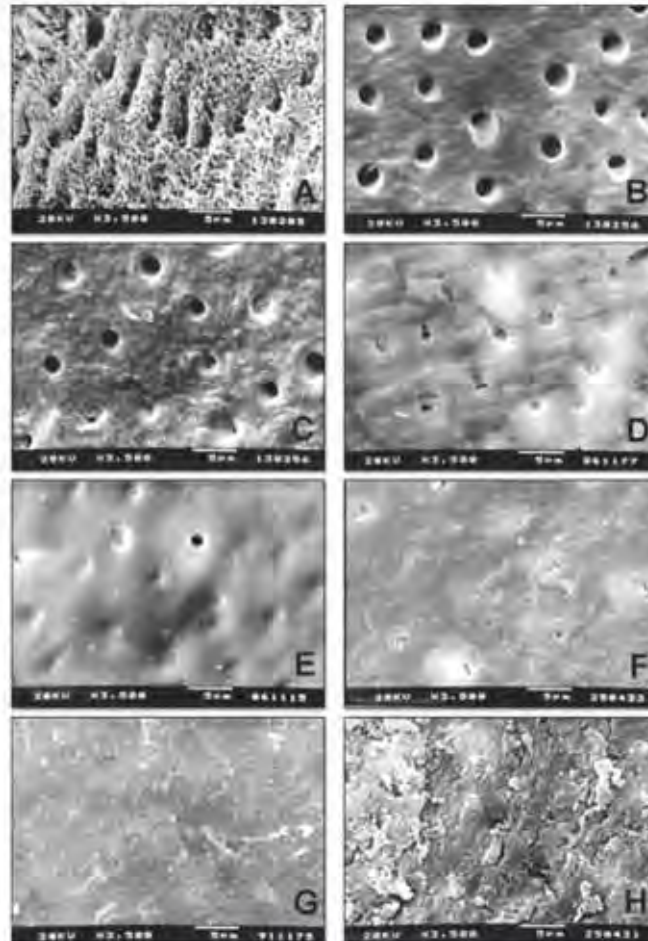
Partial opening of dentinal tubules were observed in all citric acid concentrations and in the control group. Traces of debris were observed in the openings of dentinal tubules at concentrations of 0.5, 1, and 2 percent, and in two samples of the control group. A high frequency of chemical dissolution was observed for all citric acid concentrations evaluated as well as for samples in the control group. Kruskal-Wallis test analysis of variance showed significant differences among groups ( $p < 0.0001$ ). Dunn's post-hoc test showed that significant differences appeared when comparing the control group to all other groups ( $p < 0.05$ ). However, no statistically significant differences were found among the five citric acid solutions of the experimental groups.

There also were no statistically significant differences observed among the three application periods ( $p = 0.0793$ ). Nevertheless, high frequencies of collagen fiber exposure (Score 1) were observed in the application period of three minutes (eight samples) followed by the application period of one minute (seven samples) of citric acid solutions (Figure 6).

Analysis of the effect of the application methods did not find any significant differences among groups ( $p = 0.8525$ ); however, the highest frequency of collagen fibers exposure was observed for the brushing application method (14 samples) (Figure 7).

## Discussion

The results of this study showed that scaling and root planing produced a smear layer that was removed from the root surface by a citric acid application. The smear layer itself is comprised of very small particles of organic and inorganic material.<sup>21-23</sup> These particles vary in size from less than 1  $\mu\text{m}$  to more than 15  $\mu\text{m}$ , and the layer is in intimate contact with the tooth surface and only removed by applying a demineralizing solution.<sup>24,25</sup> Studies have suggested that this smear layer, interposed between the root surface and adjacent connective tissue, may act as a physical barrier for the development of a connective tissue attachment to the root surface.<sup>26</sup> On the other



**Figure 4.** Evaluation criteria used in the adapted root modification index. **(A)** Score 1. Complete smear layer removal with dentin collagen fibers exposure. Complete opened dentin tubules, without a trace of the smear layer on the root surface. **(B)** Score 2. Complete smear layer removal but no collagen fibers exposure. Complete opened dentin tubules. **(C)** Score 3. Traces of smear layer remaining in the openings of dentinal tubules. **(D)** Score 4. Partial opening of the dentinal tubules. **(E)** Score 5. Smear layer formed by chemical dissolution of the dentin surface covering the root surface. **(F)** Score 6. Uniform smear layer covering the dentin surface with some signs of tubule openings. **(G)** Score 7. Dentin surface covered by a uniform smear layer with no signs of dentinal tubule opening. **(H)** Score 8. Rough smear layer covering the dentinal surface.

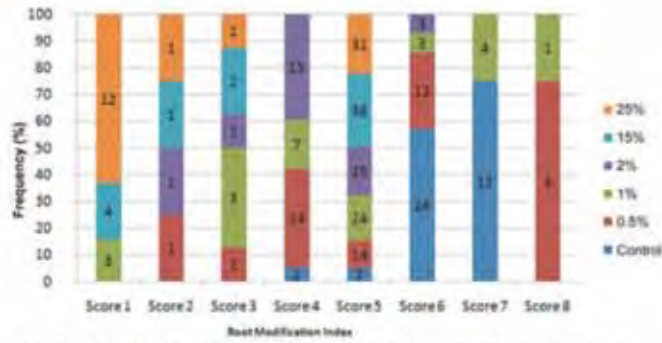


Figure 5. Frequency of concentrations 25, 15, 2, 1, 0.5 percent, and the controls in the scores of root surface modification.

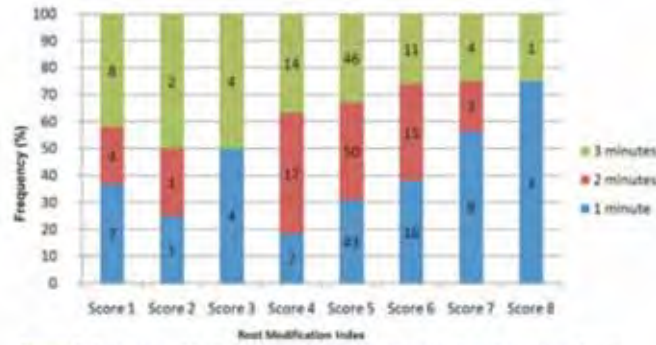


Figure 6. Frequency of 1-, 2-, and 3-minute application periods in the scores of root surface modification.

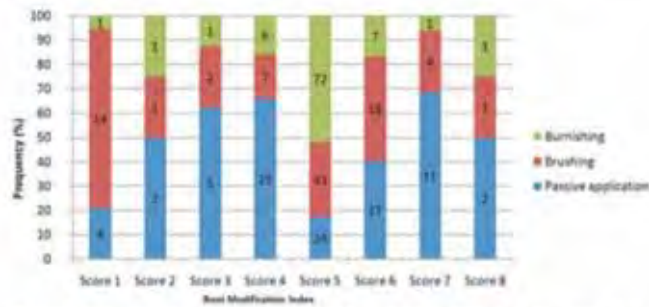


Figure 7. Frequency of passive, brushing, and burnishing applications in the scores of root surface modification.

hand, the collagenous matrix, exposed by the use of demineralizing substances, appears to offer a more "hospitable" environment for cell attachment and may predispose the root to a new connective tissue attachment.<sup>1,3,4,16,22,23</sup>

After evaluating the effects of citric acid concentrations and the parameters of the three application methods and three application periods, variability was noted in the scoring results obtained. All five of the experimental groups exhibited significant differences from the control group. However, there were no significant differences in scores recorded for the five citric acid concentrations.

Despite the lack of significant differences, exposure of collagen fibers was obtained with concentrations of 1, 15, and 25 percent. Thus, the discussion of the results focuses on these three specific concentrations (Figure 5).

It was evident that 25 percent citric acid tended to produce more samples with collagen fiber exposure than either the 1 percent or 15 percent group (Table 1). These results are consistent with those from other studies that reported the optimum dentin demineralization was obtained with citric acid solution concentration between 25 and 30 percent.<sup>22,23</sup>

Although statistical analysis of the application period effects indicated that there were no significant differences among groups, application for one minute as well as three minutes promoted demineralization of dentin and exposure of collagen fibers in a higher frequency than the two-minute application (Figure 6). These results

also are in agreement with Codelli et al.,<sup>24</sup> who showed that complete demineralization could be achieved in three minutes with a burnishing action, compared to partial demineralization after three minutes with nonburnished (passive) action. Furthermore, five minutes of burnishing actually tended to result in excessive demineralization.

Furthermore, the results of the present study showed that the application of citric acid using the brushing technique tended to produce better results. Despite the lack of significant differences, brushing resulted in a higher frequency of samples with exposure of collagen fibers (Score 1), whereas burnishing tended to produce a higher number of samples that exhibited excessively demineralized surfaces (Score 5) (Figure 7).

Excessive demineralization seems to occur as a result of chemical and mechanical dissolution of the inorganic hydroxyapatite. The results of this study suggest that excessive demineralization is associated with the burnishing technique, as illustrated in Figure 7. Excessive demineralization of the dentin surface also raises the question of the biological acceptability of the resulting surface. Studies have suggested that a collagenous root surface, devoid of surface debris, offers a higher number of biological mechanisms by which new connective tissue attachment formation can be accelerated.<sup>1,2,16,22,23</sup> These mechanisms include collagen splicing, mesenchymal cell induction, fibronectin adhesion, and fibroblast attachment. Studies have shown that demineralized dentin surfaces have a greater capacity to bind fibronectin than surfaces that did not undergo demineralization.<sup>25,26</sup> Apparently this increase

**Table 1. Sample distribution for the citric acid concentrations that produced a score of 1 according to the root surface modification index.**

	1%	15%	25%	
<b>Number of samples (n) and percentage (%)</b>	<b>Citric Acid Concentrations</b>			
	3 (100)	4 (100)	12 (100)	
	<b>Application Methods</b>			
	Passive	0	3 (75)	1 (8.33)
	Brushing	3 (100)	1 (25)	10 (83.33)
	Burnishing	0	0	1 (8.33)
	<b>Application Periods</b>			
	1 minute	3 (100)	0	4 (33.33)
	2 minutes	0	2 (50)	2 (16.67)
	3 minutes	0	2 (50)	6 (50)

in binding is due to exposure of more fibronectin binding sites on the collagen matrix. This change may increase the total number of binding sites available for proteins such as fibronectin, which in turn may help stabilize a mucoperiosteal flap during the initial stages of wound healing.<sup>32-34</sup>

One aspect of this study, which differs from studies, is the use of hexamethyldisilazane. While other researchers<sup>2,3,11,15,27</sup> used the critical-point drying with CO<sub>2</sub> to prepare samples for SEM, here hexamethyldisilazane was used to dehydrate the samples. This method allows visualization of the collagen matrix in the SEM by preserving the microporosity of the dentin collagen fibers and actually preventing the exposed fibers from collapsing.<sup>35-38</sup>

The use of citric acid as a conditioning agent is supported by the literature and its advantages compared to other conditioning agents is supported by evaluation of blood cell adhesion<sup>40</sup> and by human fibroblast adherence and proliferation to dentin surfaces.<sup>41</sup>

Certainly, other methods can be used to evaluate the effect of the citric acid conditioning and to verify how the results of this study can help the periodontal treatment. These include evaluation of fibroblast behavior on chemically conditioned dentin,<sup>42</sup> evaluation of blood cell adhesion to dentin-conditioned surfaces,<sup>43</sup> quantification of the parts per million (ppm) of calcium removed after conditioning,<sup>44</sup> and immunohistochemical/immunocytochemical analysis of the exposed collagen after conditioning.<sup>25-28</sup>

Considerable variability in results may be seen among the various studies. Several factors, such as scaling details (hand scaling vs. piezoelectric scaling), could negatively interfere with the amount of residual calculus and root surface roughness.<sup>45-48</sup> There are other considerations when selecting a substance for root conditioning because the outcome also may be influenced by the

- application period, application method, concentration, and pH of the substance used,<sup>49</sup>
- dilution and inactivation of substances when in contact with blood during surgical procedures,<sup>47</sup>
- preparation of samples and the storage medium, as well as a high degree of mineralization of the teeth, and

- pressure applied during the application process itself.

In addition, characteristics of the conditioning substance and a lack of a universal root modification index also may contribute to the reporting of varying results in the literature. For these reasons, we believe that exposure of collagen fibers by means of root conditioning is difficult to obtain as explained by the extensive variability and conflicting results found in the dental literature.

## Conclusion

According to the results obtained in this study and within the limitations of the methodology used, it can be inferred that despite the lack of statistical significance, the best results for exposure of collagen fibers were obtained with application of citric acid at 25 percent by brushing for one or three minutes.

These results may contribute to the interpretation of other investigations found in the literature, for the design of *in vivo* studies on root conditioning, and for the clinical application of citric acid root conditioning in both periodontal treatment and regenerative procedures in order to optimize results. However, additional studies are recommended to support or refute these findings.

## Clinical Significance

The best results for exposure of collagen fibers on root surfaces noted in this study were obtained with application of citric acid at 25 percent by brushing for one or three minutes.

## References

1. Garrett JS, Grigger M, Egelberg J. Effects of citric acid on diseased root surfaces. *J Periodontol Res*. 1978; 13(2):155-63.
2. Register AA, Burdick FA. Accelerated reattachment with cementogenesis to dentin, demineralized *in situ*. *J Optimum range*. *J Periodontol*. 1975; 46(11):646-55.
3. Register AA, Burdick FA. Accelerated reattachment with cementogenesis to dentin.

- demineralized *in situ*. II. Defect repair. *J Periodontol*. 1976; 47(9):497-505.
4. Stahl SS. Repair potential of the soft tissue-root interface. *J Periodontol*. 1977; 48(9):545-52.
  5. Blomlöf JP, Blomlöf LB, Lindskog SP. Smear layer formed by different root planing modalities and its removal by an ethylenediaminetetraacetic acid gel preparation. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 1997; 17(3):242-9.
  6. Eck JD, Wilko RA, Anderson CH, Sorenson SE. Scanning electron microscopy of cut tooth surfaces and identification of debris by use of the electron microscope. *J Dent Res*. 1970; 49(6):Suppl.1359-68.
  7. Polson AM, Fredenck GT, Ladenheim S, Haines PJ. The production of a root surface smear layer by instrumentation and its removal by citric acid. *J Periodontol*. 1984; 55(8):443-6.
  8. Boyko GA, Brunette DM, Meicher AH. Cell attachment to demineralized root surfaces *in vitro*. *J Periodontol Res*. 1980; 15(3):297-303.
  9. Ishi EP, Dantas AA, Batista LH, Onofre MA, Sampaio JE. Smear layer removal and collagen fiber exposure using tetracycline hydrochloride conditioning. *J Contemp Dent Pract*. 2008; 9(5):25-33.
  10. Lafferty TA, Ghar ME, Gray JL. Comparative SEM study on the effect of acid etching with tetracycline HCl or citric acid on instrumented periodontally-involved human root surfaces. *J Periodontol*. 1993; 64(8):689-93.
  11. Sterrett JD, Bain C. Citric acid burnishing of dentinal root surfaces. A preliminary scanning electron microscopy report. *J Can Dent Assoc*. 1987; 53(5):395-7.
  12. Sterrett JD, Dhillon M, Murphy HJ. Citric acid demineralization of cementum and dentin: the effect of application pressure. *J Clin Periodontol*. 1995; 22(6):434-41.
  13. Sterrett JD, Murphy HJ. Citric acid burnishing of dentinal root surfaces. A scanning electron microscopy report. *J Clin Periodontol*. 1989; 16(2):98-104.
  14. Albair WB, Cobb CM, Killoy WJ. Connective tissue attachment to periodontally diseased roots after citric acid demineralization. *J Periodontol*. 1982; 53(8):515-26.
  15. Cole RT, Crigger M, Bogle G, Egelberg J, Selvig KA. Connective tissue regeneration to periodontally diseased teeth. A histological study. *J Periodontol Res*. 1960; 15(1):1-9.
  16. Crigger M, Bogle G, Nilvéus R, Egelberg J, Selvig KA. The effect of topical citric acid application on the healing of experimental furcation defects in dogs. *J Periodontol Res*. 1978; 13(6):538-49.
  17. Froum SJ, Kushner L, Stahl SS. Healing responses of human intraosseous lesions following the use of debridement, grafting and citric acid root treatment. I. Clinical and histologic observations six months postsurgery. *J Periodontol*. 1983; 54(2):67-76.
  18. Stahl SS, Froum SJ, Kushner L. Healing responses of human intraosseous lesions following the use of debridement, grafting and citric acid root treatment. II. Clinical and histologic observations: one year postsurgery. *J Periodontol*. 1983; 54(6):325-38.
  19. Lan WC, Lan WH, Chan CP, Hsieh CC, Chang MC, Jeng JH. The effects of extracellular citric acid acidosis on the viability, cellular adhesion capacity and protein synthesis of cultured human gingival fibroblasts. *Aust Dent J*. 1999; 44(2):123-30.
  20. Leite FR, Sampaio JE, Zandim DL, Dantas AA, Leite ER, Leite AA. Influence of root-surface conditioning with acid and chelating agents on clot stabilization. *Quintessence Int*. 2010; 41(4):341-9.
  21. Codell GR, Fry HR, Davis JW. Burnished versus nonburnished application of citric acid to human diseased root surfaces: the effect of time and method of application. *Quintessence Int*. 1991; 22(4):277-83.
  22. Polson AM, Proye MP. Effect of root surface alterations on periodontal healing. II. Citric acid treatment of the denuded root. *J Clin Periodontol*. 1982; 9(6):441-54.
  23. Sterrett JD, Bankley T, Murphy HJ. Dentin demineralization. The effects of citric acid concentration and application time. *J Clin Periodontol*. 1993; 20(5):366-70.
  24. Sampaio JE, Theodoro LH, Correa MA, Mendes AJ. A comparative SEM study of smear layer removal by detergents and EDTA on the root surface. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2005; 25(2):157-63.
  25. Brännström M, Johnson G. Effects of various conditioners and cleaning agents on prepared dentin surfaces: a scanning electron microscopic investigation. *J Prosthet Dent*. 1974; 31(4):422-30.
  26. Michelich VJ, Schuster GS, Pashley DH. Bacterial penetration of human dentin *in vitro*. *J Dent Res*. 1980; 59(8):1398-403.
  27. Leidal TI, Eriksen HM. A scanning electron microscopic study of the effect of various



- cleansing agents on cavity walls *in vitro*. *Scand J Dent Res*. 1979; 87(6):443-9.
26. Polson AM, Proye MP. Fibrin linkage: a precursor for new attachment. *J Periodontol*. 1983; 54(3):141-7.
  29. Stenett JD, Delaney B, Rizkalla A, Hawkins CH. Optimal citric acid concentration for dentinal demineralization. *Quintessence Int*. 1991; 22(5):371-5.
  30. Fernyhough W, Page RC. Attachment, growth and synthesis by human gingival fibroblasts on demineralized or fibronectin-treated normal and diseased tooth roots. *J Periodontol*. 1983; 54(3):133-40.
  31. Karp W, Sodek J, Aubin JE, Melcher AH. A comparison of fibronectin and laminin binding to undemineralized and demineralized tooth root surfaces. *J Periodontol Res*. 1985; 21(1):30-8.
  32. Breschi L, Gobbi P, Lopes M, Prati C, Falconi M, Teti G, Mazzotti G. Immunocytochemical analysis of dentin: a double-labeling technique. *J Biomed Mater Res A*. 2003; 67(1):11-7.
  33. Breschi L, Perdigão J, Gobbi P, Mazzotti G, Falconi M, Lopes M. Immunocytochemical identification of type I collagen in acid-etched dentin. *J Biomed Mater Res A*. 2003; 68(4):764-9.
  34. Ruggeri A Jr, Prati C, Mazzoni A, Nucci C, Di Lenarda R, Mazzotti G, Breschi L. Effects of citric acid and EDTA conditioning on exposed root dentin: An immunohistochemical analysis of collagen and proteoglycans. *Arch Oral Biol*. 2007; 52(1):1-8.
  35. Bray DF, Bagu J, Koegler P. Comparison of hexamethyldisilazane (HMDS), Peldri II, and critical-point drying methods for scanning electron microscopy of biological specimens. *Microsc Res Tech*. 1993; 26(6):489-95.
  36. Guarnard D, Kirschner RH. Cell and organelle shrinkage during preparation for scanning electron microscopy: effects of fixation, dehydration and critical point drying. *J Microsc*. 1977; 110(1):51-7.
  37. Notlion JL. A new method using hexamethyldisilazane for preparation of soft insect tissues for scanning electron microscopy. *Stain Technol*. 1983; 58(6):347-51.
  38. Perdigão J, Lambrechts P, Van Meerbeek B, Vanherle G, Lopes AL. Field emission SEM comparison of four postfixation drying techniques for human dentin. *J Biomed Mater Res*. 1995; 29(9):1111-20.
  39. Rompen EH, Goffinet GH, Nusgens B. Human periodontal ligament fibroblast behavior on chemically conditioned dentine: an *in vitro* study. *J Periodontol*. 1999; 70(10):1144-52.
  40. Hunter RK, O'Leary TJ, Kastraw AH. The effectiveness of hand versus ultrasonic instrumentation in open flap root planing. *J Periodontol*. 1984; 55(12):697-703.
  41. Jacobson L, Blomlöf J, Lindskog S. Root surface texture after different scaling modalities. *Scand J Dent Res*. 1994; 102(3):156-60.
  42. Takacsi VJ, Lie T, Perala DG, Adams DF. Efficacy of 5 machining instruments in scaling of molar furcations. *J Periodontol*. 1993; 64(3):228-36.
  43. Bergholtz A, Babay N. Scanning electron microscopy of the root surface texture of extracted periodontally diseased teeth following various etching and chelating regimens. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 1998; 18(2):171-9.

## About the Authors

### Rodrigo Cavassim, DDS, MSc (Corresponding Author)

Dr. Cavassim is a PhD student in periodontics, Department of Diagnostics and Surgery, School of Dentistry at Araraquara, São Paulo State University, UNESP, São Paulo, Brazil.

e-mail: [rcavassim@yahoo.com.br](mailto:rcavassim@yahoo.com.br)

### Fábio Renato Manzoli Leite, DDS, MSc

Dr. Leite is a PhD student in periodontics, Department of Diagnostics and Surgery, School of Dentistry at Araraquara, São Paulo State University, UNESP, São Paulo, Brazil.

e-mail: [leite.fabio@gmail.com](mailto:leite.fabio@gmail.com)

### Daniela Leal Zandim, DDS, MSc

Dr. Zandim is a PhD student in periodontics, Department of Diagnostics and Surgery, School of Dentistry at Araraquara, São Paulo State University, UNESP, São Paulo, Brazil.

e-mail: [darszandim@yahoo.com.br](mailto:darszandim@yahoo.com.br)

**Andrea Abi Rached Dantas, DDS, MSc**

Dr. Dantas is a PhD student in periodontics, Department of Diagnostics and Surgery, School of Dentistry at Araraquara, São Paulo State University, UNESP, São Paulo, Brazil.

e-mail: [aarached@yahoo.com.br](mailto:aarached@yahoo.com.br)

**José Eduardo Cezar Sampaio, DDS, PhD**

Dr. Sampaio is an adjunct professor of periodontology in the Department of Diagnostics and Surgery, School of Dentistry at Araraquara, São Paulo State University, UNESP, São Paulo, Brazil.

e-mail: [jsampaio@fcar.unesp.br](mailto:jsampaio@fcar.unesp.br)

# Capítulo 2

Artigo submetido a Brazilian Dental Journal



**Influence of different root instrumentation procedures associated with chemical root decontamination with citric acid and tetracycline hydrochloride on the clot adhesion on periodontally affected root surfaces - A SEM Study**

\* Rodrigo CAVASSIM

\* Shelon C. S. PINTO

\* Lucas A. FONTANARI

\* José E. C. SAMPAIO

***Corresponding author:***

Prof. Dr. José Eduardo Cezar Sampaio

Department of Oral Diagnostic and Surgery

Araraquara Dental School, UNESP – Univ. Estadual Paulista,

1680 Humaitá St – ZIP Code 14801-903 - Araraquara-SP, BRAZIL

Fone: 55-16-3301-6374

Fax: 55-16-3301-6369

E-mail: [jsampaio@foar.unesp.br](mailto:jsampaio@foar.unesp.br)

Running title: Blood cells adhesion on affected teeth

Keywords: root instrumentation; root conditioning, periodontal disease, blood component adhesion, periodontal regeneration, SEM evaluation

## SUMMARY

The aim of this study was to evaluate the influence of root chemical decontamination and different instrumentation means, in clot and blood elements adhesion. One hundred and fifty periodontally affected teeth were divided into five groups: Group I, instrumentation with curettes; Group II, instrumentation with curettes removing the superficial calculus; Group III, ultrasonic scaler with removal of the superficial calculus; Group IV, ultrasonic scaler for removal of the superficial calculus and after that, instrumentation with curettes; Group V, calculus surface. These five groups were further divided into three subgroups (10 samples each) according to the root conditioning method used: a) no root conditioning; b) root conditioning with citric acid; c) root conditioning with tetracycline hydrochloride. After treatments, a drop of fresh human whole peripheral blood was applied to the external root surface. The blood was allowed to clot onto the root samples and then, the samples were prepared for SEM analyses. Chemical root conditioning favored considerable fibrin network formation and blood components adhesion in groups I and IV. No differences were observed when comparing instrumentation means. These results indicate that scaling and root planning associated with root conditioning were able to encourage the formation of fibrin network and adhesion of blood components.

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência da descontaminação química e diferentes meios de instrumentação na adesão de coágulo e elementos sanguíneos. Cento e cinquenta dentes afetados periodontalmente foram divididos em cinco grupos: Grupo I, instrumentação com curetas; Grupo II instrumentação com curetas removendo cálculo superficial; Grupo III, remoção do cálculo superficial com ultrassom; Grupo IV, remoção do cálculo superficial com instrumento ultrassônico seguido pela instrumentação com curetas Grupo V, superfície com cálculo. Estes cinco grupos foram divididos em três subgrupos (10 amostras cada) de acordo com o condicionamento químico: a) sem condicionamento químico; b) condicionamento químico com ácido cítrico; c) condicionamento químico com cloridrato de tetraciclina. Após os tratamentos, uma gota de sangue humano da

circulação periférica foi aplicada à superfície radicular das amostras. Foi aguardado o período para coagulação e as amostras foram então preparadas para microscopia eletrônica de varredura. O condicionamento químico favoreceu considerável formação de rede de fibrina e adesão de células sanguíneas nos grupos I e IV. Nenhuma diferença foi observada na comparação dos métodos de instrumentação. Os resultados indicaram que a raspagem e alisamento radicular associada ao condicionamento químico favoreceu a formação de rede de fibrina e adesão de células sanguíneas.

## INTRODUCTION

Periodontal disease is characterized by chronic inflammatory processes caused by the presence of specific pathogen microorganisms, which trigger host response, progressive destruction of alveolar bone and apical migration of connective and epithelial attachments over time (1, 2). Scaling and root planning (SRP) is the main treatment for periodontal disease. One of the objectives of the periodontal therapy is the reduction of bacterial deposits and calculus on tooth surfaces (3). These procedures may be accomplished by using sonic, ultrasonic and manual hand instruments and has proved to be efficient in the control of gingivitis and periodontitis, producing a root that is biologically acceptable for healing process (4, 5).

The main objective is the removal of the subgingival biofilm, calculus and endotoxins from the root surface (5, 6) and also to accomplish a shift in microbial flora (7). However, it is well known that the root instrumentation results in a 2-15  $\mu\text{m}$  in thickness layer formed of organic and mineralized debris. This layer is known as smear layer, and it covers the surface of teeth that underwent scaling and root planning. These layer as well as residual calculus may impair healing and soft tissue regeneration following periodontal treatment. So, there is an attempt to remove all the mineralized deposits from the root surface, thus improving periodontal regeneration.

The goal of scaling and root planning is to promote smooth root surfaces, relatively free of smear layer and any associate calculus, bacteria or endotoxin-

contaminated root cementum (6, 8). This condition is more favorable to optimize healing and enhance periodontal regeneration.

Ultrasonic instruments are as effective in removing subgingival plaque and subgingival calculus as hand instruments. However, complete removal of subgingival calculus with hand or machine instruments is impossible (9).

Once it is not possible to completely remove calculus and the instrumentation of the root surface produces a contaminated smear layer that may impair periodontal regeneration, we decide to conduct a study in order to evaluate the blood cell attachment to differently instrumentation methods of the root surface. In addition, two substances for decontamination were planned to be evaluated in this study. Citric acid and tetracycline hydrochloride are able to remove the smear layer produced after root instrumentation or even to demineralize it (10, 11). In an attempt to evaluate the effect of root conditioning in the residual calculus left after incomplete root instrumentation and decontamination of the root surface, these two substances were included in this study.

In sum, the objective of this study was to evaluate the blood cell adhesion to periodontally affected root surfaces submitted to mechanical instrumentation performed using conventional cures or piezoelectric scalers when used singlehandedly or with a combined technique and the association of chemical root decontamination to the mechanical instrumentation. The blood cell adhesion was evaluated by means of scanning electron microscopy.

#### MATERIAL AND METHODS

This study was approved by the Research Ethics Committee of Araraquara Dentistry School—UNESP—Brazil (protocol # 15/09). A total of 150 human teeth lost due to chronic periodontitis were obtained from the Human Teeth Bank of the institution. These teeth had no evidence of dental caries, restorations below the cemento-enamel junction (CEJ), or any other cervical root lesions. All the teeth had calculus adhered to the cervical third of the root surface.

### *Experimental Design*

After extraction, teeth were stored in water at room temperature for no longer than 3 months. All teeth were randomly divided into five groups (n=30 for each group) and a region of interest (ROI) which contained subgingival calculus was defined on one of the root surface aspects of each tooth. The ROI was instrumented by a single operator according to the groups:

**Group I (curette only):** each experimental surface was instrumented by applying sufficient strokes until complete calculus removal and achievement of a hard and smooth surface, clinically tested with an explorer. It was done using a new and sharpened Gracey's curette 7-8 (Hu-Friedy Mfg. Co., Inc.).

**Group II (curette removing superficial calculus):** each experimental surface was instrumented with a new and sharpened Gracey's curette 7-8 (Hu-Friedy Mfg. Co., Inc.), only removing the superficial calculus. The root planning was not performed in this group.

**Group III (ultrasonic scaler removing superficial calculus):** each experimental surface was instrumented with a periodontal tip mounted on an ultrasonic handpiece (Profi II Ceramic – Dabi Atlante, Ribeirão Preto, SP, Brazil) working at 24 to 28 kHz in a vertical direction under copious water irrigation. In this group, only the superficial calculus was removed using the ultrasonic tip.

**Group IV (ultrasonic scaler/curette):** each experimental surface was first instrumented with a periodontal tip mounted on an ultrasonic handpiece (Profi II Ceramic - Dabi Atlante, Ribeirão Preto, SP, Brazil) working at 24 to 28 kHz in a vertical direction under copious water irrigation. Only the superficial calculus was removed using the ultrasonic tip. After that, each experimental surface was instrumented by applying sufficient strokes until complete calculus removal and achievement of a hard and smooth surface clinically tested with an explorer. It was done using a new and sharpened Gracey's curette 7-8 (Hu-Friedy Mfg. Co., Inc.).

**Group V (calculus surface):** control group. Root surface with dental calculus.



### **Sample preparation**

The ROI was marked at the most coronal and apical portion using a pencil (Figure 1).

After undergoing one of the proposed treatments (Figure 2), the teeth were sectioned using a flexible double faced diamond disc (# 7020 – Ø 0.22 mm – thickness: 0.15 mm) (KG Sorensen, Barueri, SP, Brazil) at low speed. The roots were crosscut in the first mark, separating them from the crown (Figure 3-a). All roots were immediately cut lengthwise in the bucco-lingual orientation and then in the mesio-distal orientation (Figure 3-b). Finally, the sample was obtained by sectioning at the apical mark (Figure 3-c and 3-d).

### **Root Conditioning**

These five groups were further divided into three subgroups (10 samples each) according to the root conditioning method used. These subgroups are listed below:

**Subgroup a:** no substance was applied to the root surface.

**Subgroup b:** the samples were root conditioned with citric acid 25% by brushing application with a soft brush (Disposable Brush Tips Ø2, 3M ESPE, Seefeld, Germany) for 3 minutes (10).

**Subgroup c:** the samples were root conditioned with tetracycline hydrochloride 50 mg/mL by burnishing with a small cotton pellet for 3 minutes (11).

Thereafter each sample was rinsed with 10 ml of saline solution and identified with a code for blind scoring of the SEMs.

### **Root preparation with blood tissue**

Immediately after treatments, a drop of fresh human whole peripheral blood from a healthy male donor was applied to the external root surface of the 10 samples of each group. The blood was allowed to clot onto the root samples for 20 minutes in a humidified chamber at room temperature. Samples were then rinsed three times for 5 minutes in PBS. Washes and rinses of the root blocks were performed in small Petri dishes with a gentle swirling motion using a rotating tabletop shaker (Mini-Rocker Shaker, Boeco, Hamburgo, Alemanha) at low speed. After rinsing, the blocks were fixed in 1% formaldehyde in PBS for 15 minutes. After three 5-minute PBS rinses, the blocks were incubated for 10 minutes in 0.02 mol glycine

in PBS and rinsed again. The samples were post fixed in 2.5% glutaraldehyde in PBS for 30 minutes and rinsed again.

All samples were then dehydrated in an increasingly graded ethanol series (25%, 50%, 75%, 95%) for 10 minutes each. Following, the samples underwent dehydration in 100% percent ethanol for 3 times of 10 minutes each.

Finally, samples were dried overnight in a dehydration jar (Corning, Corning Life Sciences, São Paulo, SP, Brazil), mounted on metallic stubs (Senai, Sao Paulo, SP, Brazil) and sputter-coated with a thin 25 nm layer of 99.99% pure gold (Balt-Tec SCD-050, Balt-Tec, Gnathole Farm, Kettlethulme, High Peak, Cheshire - UK).

#### **Scanning electron microscopy evaluation**

Two photomicrographs were obtained from the center area of each sample with 500X and 2,000X magnifications, using a scanning electron microscope operated at an accelerating voltage of 20 kV (Jeol T330 A, Jeol Ltd., Peabody, MA, USA).

After the photomicrographs were obtained, they were identified and scored as follows to verify the blood component adhesion (BCA) and to analyze the morphologic characteristics obtained in the treatment, as follows: **Score 1** -Root surface showing absence of blood components and complete inhibition of fibrin network formation. **Score 2** -Poorly organized fibrin network with scarce cells covering the conditioned root surface. **Score 3** - Root surface covered by a moderate thin fibrin network with a few quantity of blood cells. **Score 4** - Organized fibrin network with large amount of entrapped blood cells.

Three evaluations at 15-day intervals were performed by one previously calibrated and experienced examiner. The examiner was blind to the experimental groups. The final score actually recorded for each sample was the most prevalent score among the three evaluations. The scoring criteria for the Blood Component Adhesion Index used for this study consisted of four scores, ranging from 1 to 4, as shown in Figures 4 to 7. Good reproducibility was achieved for use of the index with a weighted kappa score of 0.87.

### Statistical analysis

Data were analyzed using GraphPad Prism 5 statistical software (GraphPad, La Jolla, CA, USA). Level of significance was set at  $\alpha = 0.05$  (two-sided). Once the data did not show normal distribution, non-parametric analysis was used for comparisons. Differences among groups and among subgroups were tested using Kruskal-Wallis test and Dunn's post hoc test.

### RESULTS

Basically four different morphological patterns of clot adhesion were observed in the evaluated groups. These patterns range from the absence of fibrin network to the presence of a dense network of fibrin with entrapment of blood components.

The results for clot adhesion according to the root chemical conditioning are shown in Table 1. This table shows the comparison between citric acid, tetracycline hydrochloride and subgroups that received no chemical conditioning.

The results for the comparison of the effect of the root instrumentation are shown in Figure 4.

#### *Descriptive analyses for blood components adhesion*

In group I, subgroup Ib presented the best results. In this subgroup, three samples (30%) had fibrin network formation and adhesion of blood elements and other four samples (40%) showed development of an organized fibrin network. In the subgroup Ic only one sample (10%) showed formation of fibrin network organized with the adhesion of blood elements. The vast majority of samples (8 samples - 80%) showed only a poor network of fibrin on the root surface.

In group II, although not present significant differences, subgroup IIb showed better results for formation of a fibrin network. There are two samples (20%) with moderate fibrin network formation and seven samples (70%) with poorly organized fibrin network. Subgroup IIc had nine samples (90%) with poorly organized fibrin network.

In group III there was a similar pattern of blood components adhesion in all subsets. In each of the subgroups, 9 samples (90%) had poor formation of fibrin network.

In group IV there was a subgroup superiority of IVc, which showed eight samples (80%) with formation of dense fibrin network. The subgroups IVa and IVb were predominant in samples with poor formation of fibrin network.

In group V, was the predominance of samples without the formation of fibrin network in all subgroups.

## DISCUSSION

Periodontally-affected root surfaces treated with conventional non-surgical periodontal treatment might be not completely free from contaminants due to the presence of a residual smear layer created during instrumentations and residual calculus of an incomplete instrumentation (12). Since this residual calculus present on the tooth root is prone to contamination, discusses the importance of smear layer removal and decontamination of residual calculus.

The presence of the smear layer and residual calculus on the instrumented root surfaces has been shown to act as a contaminated physical barrier between the periodontal tissues and the root surface (13, 14) unsuitable for reintegration in periodontal connective tissue (15). Thus, this study investigated the effect of different means used for scaling and root planning and chemical root conditioning in the decontamination of the root surface as a mean to remove contamination from the root surface and let possible the creation of a suitable root surface for the development of a reintegration in periodontal connective tissue.

Previous study (16) has shown that citric acid and tetracycline hydrochloride are able to improve the blood component adhesion elements after scaling and root vigorously. However, scaling and root planning is a difficult procedure to perform. Success is highly dependent on the skill of the clinician and may end up being held in an incomplete manner, without complete removal of dental calculus (6, 17). In addition to scaling and root planning, root instrumentation can also be performed using ultrasonic instruments. Evidence indicates that manual instrumentation in general takes from 20% to 50% longer to achieve the same clinical end-points than that of sonic and/or ultrasonic scalers (17).

In this study, intragroup comparison showed that the formation of a fibrin network and adhesion of blood components was favored by vigorous scaling and root planning, when in association to chemical root conditioning. In group I the chemical conditioning with citric acid favored the formation of fibrin network and blood components adhesion. In group IV the chemical root conditioning with tetracycline hydrochloride favors the formation of fibrin network and blood components adhesion.

In intergroup comparison (Figure 4), differences among the means of root instrumentation in relation to the formation of fibrin network and adhesion of blood elements were not significant, except between subgroups IIc and IVc.

One factor that may have influenced the samples which undergone chemical conditioning in group I to increase formation of fibrin network and adhesion of blood components is that were used teeth lost due to chronic periodontitis. These teeth were exposed to injuries and have their root surface with a higher degree of mineralization (18). The vigorous scaling and root planning is able to remove this mineralized layer, thereby providing the conditioning agents may act by removing the smear layer produced by scaling and root planning and expose the collagen matrix of dentin. On the other hand, groups in which only the superficial dental calculus was removed, a mineralized layer with endotoxins was kept on the root surface, hindering the action of chemical agents (19, 20).

Another hypothesis for the formation of fibrin network and adhesion of blood components did not occur in samples from groups II, III and V is that the conditioning agents were not sufficiently able to remove endotoxins and contamination remaining on the root surface of the samples. Endotoxin removal is nearly complete only after the same number of working strokes, reaching levels similar to periodontally healthy teeth. These findings are related only to manual hand instrumentation (19). Calculus removal seems to require less than 20 working strokes to be complete, relative to a standard area of 1-mm width on the circumference of the root. The following strokes serve only to remove root substance, which seems to be unnecessary (19).

## CONCLUSION

Within the limitations of the methodology, it can be concluded that scaling and root planing with curettes associate with chemical root decontamination were able to encourage the formation of fibrin network and adhesion of blood components, independent of having been held in isolation or after the use of ultrasound scalers.

## REFERENCES

1. Armitage GC. Diagnosis of periodontal diseases. *J Periodontol.* 2003;74: 1237-47.
2. Dayan S, Stashenko P, Niederman R, Kupper TS. Oral epithelial overexpression of IL-1alpha causes periodontal disease. *J Dent Res.* 2004;83: 786-90.
3. Axelsson P, Lindhe J, Nystrom B. On the prevention of caries and periodontal disease. Results of a 15-year longitudinal study in adults. *J Clin Periodontol.* 1991;18: 182-9.
4. Cheetham WA, Wilson M, Kieser JB. Root surface debridement--an in vitro assessment. *J Clin Periodontol.* 1988;15: 288-92.
5. Sherman PR, Hutchens LH, Jr., Jewson LG. The effectiveness of subgingival scaling and root planing. II. Clinical responses related to residual calculus. *J Periodontol.* 1990;61: 9-15.
6. Drisko CH. Nonsurgical periodontal therapy. *Periodontol 2000.* 2001;25: 77-88.
7. Greenstein G, Polson A. Microscopic monitoring of pathogens associated with periodontal diseases. A review. *J Periodontol.* 1985;56: 740-7.
8. Sato K, Yoneyama T, Okamoto H, Dahlen G, Lindhe J. The effect of subgingival debridement on periodontal disease parameters and the subgingival microbiota. *J Clin Periodontol.* 1993;20: 359-65.
9. Busslinger A, Lampe K, Beuchat M, Lehmann B. A comparative in vitro study of a magnetostrictive and a piezoelectric ultrasonic scaling instrument. *J Clin Periodontol.* 2001;28: 642-9.
10. Cavassim R, Leite FR, Zandim DL, Dantas AA, Sampaio JE. Smear layer removal for collagen fiber exposure after citric acid conditionings. *J Contemp Dent Pract.* 2010;11: E001-8.
11. Ishi EP, Dantas AA, Batista LH, Onofre MA, Sampaio JE. Smear layer removal and collagen fiber exposure using tetracycline hydrochloride conditioning. *J Contemp Dent Pract.* 2008;9: 25-33.
12. Gamal AY, Mailhot JM. Effects of EDTA gel preconditioning of periodontally affected human root surfaces on chlorhexidine substantivity - an SEM study. *J Periodontol.* 2007;78: 1759-66.
13. Hanes P, Polson A, Frederick T. Citric acid treatment of periodontitis-affected cementum. A scanning electron microscopic study. *J Clin Periodontol.* 1991;18: 567-75.
14. Polson AM, Frederick GT, Ladenheim S, Hanes PJ. The production of a root surface smear layer by instrumentation and its removal by citric acid. *J Periodontol.* 1984;55: 443-6.

15. Ruggeri A, Jr., Prati C, Mazzoni A, Nucci C, Di Lenarda R, Mazzotti G, et al. Effects of citric acid and EDTA conditioning on exposed root dentin: An immunohistochemical analysis of collagen and proteoglycans. *Arch Oral Biol.* 2007;52: 1-8.
16. Leite FR, Sampaio JE, Zandim DL, Dantas AA, Leite ER, Leite AA. Influence of root-surface conditioning with acid and chelating agents on clot stabilization. *Quintessence Int.* 2010;41: 341-9.
17. Yukna RA, Scott JB, Aichelmann-Reidy ME, LeBlanc DM, Mayer ET. Clinical evaluation of the speed and effectiveness of subgingival calculus removal on single-rooted teeth with diamond-coated ultrasonic tips. *J Periodontol.* 1997;68: 436-42.
18. Fontanari LAF, Pinto SCS, Cavassim R, Spin-Neto R, Ishi EP, Sampaio JEC. Dental root oral environment influences its chemical modification. *Braz Dent J.* in press.
19. Cadosch J, Zimmermann U, Ruppert M, Guindy J, Case D, Zappa U. Root surface debridement and endotoxin removal. *J Periodontal Res.* 2003;38: 229-36.
20. Ramfjord SP. Root planing and curettage. *Int Dent J.* 1980;30: 93-100.

## FIGURES

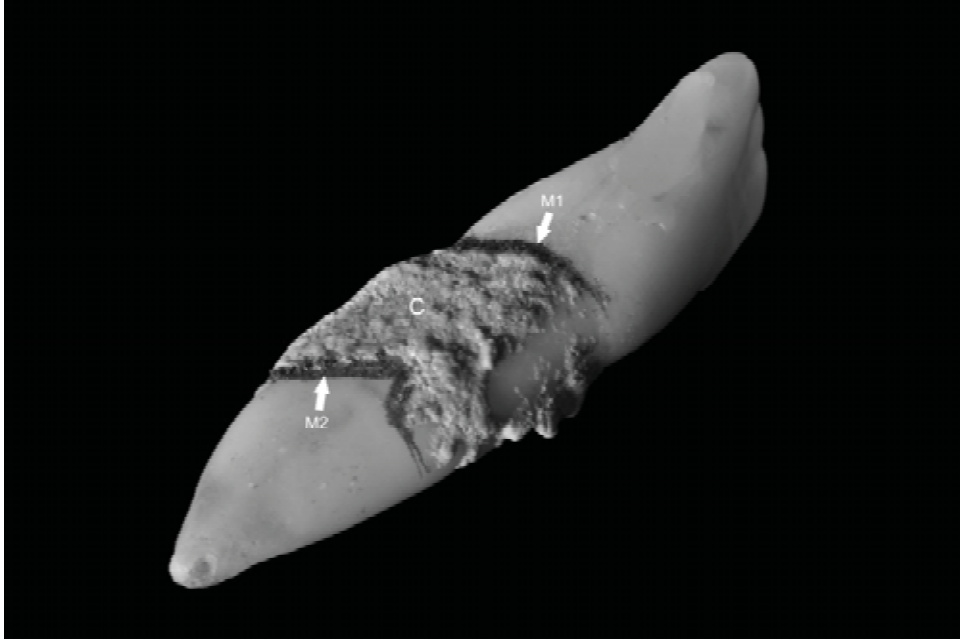


Figure 1 - Tooth lost due to periodontal disease, presenting dental calculus adhered to the root surface. “M1” shows the most coronal mark and “M2” shows the most apical mark. “C” corresponds to the ROI that is covered by dental calculus.



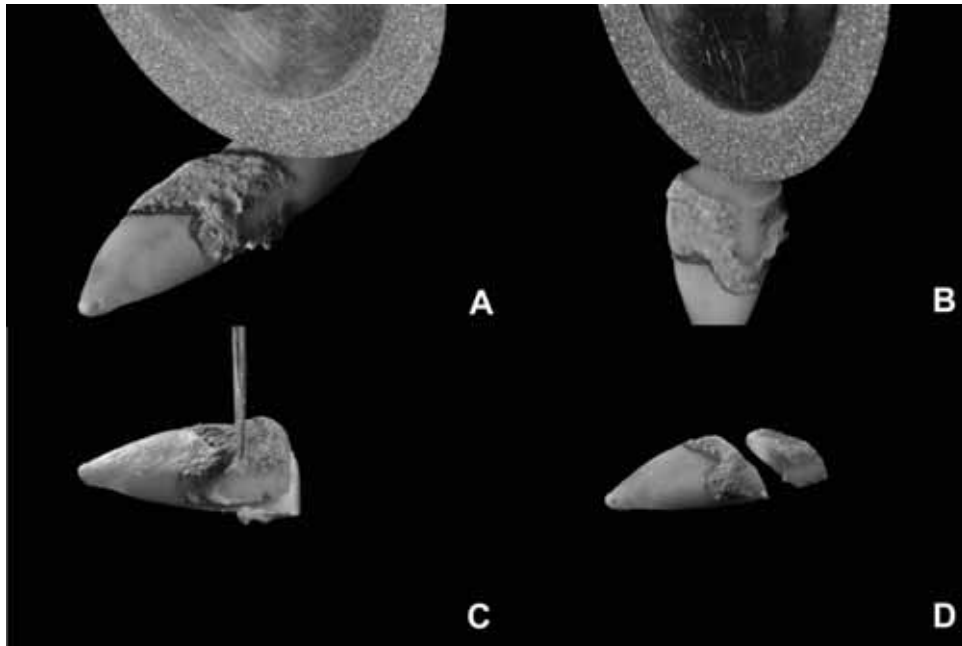


Figure 2 - a) Cutting with diamond disc separating the crown from the ROI. b) Cut in buccal-lingual orientation. c) Cutting in mesio-distal orientation. d) Separate sample.

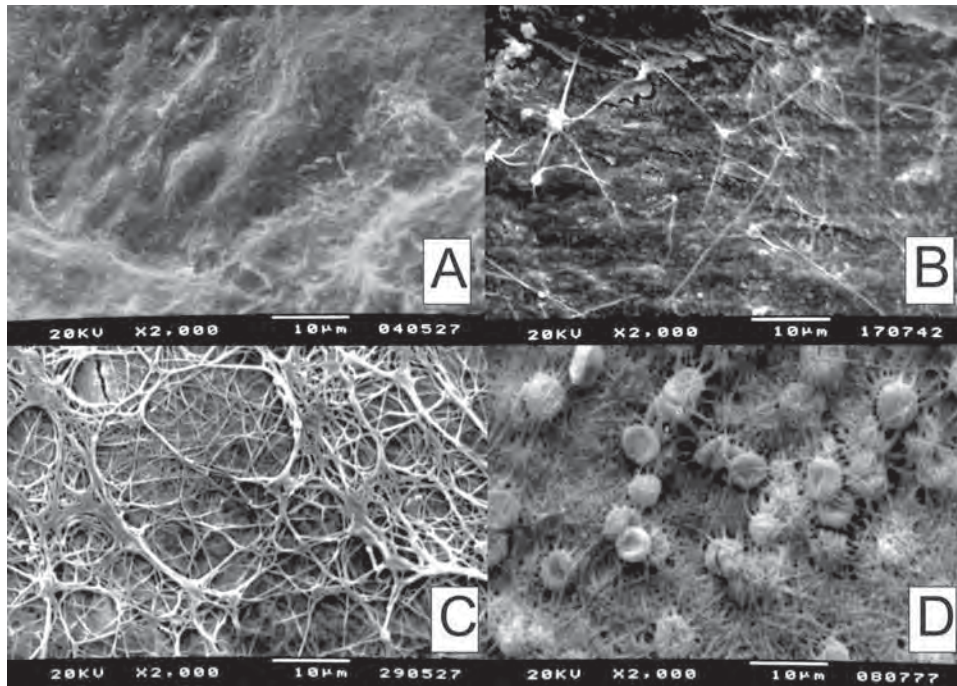


Figure 3 - Blood Component Adhesion Index. A) **Score 1** -Root surface showing absence of blood components and complete inhibition of fibrin network formation. B) **Score 2** -Poorly organized fibrin network with scarce cells covering the conditioned root surface. C) **Score 3** - Root surface covered by a moderate thin fibrin network with a few quantity of blood cells. D) **Score 4** - Organized fibrin network with large amount of entrapped blood cells.

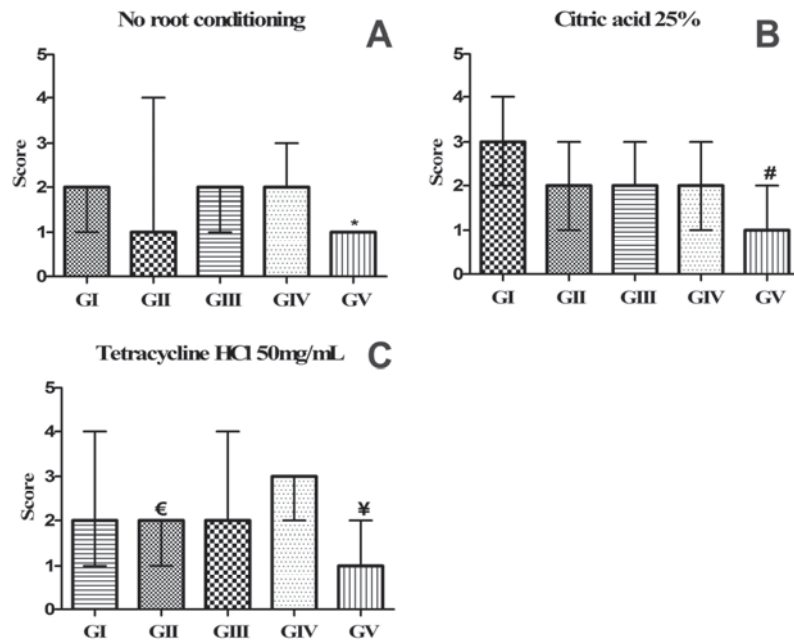


Figure 4 – Median with range according to the root conditioning for the clot adhesion. **A)** No substance was applied to the root surface. **B)** Root conditioning with citric acid 25%. **C)** Root conditioning with Tetracycline HCl 50 mg/mL.

\* Significant differences in comparison to GI, GIII and GIV.

# Significant differences in comparison to GI, GII, GIII and GIV.

¥ Significant differences in comparison to GI, GIII and GIV.

€ Significant difference in comparison between GII and GIV.

Table 1 – Mean  $\pm$  SD and median of scores attributed to groups evaluated according to blood components adhesion

Group	Score	n	%	Mean	SD	Median	<i>p</i>																																																																																																																																																								
Ia	1	1	10	1,90	0,32	2,00	0,0021*																																																																																																																																																								
	2	9	90					Ib	2	3	30	3,00	0,82	3,00	3	4	40	4	3	30	Ic	1	1	10	2,10	0,74	2,00	2	8	80	4	1	10	IIa	1	6	60	1,60	0,97	1,00	0,0626	2	3	30	4	1	10	IIb	1	1	10	2,10	0,57	2,00	2	7	70	3	2	20	IIc	1	1	10	1,90	0,32	2,00	2	9	90	IIIa	1	1	10	1,90	0,32	2,00	0,2346	2	9	90	IIIb	2	9	90	2,10	0,32	2,00	3	1	10	IIIc	2	9	90	2,20	0,63	2,00	4	1	10	IVa	2	9	90	2,10	0,32	2,00	0,0032 <sup>#</sup>	3	1	10	IVb	1	1	10	2,10	0,57	2,00	2	7	70	3	2	20	IVc	2	2	20	2,80	0,42	3,00	3	8	80	Va	1	10	100	1,00	0,00	1,00	0,3416	Vb	1	8	80	1,20	0,42	1,00	2	2	20	Vc	1	9	90	1,10	0,32
Ib	2	3	30	3,00	0,82	3,00																																																																																																																																																									
	3	4	40																																																																																																																																																												
	4	3	30																																																																																																																																																												
Ic	1	1	10	2,10	0,74	2,00																																																																																																																																																									
	2	8	80																																																																																																																																																												
	4	1	10																																																																																																																																																												
IIa	1	6	60	1,60	0,97	1,00		0,0626																																																																																																																																																							
	2	3	30																																																																																																																																																												
	4	1	10																																																																																																																																																												
IIb	1	1	10	2,10	0,57	2,00																																																																																																																																																									
	2	7	70																																																																																																																																																												
	3	2	20																																																																																																																																																												
IIc	1	1	10	1,90	0,32	2,00																																																																																																																																																									
	2	9	90																																																																																																																																																												
IIIa	1	1	10	1,90	0,32	2,00	0,2346																																																																																																																																																								
	2	9	90																																																																																																																																																												
IIIb	2	9	90	2,10	0,32	2,00																																																																																																																																																									
	3	1	10																																																																																																																																																												
IIIc	2	9	90	2,20	0,63	2,00																																																																																																																																																									
	4	1	10																																																																																																																																																												
IVa	2	9	90	2,10	0,32	2,00	0,0032 <sup>#</sup>																																																																																																																																																								
	3	1	10																																																																																																																																																												
IVb	1	1	10	2,10	0,57	2,00																																																																																																																																																									
	2	7	70																																																																																																																																																												
	3	2	20																																																																																																																																																												
IVc	2	2	20	2,80	0,42	3,00																																																																																																																																																									
	3	8	80																																																																																																																																																												
Va	1	10	100	1,00	0,00	1,00		0,3416																																																																																																																																																							
Vb	1	8	80	1,20	0,42	1,00																																																																																																																																																									
	2	2	20																																																																																																																																																												
Vc	1	9	90	1,10	0,32	1,00																																																																																																																																																									
	2	1	10																																																																																																																																																												

Kruskal-Wallis and Dunn's post-hoc test

\* Significant differences among subgroups Ia and Ib and among subgroups Ib and Ic

# Significant differences among subgroups 4aI and 4cI and among subgroups IVb and IVc.

# Capítulo 3

Artigo em fase de submissão



Influence of chemical root decontamination and different instrumentation in root roughness and morphology

#### ABSTRACT

The aim of this in vitro study was to evaluate the effect of chemical and mechanical decontamination in roughness parameters and root morphology. One hundred and fifty human teeth lost due to periodontal disease were used in this study. The teeth were divided into five groups: Group I, instrumentation with curettes; Group II, instrumentation with curettes removing the superficial calculus; Group III, ultrasonic scaler with removal of the superficial calculus; Group IV, ultrasonic scaler for removal of the superficial calculus and after that, instrumentation with curettes; Group V, calculus surface. These five groups were further divided into three subgroups (10 samples each) according to the root conditioning method used: a) no root conditioning; b) root conditioning with citric acid; c) root conditioning with tetracycline hydrochloride. After that, teeth were evaluated according to roughness parameters (Ra, Rt, Ry, Rz) and surface morphology. Similar results were obtained for groups I and IV and among groups II and III. No considerable relevant parameters were observed among groups.

Bacterial plaque and calculus are recognized etiological agents in the initiation and progression of periodontal disease<sup>1</sup>, and their accumulation and attachment are facilitated by a roughened root surface<sup>2,3</sup>. One of the objectives of periodontal therapy is the reduction of bacterial deposits and calculus on tooth surfaces<sup>4</sup>. This

objective can be achieved with hand scalers and curettes or ultrasonic scaling instruments<sup>5,6</sup>. Scaling and root planning to produce smooth root surfaces, together with brushing instructions, are thus an essential component in both treatment and prevention of periodontal disease<sup>7</sup>.

Hand scalers have been successfully used for scaling and root planning. However considerable time and manual dexterity are required for their effective operation<sup>7</sup>. In an attempt to reduce the time necessary for dental calculus removal, ultrasonic scalers have been used for root scaling. Although they are simpler to use, it is often difficult to achieve a smooth and calculus free root surface<sup>8-10</sup>. Most studies conducted with a profilometer have shown that smoother surfaces are obtained with curettes than with an air scaler or ultrasonic instruments<sup>11-14</sup> and ultrasonic scalers tended to increase roughness<sup>11,15,16</sup>.

Wilkinson and Maybury<sup>17</sup> (1973) showed that dental plaque adheres more readily to the roughened root surfaces created by the use of an ultrasonic scaler, altering the prognosis of the periodontal treatment. Moreover it's well known that the root instrumentation results in a 2-15  $\mu\text{m}$  in thickness layer formed of organic and mineralized debris. This layer is known as smear layer, and it covers the surface of teeth that underwent scaling and root planning<sup>18-21</sup>. This layer has an irregular aspect of surface, presenting residual calculus and irregularities that facilitate the adhesion of dental plaque, influencing the periodontal maintenance<sup>18</sup>.

One of the means suggested to remove the smear layer and detoxify the root surface is the use of chemical substances for root conditioning. Among the proposed substances, the most used are citric acid, tetracycline hydrochloride

(HCl), the ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and sodium citrate. EDTA and sodium citrate are less harmful to periodontal tissues; however the chelation properties of these substances against calcium ions may disturb the periodontal wound healing process. Because of these chelation properties, it is not indicate to use EDTA and sodium citrate for root conditioning<sup>22</sup>.

In this study, were selected the citric acid and tetracycline hydrochloride, which has been shown to be more favorable for root conditioning and results in a more stabilized clot on the root surface, which act as a scaffold for connective tissue cell development<sup>23</sup>.

### **Objective**

The main objective of this in vitro study was to evaluate the effect of chemical and mechanical decontamination in roughness parameters and root morphology.

### **Material and Method**

This study was approved by the Research Ethics Committee of Araraquara Dentistry School—UNESP—Brazil (protocol # 15/09). A total of 150 human teeth lost due to chronic periodontitis were obtained from the Human Teeth Bank of the institution. These teeth had no evidence of dental caries, restorations below the cementoenamel junction (CEJ), or any other cervical root lesions. All the teeth had calculus adhered to the cervical third of the root surface.

#### *Experimental Design*

After extraction, teeth were stored in water at room temperature for no longer than 3 months. All teeth were randomly divided into 5 groups (n=30, each group) and a region of interest (ROI) which contained subgingival calculus was defined on one



of the root surface aspects of each tooth. The ROI was instrumented by a single operator according to the groups:

**Group I** (curette only): each experimental surface was instrumented by applying sufficient strokes until complete calculus removal and achievement of a hard and smooth surface, clinically tested with an explorer. It was done using a new and sharpened Gracey's curette 7-8 (Hu-Friedy Mfg. Co., Inc.).

**Group II** (curette removing superficial calculus): each experimental surface was instrumented with a new and sharpened Gracey's curette 7-8 (Hu-Friedy Mfg. Co., Inc.), only removing the superficial calculus. The root planning was not performed in this group.

**Group III** (ultrasonic scaler removing superficial calculus): each experimental surface was instrumented with a periodontal tip mounted on an ultrasonic handpiece (Profi II Ceramic - DabiAtlante, Ribeirão Preto, SP, Brazil) working at 24 to 28 kHz in a vertical direction under copious water irrigation. In this group, only the superficial calculus was removed using the ultrasonic tip.

**Group IV** (ultrasonic scaler/curette): each experimental surface was first instrumented with a periodontal tip mounted on an ultrasonic handpiece (Profi II Ceramic - DabiAtlante, Ribeirão Preto, SP, Brazil) working at 24 to 28 kHz in a vertical direction under copious water irrigation. Only the superficial calculus was removed using the ultrasonic tip. After that, each experimental surface was instrumented by applying sufficient strokes until complete calculus removal and achievement of a hard and smooth surface clinically tested with an explorer. It

was done using a new and sharpened Gracey's curette 7-8 (Hu-Friedy Mfg. Co., Inc.).

**Group V** (calculus surface): root surface with dental calculus.

#### *Sample preparation*

The ROI was marked at the most coronal and apical portion using a pencil (Figure 1).

After undergoing one of the proposed treatments, the teeth were sectioned using a flexible double faced diamond disc (# 7020 – Ø 0.22 mm – thickness: 0.15 mm) (KG Sorensen, Barueri, SP, Brazil) at low speed. The roots were crosscut in the first mark, separating them from the crown (Figure 2-A). All roots were immediately cut lengthwise in the bucco-lingual orientation and then in the mesio-distal orientation (Figure 2-B).

A sample was obtained by sectioning the ROI at the middle (Figure 2-C and 2-D)

#### *Root Conditioning*

These five groups were further divided into three subgroups (10 samples each) according to the root conditioning method used. These subgroups are listed below:

**Subgroup a:** no substance was applied to the root surface.

**Subgroup b:** the samples were root conditioned with citric acid 25% by brushing application with a soft brush (Disposable Brush Tips Ø2, 3M ESPE, Seefeld, Germany) for 3 minutes<sup>18</sup>.

**Subgroup c:** the samples were root conditioned with tetracycline hydrochloride 50 mg/mL by burnishing with a small cotton pellet for 3 minutes<sup>19</sup>.

*Roughness parameters evaluation*

The roughness of the root surface was determined in micrometer ( $\mu\text{m}$ ) using a surface profilometer (Surftest SJ 400™, Mitutoyo Sul Americana, Sao Paulo, SP, Brazil) and a sensor (178-396-2) with a 2  $\mu\text{m}$  diameter.

For this purpose, three measurements were done in three different directions, considering the center of the sample area. The mean among these three measurements was considered as a representative value for the sample. The measurement was performed with a 0.25-mm cutoff and 1.25-mm measurement length and used a 2CR filter to separate the components of a surface profile, high frequency corresponded with roughness and low frequency corresponded with radicular waviness.

Surface profile was determined as average roughness (Ra), defined as the mean between peaks and valleys of the surface profile, total roughness (Rt) which means that the distance between maximum peak to valley height, Ry (DIN) is the largest roughness considered all the cutoffs (higher peak and higher valley) and Rz (DIN) is the mean of five peaks and five valley height in each cutoff. Ra and Rz are average roughness parameters and they are not enough to distinguish surfaces that differ in shape or spacing. Therefore, it is necessary to calculate other parameters for a surface that measure peaks and valleys (total roughness) such as Ry and Rt. Data for the root surface roughness values were then plotted separately for Ra, Rt, Ry and Rz.

### *Scanning electron microscopy*

After roughness evaluation, samples were dehydrated in an increasingly graded series of ethanol: 30%, 50%, 70%, 80%, 95% and 100%. Then, the samples were dried overnight in a dehydration jar (Corning, Corning Life Sciences, São Paulo, SP, Brazil), and sputter-coated with a thin 25 nm layer of 99.99% pure gold (Balt-Tec SCD-050, Balt-Tec, Gnathole Farm, Kettlethulme, High Peak, Cheshire - UK).

Two photomicrographs were obtained from the center area of each sample with 1,500x and 3,500x magnifications, using a scanning electron microscope operated at an accelerating voltage of 20 kV (Jeol T330 A, Jeol Ltd., Peabody, MA, USA). The photomicrographs were evaluated according to a root surface morphology index. A previously calibrated ( $\kappa$  score=0.93) and experienced examiner evaluated three times each image, with an interval of 15 days between each evaluation. The score attributed to each sample was the most prevalent score in the three evaluations. The root surface morphology index used for this study consisted of five scores as shown in Figure 3.

### *Statistical Analysis*

The results of the roughness parameters (Ra, Rt, Ry and Rz) were computed as means and standard deviation.

Data were analyzed using GraphPad Prism 5 statistical software (GraphPad, La Jolla, CA, USA). Level of significance was set at  $\alpha = 0.05$  (two-sided). Data were explored for normality using the "D'Agostino & Pearson normality test". Once the

pain scores showed normal distribution and homogeneity of variances, statistically significant differences among groups (roughness parameters) were evaluated by one way ANOVA with Tukey's post hoc test.

## Results

The roughness parameters presented similar values among groups I and IV and among groups II and III. The group V presented higher roughness values than the other groups. (Table 1).

In the **subgroup a**, significant differences ( $p < 0.05$ ) were observed among GI and GII, among GI and GIII (except for the parameter  $R_y$ ), among GII and GIV, among GIII and GIV and between GV and all the other experimental groups (Figure 4).

In the **subgroup b**, significant differences ( $p < 0.05$ ) were observed among GI and GII, among GI and GIII, among GII and GIV, among GIII and GIV, and between GV and all the other experimental groups (Figure 5).

In the **subgroup c**, significant differences ( $p < 0.05$ ) were observed among GI and GII, GII and GIV, among GIII and GIV and between GV and all the other experimental groups. Significant differences were also observed among GI and GIV for the parameter  $R_z$  (Figure 6).

The morphological analysis of the photomicrographs can be seen on Table 2. Score 5 was prevalent for the samples of group Ia, IIIc, IVa and IVc. Score 4 was prevalent in the sample evaluation of groups Ib, Ic and IVb. Score 3 was prevalent in the sample evaluation of groups IIb and IIIb. Score 2 was prevalent in the

sample evaluation of groups IIIa, Vb and Vc. Score 1 was prevalent in the sample evaluation of groups IIa and Va.

### **Discussion**

Effective subgingival plaque control is necessary for optimal wound healing and maintenance of healthy gingival tissues. Removal of subgingival plaque is important since recolonization may occur within months despite good supragingival plaque control, and within weeks after poor plaque control<sup>24</sup>. Recolonization of bacteria establishes the on-going need for mechanical plaque removal by both the patient and the dentist or dental hygienist. In general, the evidence suggests that the disruption and removal of subgingival biofilms can be accomplished with power-driven scalers at a level comparable to manual scalers<sup>25</sup>. The main goal of the periodontal treatment is not only to remove dental biofilm, but to remove dental calculus too<sup>25</sup>. This condition is necessary to reduce the adherence of dental biofilm to the root surface, thus maintaining the periodontal healthy. Attempts to completely remove calculus deposits require extensive instrumentation and can result in significant amounts of cementum and dentin loss. The objective of this study was to access and evaluate the roughness of dentinal root surface after different instrumentation means and to evaluate the effect of conditioning substances in roughness parameters.

In this study, similar results were obtained among groups I and IV and among groups II and III. These similarities in roughness parameters were observed independent the use of citric acid or tetracycline. However, differences with

statistical significance were observed among group I and group II, among group I and group III, among group II and group IV and among group III and IV. These results indicate that a smoother surface can be obtained after scaling and root planning performed alone or after calculus removal with ultrasonic instruments (Figures 4 – 6).

In an attempt to reduce extensive instrumentation, were tested the use of two substances for root conditioning, citric acid and tetracycline. These substances have the property to remove minerals from the root surface<sup>18,19,21</sup>. The objective of testing these substances was to evaluate their effect in residual calculus accessed by means of a profilometer and SEM analysis. As seen in Table 1, the values of *Ra*, *Rt*, *Ry* and *Rz* was higher for the groups II and III than groups I and IV. The control group (group V) had the highest values of roughness parameters than the experimental groups.

Some differences were also observed when considering the substances used for root conditioning. The Table 1 shows that groups which have been hypothetically free of calculus (group I and group IV) presented a slight increase in roughness parameters when citric acid was applied. This slight increase in roughness may due the way the citric acid acts in the root surface. The citric acid acts demineralizing the root surface and creates some depressions and irregularities as can be seen in Figure 3D. This figure represents a common pattern of chemical dissolution of the dentin surface as seen before by Cavassim<sup>18</sup> et al. Tetracycline hydrochloride has a lower pH and acts removing minerals from de dentin matrix. Its action is not as strong as the citric acid, but has to be considered<sup>19,21</sup>.

Roughness parameters presented a slight decrease, except in group I and in group IV (Table 1).

However, when considering the control group (group V), both the substances contribute to decrease roughness.

The results of this study shows lower values for roughness parameters for scaling and root planning and for piezoelectric instruments than other in vivo study<sup>26</sup>, but similar results were obtained in similar in vitro studies<sup>16,27-29</sup>. This can be explained due the access to the root surface and the possibility of maintain a right angulation in the ultrasonic tip and cures in extracted teeth in comparison to the difficulty of doing it in teeth with periodontal pockets.

Despite the decrease of roughness parameters was not so high in groups III and IV, after root conditioning with citric acid and tetracycline, their use after scaling may be considered once they have other biological properties as to favor the adhesion of blood components and the incorporation to the root surface, as well as decontamination properties of both substances<sup>19,23</sup>. Other reason for the use of these substances after scaling and root planning was to demineralize and decontaminate residual calculus and produce a more biological acceptable root surface. The residual roughness in a subgingival region doesn't seem to be significant once periodontal regeneration can occur in these surfaces; however the real significance of surface roughness is still unclear since clinically significant differences in wound healing following hand, sonic or ultrasonic instrumentation were not found yet<sup>25</sup>.



**Conclusion**

According to results obtained and within the limitations of the methodology, it can be inferred, that: root roughness was slight altered after root conditioning resulting in:

1. a slightly increase after scaling and root planning;
2. a rough surface after removing superficial calculus and the use of citric acid
3. a reduction in roughness after removing superficial calculus and the use of tetracycline.

Despite these changes in superficial roughness, no differences where observed when ultrasonic instruments were used before scaling and root planning and neither in removing superficial calculus with curettes and with ultrasonic instruments within the same subgroup.

## References

1. Lovegrove JM. Dental plaque revisited: bacteria associated with periodontal disease. *J N Z Soc Periodontol* 2004; (87):7-21.
2. Busscher HJ, Rinastiti M, Siswomihardjo W, van der Mei HC. Biofilm formation on dental restorative and implant materials. *J Dent Res* 2010; 89(7):657-65.
3. Sbordone L, Bortolaia C. Oral microbial biofilms and plaque-related diseases: microbial communities and their role in the shift from oral health to disease. *Clin Oral Investig* 2003; 7(4):181-8.
4. Axelsson P, Lindhe J, Nystrom B. On the prevention of caries and periodontal disease. Results of a 15-year longitudinal study in adults. *J Clin Periodontol* 1991; 18(3):182-9.
5. Drago MR. A clinical evaluation of hand and ultrasonic instruments on subgingival debridement. 1. With unmodified and modified ultrasonic inserts. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1992; 12(4):310-23.
6. Drisko CL. Scaling and root planing without overinstrumentation: hand versus power-driven scalers. *Curr Opin Periodontol* 1993:78-88.
7. Rabbani GM, Ash MM, Jr., Caffesse RG. The effectiveness of subgingival scaling and root planing in calculus removal. *J Periodontol* 1981; 52(3):119-23.
8. Jones SJ, Lozdan J, Boyde A. Tooth surfaces treated in situ with periodontal instruments. Scanning electron microscopic studies. *Br Dent J* 1972; 132(2):57-64.
9. Moskow BS, Bressman E. Cemental Response to Ultrasonic and Hand Instrumentation. *J Am Dent Assoc* 1964; 68:698-703.
10. Nishimine D, O'Leary TJ. Hand instrumentation versus ultrasonics in the removal of endotoxins from root surfaces. *J Periodontol* 1979; 50(7):345-9.
11. Bye FL, Ghilzan RS, Coffesse RG. Root surface roughness after the use of different modes of instrumentation. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1986; 6(5):36-47.
12. Meyer K, Lie T. Root surface roughness in response to periodontal instrumentation studied by combined use of microroughness measurements and scanning electron microscopy. *J Clin Periodontol* 1977; 4(2):77-91.
13. Van Volkinburg JW, Green E, Armitage GC. The nature of root surfaces after curette, cavitron and alpha-sonic instrumentation. *J Periodontal Res* 1976; 11(6):374-81.
14. Schlageter L, Rateitschak-Pluss EM, Schwarz JP. Root surface smoothness or roughness following open debridement. An in vivo study. *J Clin Periodontol* 1996; 23(5):460-4.
15. Khosravi M, Bahrami ZS, Atabaki MS, Shokrgozar MA, Shokri F. Comparative effectiveness of hand and ultrasonic instrumentations in root surface planing in vitro. *J Clin Periodontol* 2004; 31(3):160-5.
16. Kocher T, Rosin M, Langenbeck N, Bernhardt O. Subgingival polishing with a teflon-coated sonic scaler insert in comparison to conventional instruments as assessed on extracted teeth (II). Subgingival roughness. *J Clin Periodontol* 2001; 28(8):723-9.
17. Wilkinson RF, Maybury JE. Scanning electron microscopy of the root surface following instrumentation. *J Periodontol* 1973; 44(9):559-63.
18. Cavassim R, Leite FR, Zandim DL, Dantas AA, Sampaio JE. Smear layer removal for collagen fiber exposure after citric acid conditionings. *J Contemp Dent Pract* 2010; 11(6):E001-8.
19. Ishi EP, Dantas AA, Batista LH, Onofre MA, Sampaio JE. Smear layer removal and collagen fiber exposure using tetracycline hydrochloride conditioning. *J Contemp Dent Pract* 2008; 9(5):25-33.

20. Polson AM, Frederick GT, Ladenheim S, Hanes PJ. The production of a root surface smear layer by instrumentation and its removal by citric acid. *J Periodontol* 1984; 55(8):443-6.
21. Fontanari LA, Pinto SC, Cavassim R, Spin-Neto R, Ishi Ede P, Sampaio JE. 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.
22. Leite FR, Moreira CS, Theodoro LH, Sampaio JE. Blood cell attachment to root surfaces treated with EDTA gel. *Braz Oral Res* 2005; 19(2):88-92.
23. Leite FR, Sampaio JE, Zandim DL, Dantas AA, Leite ER, Leite AA. Influence of root-surface conditioning with acid and chelating agents on clot stabilization. *Quintessence Int* 2010; 41(4):341-9.
24. Sbordone L, Ramaglia L, Gulletta E, Iacono V. Recolonization of the subgingival microflora after scaling and root planing in human periodontitis. *J Periodontol* 1990; 61(9):579-84.
25. Drisko CL, Cochran DL, Blieden T, Bouwsma OJ, Cohen RE, Damoulis P, et al. Position paper: sonic and ultrasonic scalers in periodontics. Research, Science and Therapy Committee of the American Academy of Periodontology. *J Periodontol* 2000; 71(11):1792-801.
26. Santos FA, Pochapski MT, Leal PC, Gimenes-Sakima PP, Marcantonio E, Jr. Comparative study on the effect of ultrasonic instruments on the root surface in vivo. *Clin Oral Investig* 2008; 12(2):143-50.
27. Folwaczny M, George G, Thiele L, Mehl A, Hickel R. Root surface roughness following Er:YAG laser irradiation at different radiation energies and working tip angulations. *J Clin Periodontol* 2002; 29(7):598-603.
28. Busslinger A, Lampe K, Beuchat M, Lehmann B. A comparative in vitro study of a magnetostrictive and a piezoelectric ultrasonic scaling instrument. *J Clin Periodontol* 2001; 28(7):642-9.
29. Kishida M, Sato S, Ito K. Comparison of the effects of various periodontal rotary instruments on surface characteristics of root surface. *J Oral Sci* 2004; 46(1):1-8.

Table 1. Mean, SD and median of roughness parameters

Group	<i>Ra</i>			<i>Rt</i>			<i>Ry (DIN)</i>			<i>Rz (DIN)</i>		
	Mean	SD	Median	Mean	SD	Median	Mean	SD	Median	Mean	SD	Median
Ia	0,63	0,26	0,57	5,90	2,40	5,80	5,60	2,50	5,50	3,40	1,20	3,30
Ib	1,20	0,49	0,99	8,10	3,00	7,10	7,60	2,70	6,90	4,90	1,30	5,00
Ic	0,78	0,25	0,76	5,90	1,10	5,60	5,40	1,10	5,30	3,50	0,89	3,30
Iria	2,70	0,93	2,70	20,00	6,90	19,00	18,00	6,00	19,00	10,00	2,80	11,00
IIb	2,50	0,83	2,40	19,00	6,50	19,00	17,00	5,80	17,00	11,00	3,40	11,00
IIc	1,90	0,49	1,90	14,00	3,30	15,00	13,00	2,90	14,00	8,40	2,20	8,60
IIIa	2,20	0,86	2,30	16,00	7,60	14,00	15,00	7,00	13,00	9,20	3,10	9,10
IIIb	2,10	0,52	2,00	16,00	6,70	13,00	15,00	5,60	13,00	10,00	3,60	9,50
IIIc	1,80	0,65	1,70	12,00	5,00	11,00	11,00	4,60	11,00	7,20	2,50	7,20
IVa	0,55	0,17	0,54	4,30	0,80	4,20	4,50	2,20	3,90	2,50	0,37	2,50
IVb	0,84	0,18	0,77	6,40	1,10	6,50	5,80	1,00	5,90	3,80	0,58	3,70
IVc	0,55	0,17	0,52	4,10	1,30	3,80	3,70	1,50	3,40	2,50	0,63	2,50
Va	6,80	1,90	7,10	43,00	14,00	39,00	38,00	13,00	33,00	25,00	6,10	26,00
Vb	5,20	1,40	5,00	34,00	5,80	34,00	26,00	6,40	25,00	20,00	3,00	20,00
Vc	6,70	1,60	7,00	41,00	9,50	40,00	36,00	10,00	35,00	25,00	5,20	24,00

Table 2. Scores attributed for the groups according to the Root Surface Morphology Index

Group	Score	n	%
Ia	5	10	100
Ib	4	10	100
Ic	4	10	100
IIa	1	10	100
IIb	3	10	100
IIc	2	3	30
	5	7	70
IIIa	2	9	90
	5	1	10
IIIb	3	7	70
	5	3	30
IIIc	1	2	20
	2	2	20
	5	6	60
IVa	5	10	100
IVb	4	10	100
IVc	5	10	100
Va	1	10	100
Vb	2	10	100
Vc	1	4	40
	2	6	60



Figure 1 - Tooth lost due to periodontal disease, presenting dental calculus adhered to the root surface. “M1” shows the most coronal mark and “M2” shows the most apical mark. “C” corresponds to the ROI that is covered by dental calculus.



Figure 2 - A) Cutting with diamond disc separating the crown from the ROI. B) Cut in buccal-lingual orientation. C) Cutting in mesio-distal orientation. D) Separate sample.

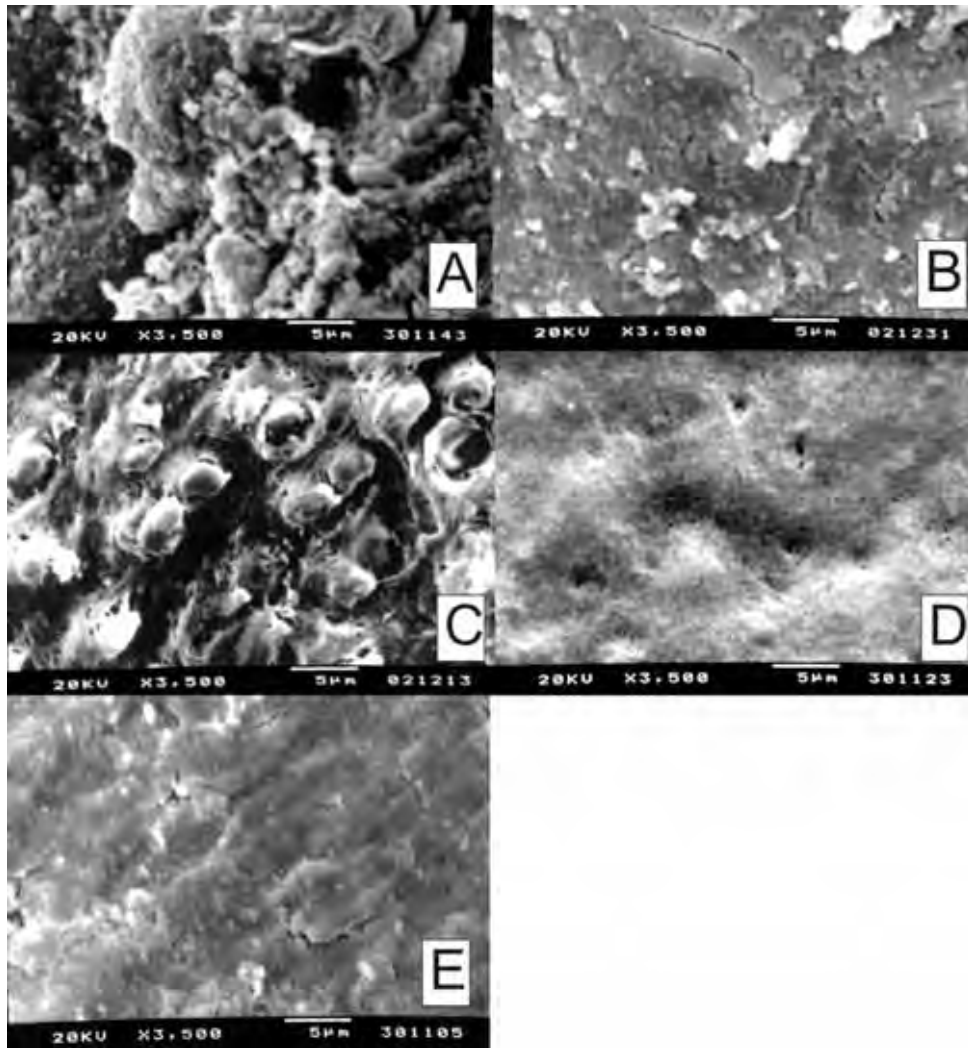


Figure 3. Root Surface Morphology Index. A) Score 1 – root surface presenting dental calculus with a very rough aspect. B) Score 2 – root surface presenting dental calculus with a low rough aspect. C) Score 3 – dental calculus with demineralized aspect. D) Score 4 – Chemical dissolution of the root surface. E) Score 5 – presence of smear layer

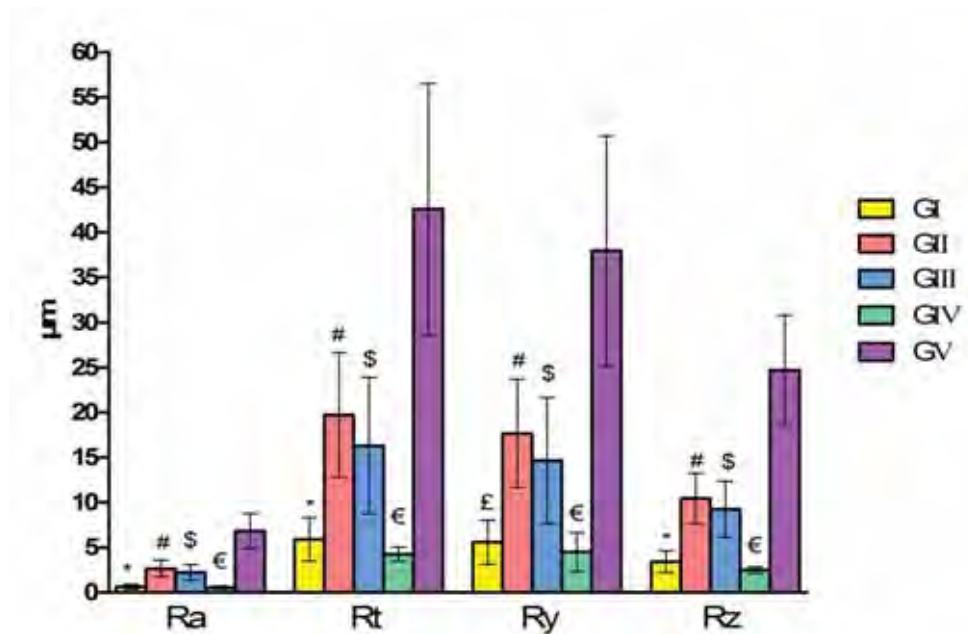


Figure 4. Mean and SD of roughness values for samples that doesn't receive chemical root conditioning.

GI – Group I: curette only; GII – Group II: curette removing superficial calculus; GIII – Group III: ultrasonic scaler removing superficial calculus; GIV – Group IV: ultrasonic scaler/curette; GV – Group V: calculus surface

Ra - average roughness, defined as the mean between peaks and valleys of the surface profile; Rt - total roughness which means that the distance between maximum peak to valley height; Ry - largest roughness considered all the cutoffs (higher peak and higher valley); Rz - mean of five peaks and five valley height in each cutoff

\* significant differences with GII, GIII and GV;

# significant differences with GIV and GV;

\$ significant differences with GIV and GV;

€ significant differences with GV.

One-way ANOVA and Tukey's post-hoc test.

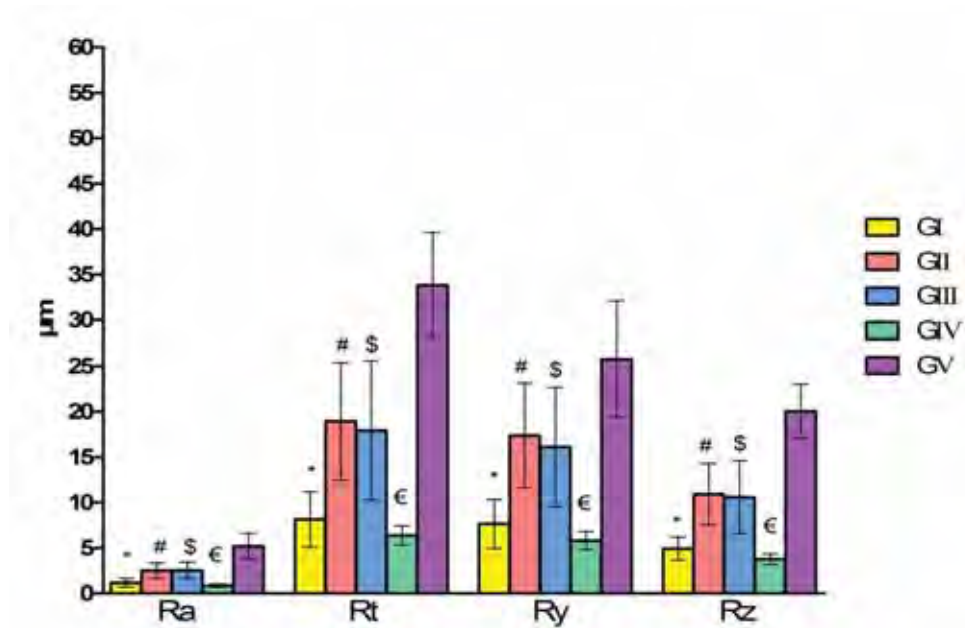


Figure 5. Mean and SD of roughness values for samples chemically root conditioned with citric acid.

GI – Group I: curette only; GII – Group II: curette removing superficial calculus; GIII – Group III: ultrasonic scaler removing superficial calculus; GIV – Group IV: ultrasonic scaler/curette; GV – Group V: calculus surface

Ra - average roughness, defined as the mean between peaks and valleys of the surface profile; Rt - total roughness which means that the distance between maximum peak to valley height; Ry - largest roughness considered all the cutoffs (higher peak and higher valley); Rz - mean of five peaks and five valley height in each cutoff

\* significant differences with GII, GIII and GV;

# significant differences with GIV and GV;

\$ significant differences with GIV and GV;

€ significant differences with GV.

One-way ANOVA and Tukey's post-hoc test.



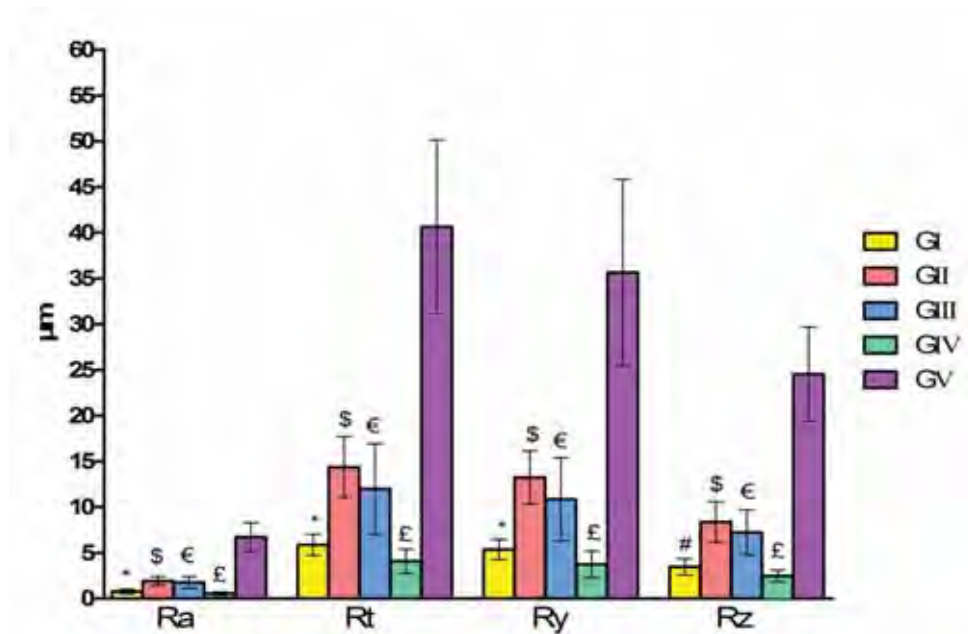


Figure 6. Mean and SD of roughness values for samples chemically root conditioned with tetracycline hydrochloride.

GI – Group I: curette only; GII – Group II: curette removing superficial calculus; GIII – Group III: ultrasonic scaler removing superficial calculus; GIV – Group IV: ultrasonic scaler/curette; GV – Group V: calculus surface

Ra - average roughness, defined as the mean between peaks and valleys of the surface profile; Rt - total roughness which means that the distance between maximum peak to valley height; Ry - largest roughness considered all the cutoffs (higher peak and higher valley); Rz - mean of five peaks and five valley height in each cutoff

\* significant differences with GII and GV;

# significant differences with GII, GIII and GV;

\$ significant differences with GIV and GV;

€ significant differences with GIV and GV;

£ significant differences with GV.

One-way ANOVA and Tukey's post-hoc test.

## ***MATERIAL E MÉTODO***

### ***Estudo I***

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho” (Protocolo CEP-FO/CAr nº 31/06) (Anexo 1).

#### **Obtenção dos dentes**

Para a realização desta pesquisa foram utilizados dentes humanos uni ou multi-radulares obtidos do Banco de Dentes da FOAr/UNESP.

Os dentes utilizados foram mantidos em solução fisiológica até o momento do preparo dos espécimes e foram excluídos dentes que não satisfizessem os critérios: junção cimento-esmalte intacta, ausência de lesões cariosas radiculares, lesões de abrasão, abfração e erosão e também de restaurações.

#### **Preparo dos espécimes**

Os dentes foram preparados, por um único pesquisador treinado, de acordo com o protocolo descrito na sequência.

Para confecção dos espécimes, foram escolhidas e preparadas as faces que apresentassem melhores condições para obtenção dos espécimes necessários para a realização da pesquisa.

Assim, foi optado pelas faces proximais ou faces livres, preparando-se ambas as faces proximais ou livres para melhor aproveitamento do dente (FIGURA 1A). Foram realizados dois sulcos, sendo um na junção cimento-esmalte e outro aproximadamente 4 mm apicalmente ao primeiro com o auxílio de uma fresa cilíndrica diamantada nº 3099 ( $\varnothing$  1.6mm) (KG Sorensen, Barueri - SP) em alta rotação e sob refrigeração constante (FIGURA 1B). A profundidade dos sulcos correspondeu a aproximadamente metade do diâmetro da fresa e foram feitos com objetivo de delimitar a região de trabalho e padronizar a profundidade de penetração da fresa.

Após a confecção, os sulcos foram unidos removendo-se assim totalmente o cimento da região entre os sulcos e obtendo-se a região de trabalho (FIGURA 1C).

A área de dentina exposta pela fresa recebeu, com o auxílio de uma cureta de Gracey 5-6 nova (Hu-Friedy- EUA), a aplicação de 50 movimentos de raspagem e alisamento radicular, no sentido ápico-cervical, formando assim a “smear layer” na superfície de trabalho (FIGURA 1D). A raspagem e alisamento foram realizados por um único pesquisador, garantindo que todos os dentes recebessem tratamento semelhante. Sempre que necessária, foi realizada a afiação da cureta com uma pedra de Arkansas (Hu-Friedy- EUA).

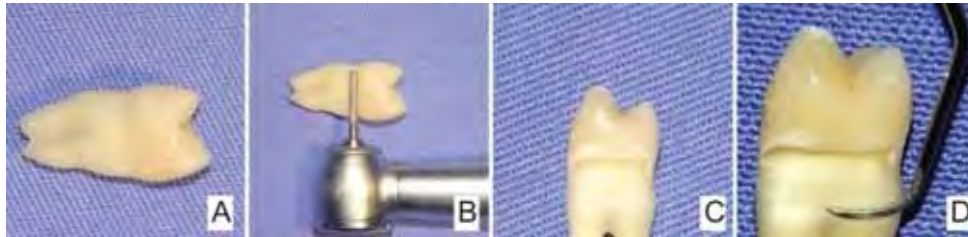


FIGURA 1. A) Seleção dos dentes. B) Demarcação dos sulcos. C) Área de trabalho. D) Raspagem e alisamento radicular.

Após raspagem e alisamento da área de trabalho, os dentes foram seccionados com o auxílio de um disco diamantado de dupla face (KG Sorensen, Barueri – SP) montado em peça reta em baixa rotação. Primeiramente, a coroa foi separada com um corte no sentido transversal ao longo eixo do dente no primeiro sulco (FIGURAS 2 A e B). Um corte longitudinal ao longo eixo do dente e paralelo às áreas de trabalho foi realizado com intuito de separá-las (FIGURA 2C). Finalmente, um corte transversal no segundo sulco separou os espécimes (FIGURA 2D).

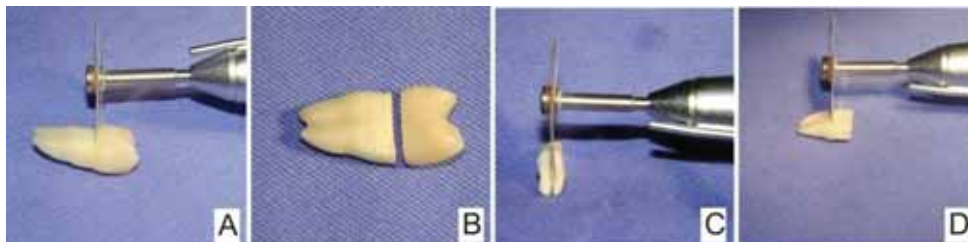


Figura 2. A) Corte transversal ao longo eixo do dente, na altura do primeiro sulco. B) Coroa seccionada. C) Corte longitudinal ao longo eixo do dente, separando as faces preparadas. D) Corte longitudinal ao longo eixo do dente, na altura do segundo sulco.

Da forma descrita acima, foram obtidos 270 espécimes de aproximadamente 1 mm de espessura e medindo cerca de 2 mm de largura por 3 mm de comprimento (FIGURA 3).



FIGURA 3. Espécimes preparados.

Todos os espécimes foram armazenados em frascos plásticos contendo pequena quantidade de solução fisiológica com intuito de que se mantivessem úmidos e inalterados até o momento do tratamento.

### Tratamento dos espécimes

Os espécimes obtidos foram distribuídos aleatoriamente nos seguintes grupos, com seus respectivos valores de pH, avaliados por meio de pHmetro (UB 10 - Denver Instruments – Norfolk, EUA):

Tabela 1 – Substâncias testadas e respectivos valores de pH.

Grupo	Substância	pH
I	Solução fisiológica	7.40
II	Ácido cítrico 0.5%	2.40
II	Ácido cítrico 1%	2.04
III	Ácido cítrico 2%	1.90
IV	Ácido cítrico 15%	1.40
V	Ácido cítrico 25%	1.31

Todas as soluções de ácido cítrico foram manipuladas na Farmácia Santa Paula (Araraquara - SP, Brasil) no dia da aplicação garantindo assim as características físico-químicas das substâncias.

Para cada concentração de ácido cítrico testada, a aplicação desta substância deu-se de três formas: **passiva**: os espécimes foram presos com uma pinça clínica nº 317 (S.S. White Duflex, Rio de Janeiro – RJ) permitindo a aplicação com bolinhas de algodão embebidas nas substâncias a serem testadas e depositadas sobre o espécime com o auxílio de outra pinça nº 317 (FIGURA 4A); **fricção vigorosa**: os espécimes foram presos da mesma maneira que para a forma de aplicação anterior, sendo as substâncias testadas aplicadas por meio de fricção de bolinhas de algodão na superfície dos espécimes, com auxílio de outra pinça clínica nº 317. (FIGURA 4B); **fricção suave**: a apreensão dos espécimes, como descrito anteriormente, permitiu a aplicação das substâncias testadas com auxílio de um pincel macio (3M ESPE), o qual era embebido nas soluções e passado sobre o espécime com movimentos de vaivém (FIGURA 4C). Para todas as formas de aplicação, as soluções testadas foram renovadas a cada 30 segundos pela troca das bolinhas de algodão ou pela imersão do pincel na fricção suave.



Os tempos de aplicação foram marcados com a utilização de um cronômetro. Para a lavagem dos espécimes foram utilizados 10 mL de água destilada com intuito de que houvesse uma melhor padronização na pesquisa do que uma marcação de tempo para tal procedimento.

Os espécimes de cada subgrupo foram colocados em cassetes codificados, que por sua vez, foram colocados em uma placa de Petri para passar por desidratação sequencial em concentrações crescentes de álcool etílico (30%, 50%, 70%, 80%, 95% e 100%) (FIGURA 5A), por 1 hora cada, a fim de se obter a desidratação dos espécimes.



FIGURA 5. A) Desidratação em concentrações crescentes de álcool. B) e C) Placas de acrílico codificadas para aplicação do HMDS.

Após a última concentração de álcool, os mesmos foram transferidos para uma placa de acrílico com 6 orifícios, utilizada em cultura de células. Os grupos foram codificados para a aplicação do hexametildisilazane (HMDS) (Sigma, Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA), utilizado com finalidade de manutenção da integridade das fibras colágenas. Os 5 espécimes de cada grupo foram colocados em um orifício contendo uma parte (800  $\mu$ L) de álcool etílico absoluto misturada a uma parte (800  $\mu$ L) de HMDS. Os espécimes ficaram imersos por 30 minutos e foram transferidos para outro



orifício contendo apenas HMDS (1600  $\mu$ L), no qual permaneceram por 10 minutos (FIGURAS 5B e 5C). A quantidade de HMDS e álcool foram determinados de tal forma que cobrissem totalmente os espécimes, mas sempre respeitando a proporção de 1:1 nos primeiros orifícios e apenas HMDS nos segundos orifícios.

Todos os procedimentos que envolveram a utilização de HMDS foram realizados dentro de uma capela, com ventilação acionada e com utilização de micropipeta automática (100-1000  $\mu$ L) (Boeco, Hamburg, Germany).

Os espécimes retornaram para os cassetes de origem, os quais foram armazenados em placas de Petri contendo papel de filtro para terminar a desidratação (FIGURA 6A).

#### **Observação dos espécimes em microscopia eletrônica de varredura**

Passadas 24 horas, os espécimes foram colados em bases metálicas (“stubs”) utilizando-se esmalte incolor acrescido de grafite em pó (FIGURA 6B). Os “stubs” foram levados a um dessecador a vácuo por 24 horas para completa remoção da umidade e preservação até a metalização. (FIGURA 6C). Na sequência, os espécimes foram metalizados (Balt-Tec SCD-050, Flórida, USA) por recobrimento com liga de ouro-paládio (pureza de 99,99%) por um período de 120 segundos. Cada espécime foi recoberto por uma película de 25 nm (FIGURA 6D).



FIGURA 6. A) Secagem em papel de filtro. B) Espécime tratado, colado em “stub” metálico. C) Dessecador a vácuo. D) Espécime metalizado.

Após a metalização, os espécimes foram levados para observação em microscópio eletrônico de varredura (Jeol-JSM T330-A, JEOL Technics Co., Tokyo, Japan) com a obtenção de fotomicrografias em filme Neopan Acros (Fuji Film 120 SS, Tokyo, Japan) com aumentos de 1500x e de 3500x. As fotomicrografias foram realizadas na região central de cada espécime, objetivando reduzir a possibilidade de tendenciosidade do estudo.

### **Análise das fotomicrografias**

As fotomicrografias obtidas foram avaliadas por um único examinador cego treinado e calibrado<sup>24</sup> ( $Kappa = 0.93$ ) que atribuiu os graus de remoção de “smear layer” e exposição de fibras colágenas segundo o “Índice de Remoção de *Smear Layer*” proposto por Sampaio<sup>86</sup> (1999) e modificado pelo autor para este estudo:

### Índice de Remoção de “Smear Layer”

**Grau 1:** Superfície radicular sem “smear layer”, com abertura total dos túbulos dentinários, sem indícios de “smear layer” na abertura dos túbulos e com exposição de fibras colágenas da dentina.

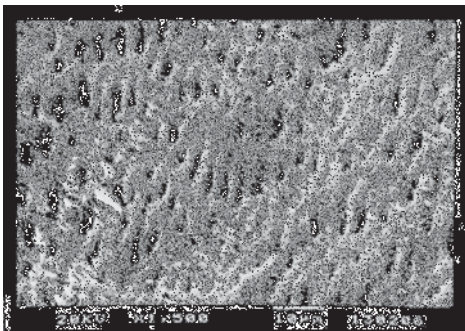


FIGURA 7 - Fotomicrografia com aumento de 1500x representando o grau 1.

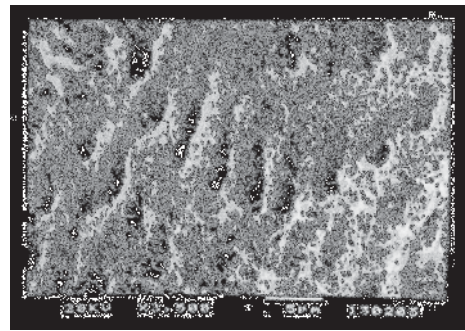


FIGURA 8 - Fotomicrografia com aumento de 3500x representando o grau 1.

**Grau 2:** Superfície radicular sem “smear layer”, com abertura total dos túbulos dentinários, sem indícios de “smear layer” na abertura dos túbulos.

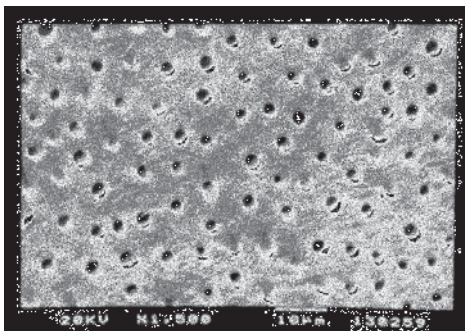


FIGURA 9 - Fotomicrografia com aumento de 1500x representando o grau 2.

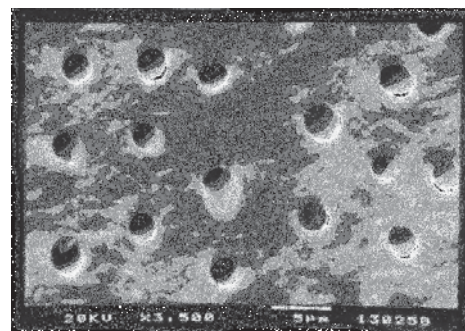


FIGURA 10 - Fotomicrografia com aumento de 3500x representando o grau 2.

**Grau 3:** Superfície radicular sem “smear layer”, com abertura total dos túbulos dentinários, com indícios de “smear layer” na abertura dos túbulos.

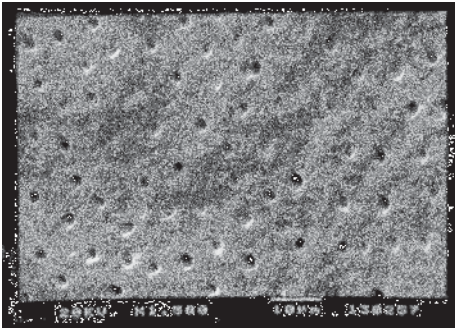


FIGURA 11 - Fotomicrografia com aumento de 1500x representando o grau 3

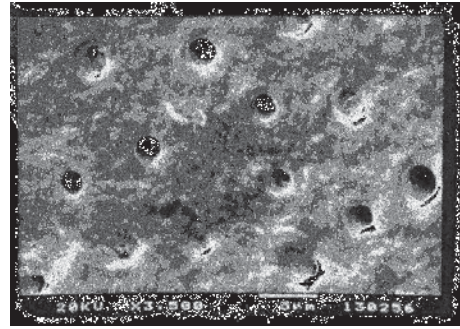


FIGURA 12 - Fotomicrografia com aumento de 3500x representando o grau 3.

**Grau 4:** Superfície radicular sem “smear layer”, com abertura parcial dos túbulos dentinários.

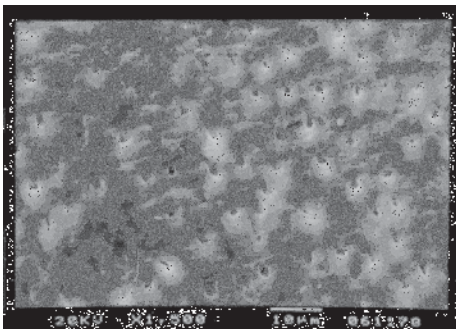


FIGURA 13 - Fotomicrografia com aumento de 1500x representando o grau 4.

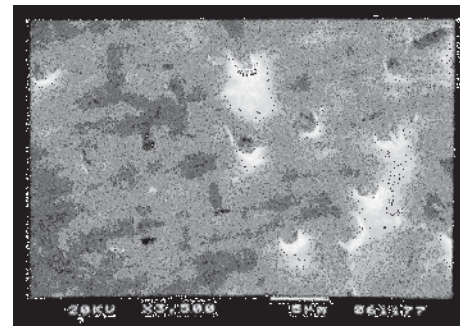


FIGURA 14 - Fotomicrografia com aumento de 3500x representando o grau 4.

**Grau 5:** Superfície radicular coberta por "smear layer" com aspecto uniforme, formada por dissolução química apresentando abertura ou não de túbulos dentinários.

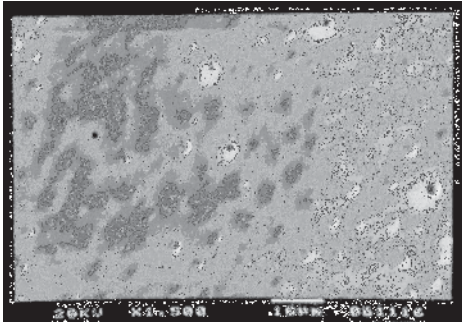


FIGURA 15 - Fotomicrografia com aumento de 1500x representando o grau 5.

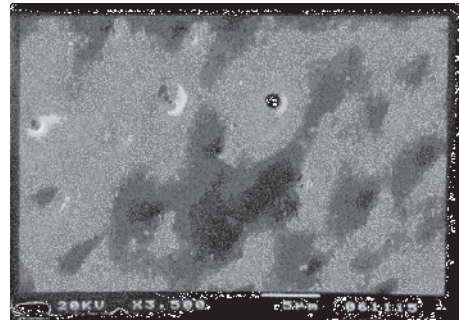


FIGURA 16 - Fotomicrografia com aumento de 3500x representando o grau 5.

**Grau 6:** Superfície radicular coberta por "smear layer", com aspecto uniforme, apresentando indícios de abertura dos túbulos dentinários.

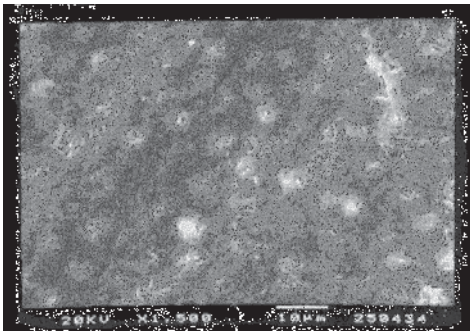


FIGURA 17 - Fotomicrografia com aumento de 1500x representando o grau 6.

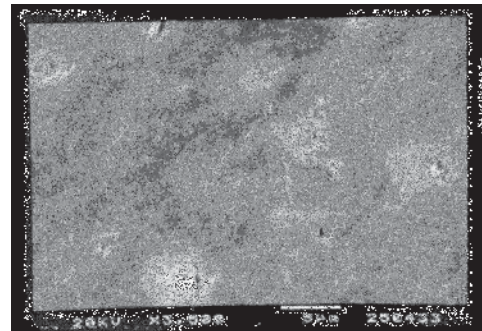


FIGURA 18 - Fotomicrografia com aumento de 3500x representando o grau 6.

**Grau 7:** Superfície radicular coberta por “smear layer”, com aspecto uniforme, sem indícios de abertura dos túbulos dentinários.

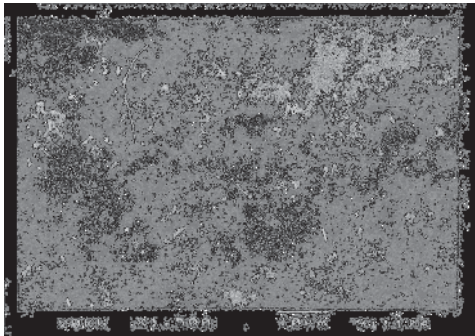


FIGURA 19 - Fotomicrografia com aumento de 1500x representando o grau 7.

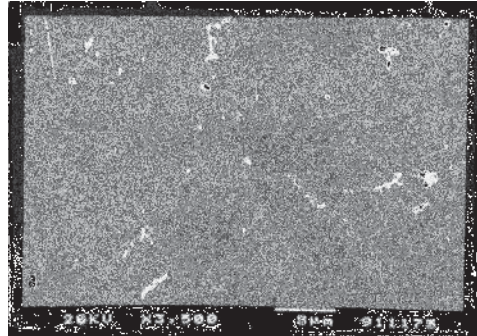


FIGURA 20 - Fotomicrografia com aumento de 3500x representando o grau 7.

**Grau 8:** Superfície radicular coberta por “smear layer”, com aspecto irregular e presença de estrias e/ou depósitos esparsos.

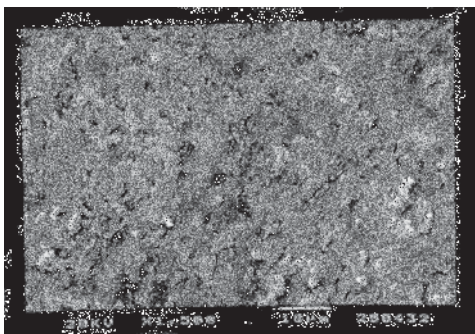


FIGURA 21 - Fotomicrografia com aumento de 1500x representando o grau 8.

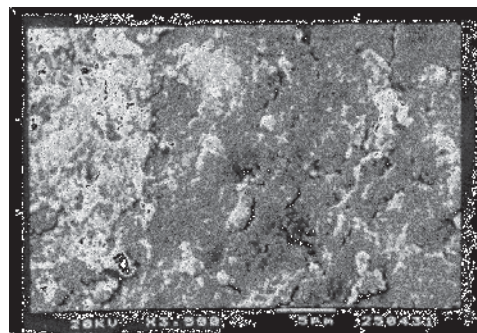


FIGURA 22 - Fotomicrografia com aumento de 3500x representando o grau 8.

A leitura das fotomicrografias deu-se em 3 diferentes tempos com intervalo de 7 dias entre cada leitura.

Os dados obtidos foram devidamente tabulados para realização da análise estatística.

### **Análise Estatística**

A análise estatística foi realizada o software GraphPad Prism 5.00 (San Diego, CA, EUA). A análise de variância não-paramétrica (Kruskal-Wallis) foi utilizada para avaliar as variáveis de concentração, tempo e modo de aplicação, utilizando-se um nível de significância = 5%. Caso o valor de  $p \leq 0.05$ , o pós-teste de Dunn foi utilizada para detectar a diferença entre os grupos.

### *Seleção dos dentes e preparo dos espécimes para os Estudos II e III*

Estes estudos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho” (Protocolo CEP-FO/CAR nº 15/09) (Anexo 2).

Levando-se em consideração que o preparo dos espécimes foi o mesmo para ambos os estudos, será feita uma descrição única do modo como os espécimes foram preparados e na sequência, descritas as particularidades de cada estudo.

Para estes estudos foram obtidos 150 dentes oriundos do Banco de Dentes Humanos da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP. Os dentes foram perdidos por doença periodontal avançada e possuíam cálculo radicular (FIGURA 23). Não foram selecionados, dentes que possuísem cáries ou restaurações radiculares.





FIGURA 23. Dente com cálculo radicular selecionado para o estudo. M1 – delimitação da porção mais coronário do cálculo. M2 – delimitação da porção mais apical do cálculo  
C – Cálculo dental

Os espécimes obtidos foram divididos em 5 grupos (n = 60), que por sua vez foram subdivididos em 3 subgrupos (n = 20).

Em cada subgrupo, 10 espécimes foram avaliados quanto à adesão do coágulo e 10 espécimes foram avaliados quanto à rugosidade e morfologia da superfície. Os grupos estão representados na FIGURA 24 e descritos logo abaixo:

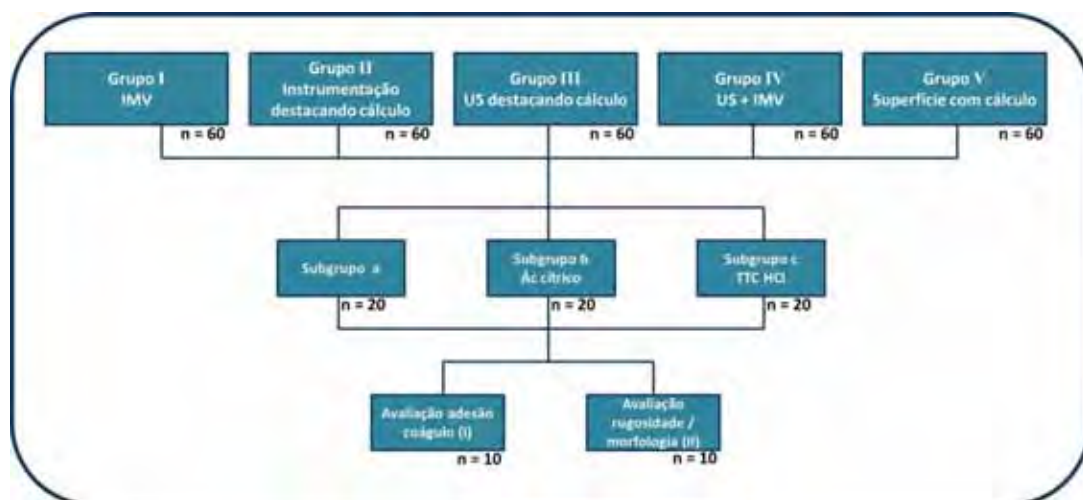


FIGURA 24. Fluxograma, mostrando os grupos e seus subgrupos utilizados nos estudos II e III.

#### Descrição dos grupos:

- Ia - Raspagem e alisamento radicular com instrumentos manuais até obtenção de uma superfície dura e lisa (instrumentação manual vigorosa)
- Ib - Raspagem e alisamento radicular com instrumentos manuais até obtenção de uma superfície dura e lisa (instrumentação manual vigorosa) + condicionamento com ácido cítrico
- Ic - Raspagem e alisamento radicular com instrumentos manuais até obtenção de uma superfície dura e lisa (instrumentação manual vigorosa) + condicionamento com tetraciclina
- **IIa - Raspagem e alisamento radicular com instrumentos manuais somente destacando-se o cálculo visível**
- **IIb - Raspagem e alisamento radicular com instrumentos manuais somente destacando-se o cálculo visível + condicionamento com ácido cítrico**
- **IIc - Raspagem e alisamento radicular com instrumentos manuais somente destacando-se o cálculo visível + condicionamento com tetraciclina**
- IIIa - Raspagem com ultrassom somente destacando cálculo visível
- IIIb - Raspagem com ultrassom somente destacando cálculo visível + condicionamento com ácido cítrico
- IIIc - Raspagem com ultrassom somente destacando cálculo visível + condicionamento com tetraciclina
- **IVa - Raspagem com ultrassom + instrumentação manual vigorosa**
- **IVb - Raspagem com ultrassom + instrumentação manual vigorosa + condicionamento com ácido cítrico**
- **IVc - Raspagem com ultrassom + instrumentação manual vigorosa + condicionamento com tetraciclina**
- Va - Superfície com cálculo (controle)
- Vb - Superfície com cálculo (controle) + condicionamento com ácido cítrico
- Vc - Superfície com cálculo (controle) + condicionamento com tetraciclina

IMV = Instrumentação manual vigorosa – raspagem e alisamento radicular até obtenção de uma superfície dura e lisa com aspecto de vidro polido

US = Instrumentação com ultrassom

TTC HCl = Tetraciclina hidrocloreada

Os espécimes obtidos foram divididos de acordo com o subgrupo em que se encontravam. Nos estudos II e III, cada dente foi submetido a um tipo de instrumentação e um protocolo de condicionamento químico radicular. Estes foram seccionados originando dois espécimes, que foram divididos em dois subgrupos.

No estudo II foram utilizados os espécimes do subgrupo I. Neste estudo, os espécimes obtidos foram avaliados quanto à influência da biomodificação radicular e descontaminação com tetraciclina hidrocloreata (TTC-HCL) e ácido cítrico e de diferentes meios de instrumentação na adesão de coágulo sanguíneo sobre a superfície radicular. No estudo III foram utilizados os espécimes do subgrupo II. Neste estudo foi avaliada a influência dos diferentes meios de instrumentação e da biomodificação e descontaminação na rugosidade e morfologia radiculares.

O número de espécimes por grupo foi definido levando-se em consideração estudos anteriores que utilizaram metodologia semelhante para avaliação de adesão de coágulo e avaliação de rugosidade da superfície dentinária<sup>59,87</sup>.

Inicialmente os dentes foram submetidos a um dos meios de instrumentação descritos acima. Apenas as regiões da superfície radicular que possuíam cálculo foram selecionadas para avaliação. Para orientação no momento da deposição de tecido sanguíneo e também na avaliação da rugosidade, a região com cálculo foi demarcada com o

auxílio de uma lapiseira e grafite 0.5mm. Isso permitiu que todas as avaliações fossem realizadas na mesma área (FIGURA 23).

Em seguida, os dentes foram submetidos a um dos protocolos de instrumentação descritos na FIGURA 24.

#### **Obtenção dos espécimes**

Após a instrumentação os dentes foram seccionados com o auxílio de um disco diamantado de dupla face (KG Sorensen, Barueri – SP) montado em peça reta em baixa rotação. Primeiramente, a coroa foi separada com um corte no sentido transversal ao longo eixo do dente (FIGURA 25).

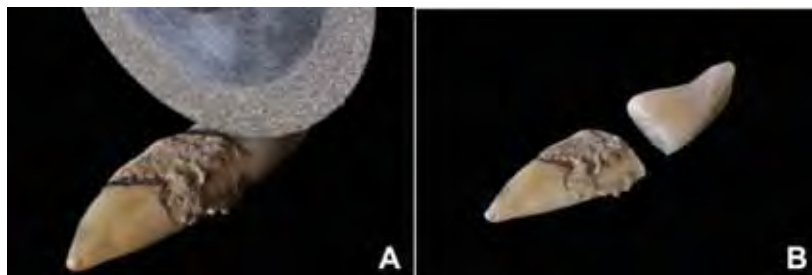


FIGURA 25. A) Corte com disco diamantado para remoção da coroa. B) Coroa removida.

Um corte longitudinal ao longo eixo do dente e paralelo à face de trabalho foi realizado, separando a face do dente que é avaliada (FIGURA 26).

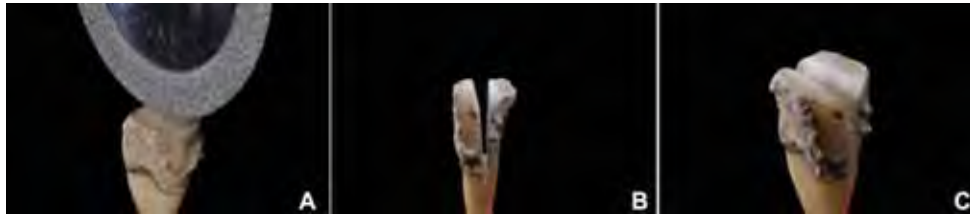


FIGURA 26. A) Corte separando a face de trabalho do restante do dente. B) Vista lateral após separação das faces. C) Visualização aproximada após o corte.

Um corte transversal, perpendicular ao longo eixo do dente, separando o primeiro dos espécimes (FIGURA 27).



FIGURA 27. A) e B) Corte transversal, separando o primeiro espécime. C) Primeiro espécime separado.

Cada dente originou 2 espécimes (FIGURA 28), dos quais um foi avaliado quanto a adesão de coágulo (Estudo II) por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) (Jeol-JSM T330-A, JEOL Technics Co., Tóquio, Japão) (subgrupo I – Figura 2) e outro submetido a avaliação de rugosidade (Estudo III) por meio de rugosímetro (Mitutoyo SJ 400 – Japão) (subgrupo II – Figura 2), e na sequência avaliado quanto a remoção de *smear layer* e morfologia superficial por meio de MEV.



FIGURA 28. A) Corte separando o segundo espécime. B) Os dois espécimes originados do mesmo dente, de área adjacente.

Assim, cada um dos espécimes recebeu um dos tratamentos propostos, conforme a descrição dos grupos.

## ***Estudo II***

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência da biomodificação e descontaminação radicular associada a diferentes meios de instrumentação na adesão de coágulo e elementos sanguíneos.

Neste estudo foram utilizados os espécimes do subgrupo I (FIGURA 24), os quais foram submetidos à avaliação de adesão do coágulo (por meio de microscopia eletrônica de varredura - MEV)

### **Biomodificação radicular**

Após a obtenção dos espécimes, os mesmos foram submetidos ao condicionamento químico. De acordo com a FIGURA 24, os espécimes dos subgrupos *b* e *c* foram submetidos ao condicionamento químico da superfície radicular com ácido cítrico e cloridrato de tetraciclina, respectivamente.

O ácido cítrico foi aplicado na concentração de 25%, com pincel, por 3 minutos<sup>27</sup> (FIGURA 29) e a tetraciclina aplicada na concentração de 50mg/ml<sup>47</sup>, por fricção de bolinha de algodão, por 3 minutos (FIGURA 30).



FIGURA 29. Aplicação do ácido cítrico a 25%, com pincel suave pelo tempo de 3 minutos.



FIGURA 30. Aplicação do cloridrato de tetraciclina na concentração de 50 mg/mL por fricção de bolinha de algodão pelo tempo de 3 minutos.

#### **Aplicação do sangue**

Os espécimes avaliados quanto à adesão de coágulo e células sanguíneas receberam uma gota de tecido sanguíneo depositada sobre sua superfície (FIGURA 31).

A retirada do sangue e realização dos exames de coagulação ocorreu no Laboratório de Hematologia do Núcleo de Atendimento à Comunidade, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - UNESP. O tecido sanguíneo foi coletado da circulação periférica de um paciente jovem, do sexo masculino, sem doenças



sistêmicas detectáveis em hemograma completo e exames de coagulação (tempo de pró-trombina – TP – e tempo de tromboplastina ativada – TTPA). Foram coletados 5 mL de tecido sanguíneo, por meio de uma seringa e agulha hipodérmica (Becton Dickinson, Nova Jérsei, EUA), de um dos pesquisadores, que leu e assinou o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 3).

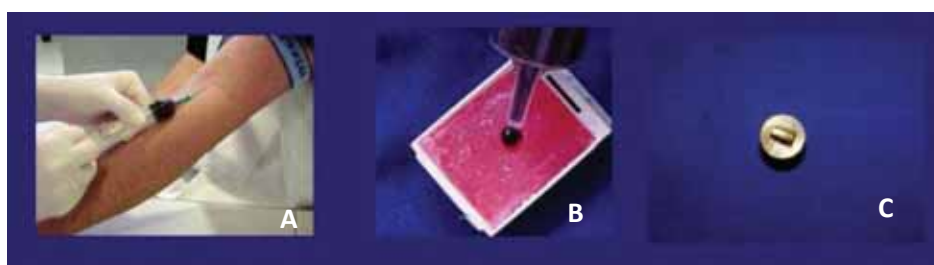


Figura 31. Coleta do sangue. B) Aplicação de uma gota de sangue sobre o espécime. C) Espécime metalizado.

A aplicação do sangue e o processamento laboratorial dos espécimes seguiram um protocolo inicialmente proposto por Baker et al.<sup>11</sup> (2000) e reproduzido em outros estudos<sup>59-60</sup>.

O sangue foi depositado com auxílio de seringa hipodérmica: 1 gota por espécime, mantendo-os imóveis por 20 minutos em câmara plástica umidificadora e sob temperatura ambiente.

Em seguida os espécimes foram lavados 3 vezes durante 5 minutos, com solução de tampão fosfatado pH 7,0 (PBS), em recipiente de vidro, sob leve agitação. (Mini-Rocker Shaker, Boeco, Hamburgo, Alemanha). A seguir, os espécimes foram armazenados em cassetes plásticos e fixados em solução de formaldeído 1% em solução de tampão fosfatado durante 15 minutos. Após 3 lavagens de 5 minutos com solução

de tampão fosfatado sob leve agitação, foram incubados por 10 minutos em 0,02 M de glicina em solução de tampão fosfatado e lavados novamente por 3 vezes durante 5 minutos. A seguir, foram fixados em glutaraldeído a 2,5% em solução de tampão fosfatado durante 30 minutos e lavados novamente como descrito anteriormente. Na sequência, os espécimes foram desidratados em série crescente de álcool etílico: 25%, 50%, 75%, 95% durante 10 minutos em cada solução, passando por 3 lavagens finais de 10 minutos cada, em etanol a 100%. Na sequência, os espécimes foram colados em *stubs* metálicos; metalizados e seguiram para avaliação em microscopia eletrônica de varredura.

#### **Avaliação em microscopia eletrônica de varredura**

Os espécimes foram colados em *stubs* metálicos e mantidos em dessecador a vácuo (40/35 Sleeve Top Dessicator, Corning, Nova Iorque, EUA) por 24 horas e, em seguida metalizados por recobrimento com liga ouro-paládio (Balt-Tec SCD-050, Flórida, EUA), durante 120 segundos. Os espécimes foram então levados para análise em microscópio eletrônico de varredura (Jeol-JSM T330-A, JEOL Technics Co., Tóquio, Japão), operado a 20kV e obtidas fotomicrografias do centro da região do espécime onde se encontrava o cálculo aderido, com auxílio de filme Neopan Acros (Fuji Film 120 SS, Tokyo, Japão). Nos espécimes onde foi aplicado o sangue as fotomicrografias foram obtidas nos aumentos de 500X e 2000X na região previamente demarcada de cada espécime.

Para a análise das fotomicrografias dos espécimes que recebem o tecido sanguíneo, foi utilizado um Índice de Adesão de Elementos Sanguíneos (IAES) descrito por Theodoro<sup>99</sup> (2003) e utilizado por Leite<sup>59</sup> (2005) e Leite et al<sup>60</sup> (2010):

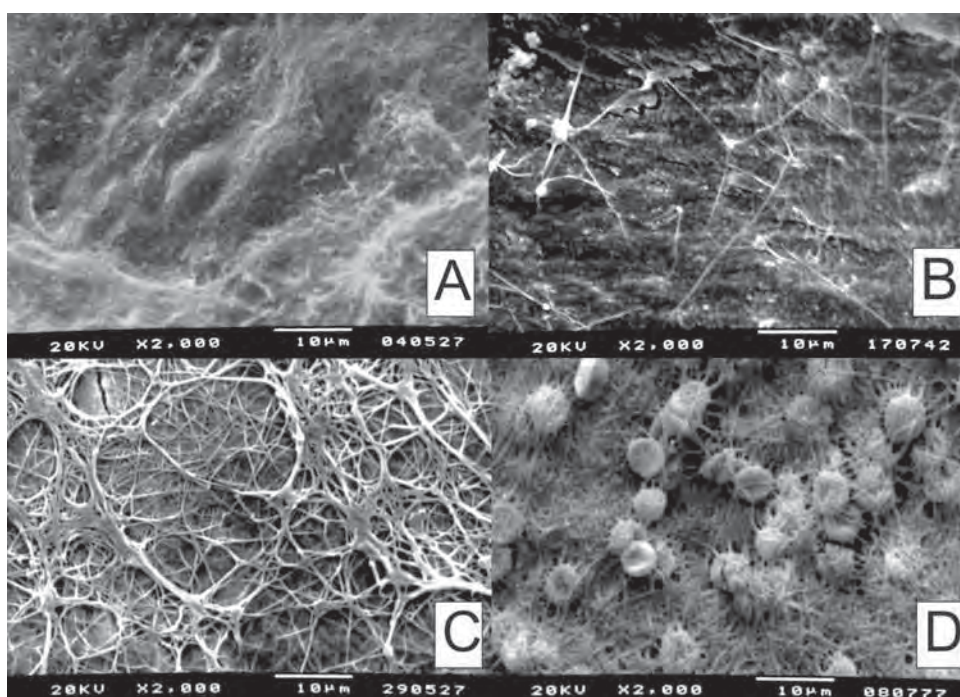


FIGURA 32. **Índice de adesão de elementos sanguíneos.** A) Escore 1 – ausência de fibrina e de células sanguíneas. B) Escore 2 – escassa rede de fibrina e/ou de células sanguíneas. C) Escore 3 – moderada quantidade de células sanguíneas e rede de fibrina mais fina com pequeno entrelaçamento. D) Escore 4 – densa rede de fibrina com grande entrelaçamento e células sanguíneas aprisionadas.

Para cada fotomicrografia, o examinador realizou 3 leituras com intervalo mínimo 7 dias entre elas, e após a tabulação dos dados, foi selecionado o índice de maior frequência entre as 3 análises, como sendo o índice proposto para a fotomicrografia. Caso uma fotomicrografia apresentasse 3 escores diferentes, foram realizadas 3 novas leituras em intervalo de 7 dias. A análise de concordância intra-

examinador foi realizada por meio de teste Kappa com 5% de nível de significância.

#### **Análise estatística**

Os dados obtidos foram analisados utilizando o software GraphPad Prism 5 (GraphPad, La Jolla, CA, USA), com nível de significância definido em 5%. Os dados não apresentaram distribuição normal, assim, foi utilizada estatística não paramétrica. As diferenças entre os grupos foram avaliadas utilizando-se o teste de Kruskal-Wallis e o pós-teste de Dunn

### ***Estudo III***

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência dos diferentes meios de instrumentação e da biomodificação radicular na rugosidade e morfologia radiculares.

Os espécimes utilizados neste estudo foram obtidos como mostrado nas FIGURAS 25 a 28, sendo correspondentes aos espécimes obtidos e alocados no subgrupo II (FIGURA 24).

### ***Biomodificação radicular***

Após a obtenção dos espécimes, os mesmos foram submetidos ao condicionamento químico. De acordo com a FIGURA 24, os espécimes dos subgrupos *b* e *c* foram submetidos ao condicionamento químico da superfície radicular com ácido cítrico e cloridrato de tetraciclina, respectivamente.

O ácido cítrico foi aplicado na concentração de 25%, com pincel, por 3 minutos<sup>27</sup> (FIGURA 33) e a tetraciclina aplicada na concentração de 50 mg/ml<sup>47</sup>, por fricção de bolinha de algodão, por 3 minutos (FIGURA 34).



FIGURA 33. Aplicação do ácido cítrico a 25%, com pincel suave pelo tempo de 3 minutos.



FIGURA 34. Aplicação do cloridrato de tetraciclina na concentração de 50 mg/mL por fricção de bolinha de algodão pelo tempo de 3 minutos.

#### **Preparo dos espécimes para avaliação da morfologia radicular**

Os espécimes foram preparados, após o condicionamento químico, para avaliação da morfologia radicular. Este preparo foi realizado pela desidratação em concentrações crescentes de álcool etílico (30%, 50%, 70%, 80%, 95% e 100%), por 1 hora cada, a fim de se obter a desidratação dos espécimes.

Após a última concentração de álcool, os mesmos foram transferidos para uma placa de acrílico com 6 orifícios, utilizada em

cultura de células. Os subgrupos foram codificados para a aplicação do hexametildisilazane (HMDS) (Sigma, Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA), utilizado com finalidade de manutenção da integridade das fibras colágenas. Os espécimes de cada subgrupo foram colocados em um orifício contendo uma parte (800 µL) de álcool etílico absoluto misturada a uma parte (800 µL) de HMDS. Os espécimes ficaram imersos por 30 minutos e foram transferidos para outro orifício contendo apenas HMDS (1600 µL), no qual permanecem por 10 minutos. A quantidade de HMDS e álcool foram determinados de tal forma que cobrissem totalmente os espécimes, mas sempre respeitando a proporção de 1:1 nos primeiros orifícios e apenas HMDS nos segundos orifícios.

#### **Avaliação da rugosidade**

Os espécimes foram colados em *stubs* metálicos e mantidos em dessecador a vácuo (40/35 Sleeve Top Dessicator, Corning, Nova Iorque, EUA). Antes de serem metalizados, os espécimes foram submetidos à avaliação da rugosidade por meio de um rugosímetro. Os *stubs* foram adaptados a um dispositivo de acrílico, o qual por sua vez foi preso à mesa do rugosímetro utilizando-se Cera Utilidade (Clássico Artigos Odontológicos, São Paulo, SP, Brasil). Foram realizadas 3 medidas para cada amostra em três direções diferentes, porém sempre passando pelo centro da amostra (FIGURA 35).

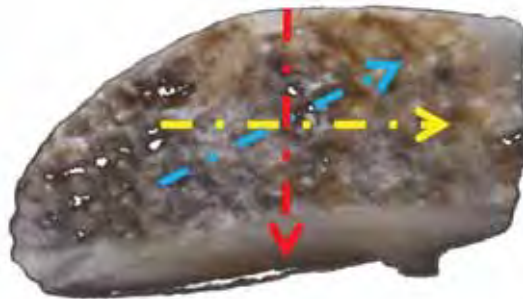


FIGURA 35. Direção das três mensurações realizadas utilizando-se o rugosímetro.

As medidas foram realizadas com um *cut-off* de 0.25 mm e um comprimento de leitura de 1.25 mm (5 *cut-offs*). Foram determinadas: rugosidade média ( $R_a$ ), definida como a média aritmética entre picos e vales (FIGURA 36); rugosidade total ( $R_t$ ), que significa a distância entre o pico máximo e a altura do vale (FIGURA 37);  $R_y$  (DIN), definida como a maior rugosidade considerando todos os *cut-offs* (maior pico e maior vale) (FIGURA 38);  $R_z$ (DIN), que é a média da altura de 5 picos e 5 vales em cada *cut-off* (FIGURA 39)<sup>70,85,87</sup>.

Após obtenção das medidas de rugosidade, os espécimes foram metalizados e observados em microscopia eletrônica de varredura.

#### **Avaliação em microscopia eletrônica de varredura**

A avaliação por meio de microscopia eletrônica de varredura foi realizada com o objetivo de correlacionar as mensurações



realizadas por meio do rugosímetro com a morfologia da superfície radicular.

Os espécimes foram metalizados por recobrimento com liga ouro-paládio (Balt-Tec SCD-050, Flórida, EUA), durante 120 segundos e foram levados para análise em microscópio eletrônico de varredura (Jeol-JSM T330-A, JEOL Technics Co., Tóquio, Japão), operado a 20kV. Foram obtidas fotomicrografias do centro da região do espécime onde se encontrava o cálculo aderido, com auxílio de filme Neopan Acros (Fuji Film 120 SS, Tokyo, Japão). Nos espécimes em que foi avaliada a rugosidade as fotomicrografias foram obtidas nos aumentos de 1500X e 3500X na região previamente demarcada de cada espécime.

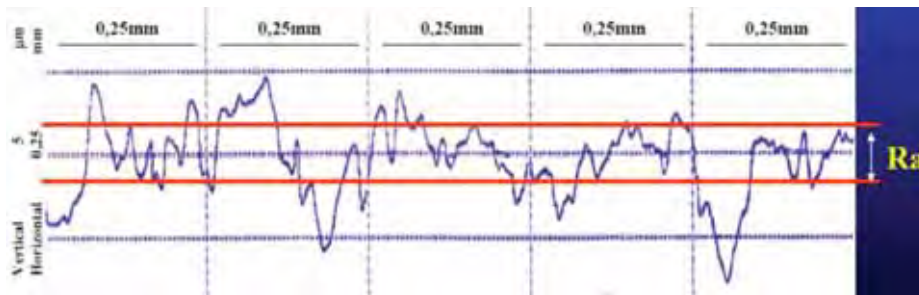


FIGURA 36.  $R_a$  – rugosidade média. É a distância média de um perfil desde sua linha média, sobre um comprimento medido ( $l_m$ ). Média aritmética entre picos e vales.

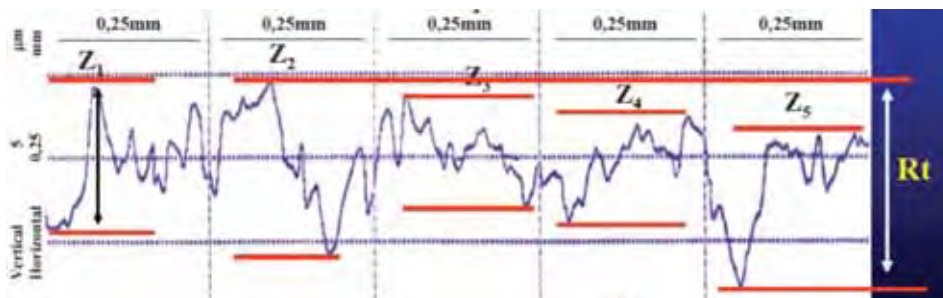


FIGURA 37.  $R_t$  – rugosidade total. Distância vertical entre o pico mais alto e o vale mais baixo no percurso de medição  $l_m$ , medido por duas linhas paralelas à linha média independente dos valores de  $Z_i$ .

$$R_t = R_p + R_v$$

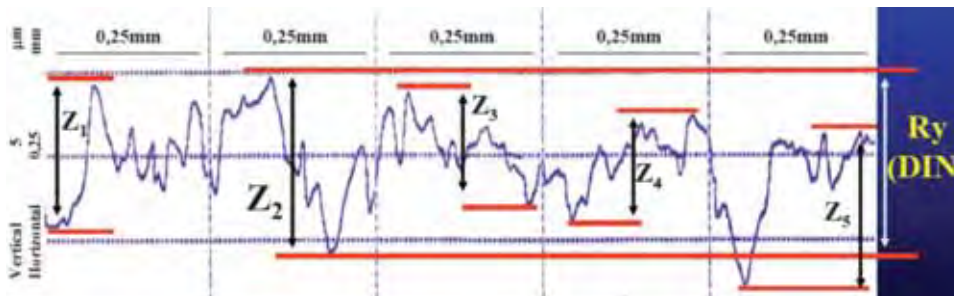


FIGURA 38.  $R_y$  – rugosidade máxima. maior rugosidade entre as rugosidades parciais ( $Z_i$ ) que se apresenta no percurso de medição ( $l_m$ )

$$R_y = Z_2$$

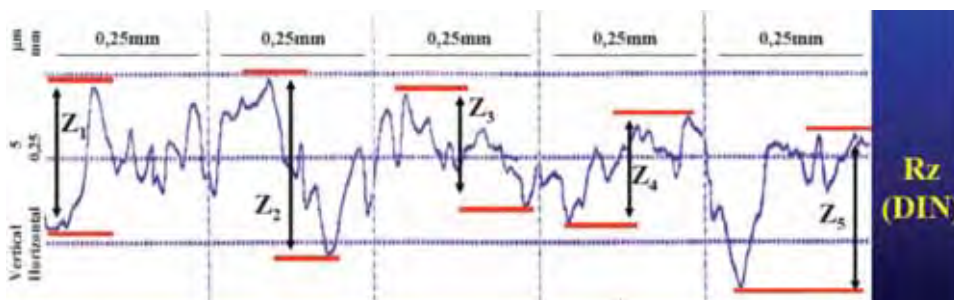


FIGURA 39.  $R_z$  (DIN) – é a média aritmética dos valores de rugosidade parcial ( $Z_i$ ) medidos por linhas paralelas à linha média.

$$R_z(\text{DIN}) = (Z_1 + Z_2 + \dots + Z_n)/n$$

### **Análise das fotomicrografias**

As fotomicrografias foram analisadas por 1 examinador previamente calibrado e sem conhecimento quanto à identificação dos espécimes (cegamento), como descrito por Sousa<sup>94</sup> (2004), Batista<sup>12</sup> (2002), Abi Rached<sup>1</sup> (2003), Pilatti<sup>75</sup> (2001), Sampaio<sup>86</sup> (1999), Cavassim<sup>27</sup> (2010).

Para os espécimes que foram apenas condicionados, ou seja, o tecido sanguíneo não é aplicado, o examinador realizou a descrição morfológica da superfície por meio do Índice de Morfologia Radicular.

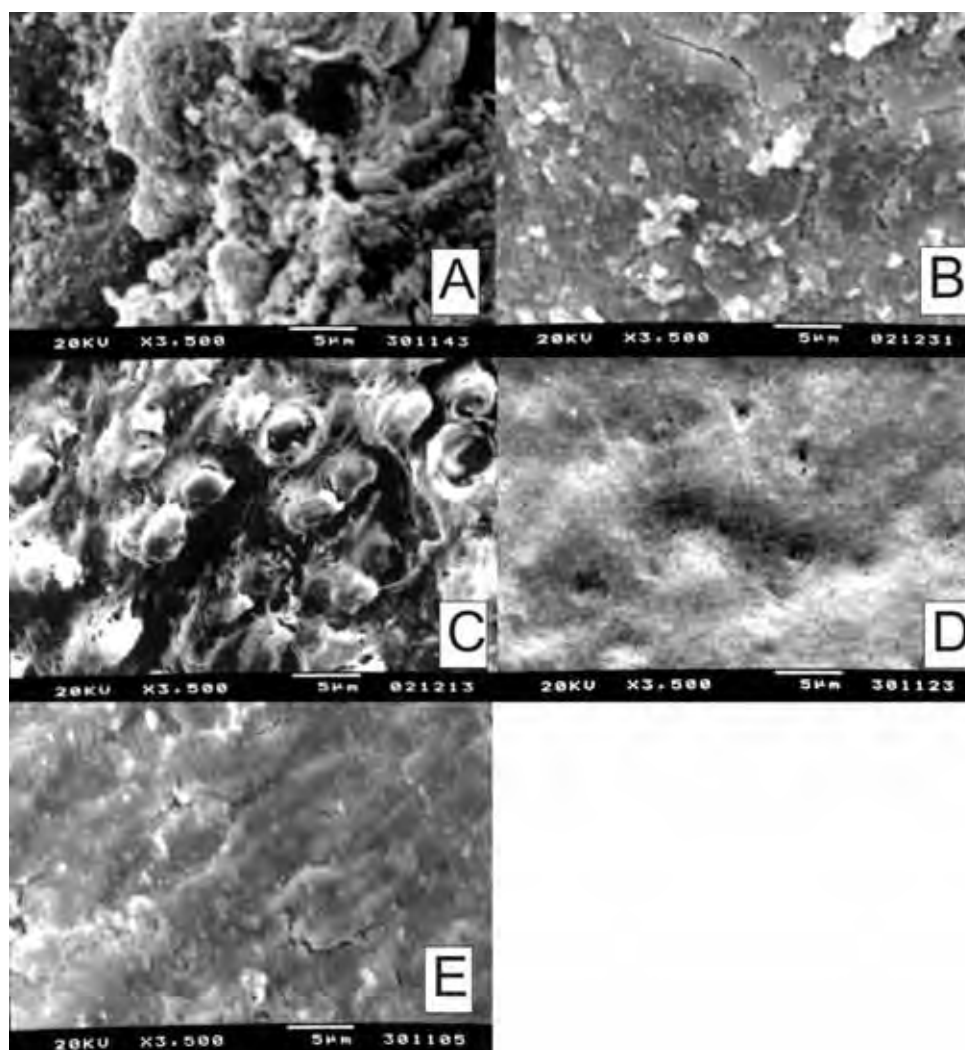


FIGURA 40. **Índice de Morfologia Radicular.**A) Escore 1 – superfície com cálculo de aspecto muito rugoso. B) Escore 2 – superfície com cálculo de aspecto pouco rugoso. C) Escore 3 – cálculo desmineralizado. D) Escore 4 - superfície radicular hiperdesmineralizada. E) Escore 5 – presença de smear layer.

Para cada fotomicrografia, o examinador realizou 3 leituras com intervalo mínimo 7 dias entre elas, e após a tabulação dos dados, foi selecionado o índice de maior frequência entre as 3 análises, como sendo o índice proposto para a fotomicrografia. Caso uma

fotomicrografia apresentasse 3 escores diferentes, foram realizadas 3 novas leituras em intervalo de 7 dias.

#### **Análise estatística**

Os dados dos parâmetros de rugosidade (Ra, Rt, Ry e Rz) estão representados pela média e desvio padrão e foram analisados utilizando-se o software GraphPad Prism 5 (GraphPad, La Jolla, CA, USA) com nível de significância de 5%. A normalidade foi testada utilizando-se o teste de D'Agostino & Pearson. Uma vez que os dados apresentaram distribuição normal, foi utilizada estatística paramétrica por meio do teste ANOVA de um critério e pós-teste Tukey.

## ***CONSIDERAÇÕES FINAIS***

A regeneração dos tecidos periodontais não possui um resultado previsível. Atualmente os tratamentos existentes para a doença periodontal focam na remoção de depósitos mineralizados e não mineralizados da superfície dentária, sem estabelecer uma previsibilidade de recuperação das estruturas perdidas em consequência da doença periodontal<sup>13,19,68,79-80</sup>. O resultado mais previsível observado é a formação de um epitélio juncional longo após a descontaminação da superfície radicular. Descontaminação essa que pode ser questionada quanto a sua eficácia, visto que, comprovadamente, resíduos de cálculo dental são observados mesmo após procedimento de raspagem meticuloso<sup>55,87</sup>.

Assim, estudos propuseram a utilização de meios complementares à raspagem e alisamento radicular com intuito de remover a smear layer produzida e expor fibras colágenas da matriz dentinária para favorecer a formação de nova inserção conjuntiva<sup>14-15,17-18,22-23,78,84</sup>. Trabalhos in vivo não mostraram vantagens em relação ao grupo controle com a utilização desta terapia, sendo que os grupos testados apresentaram resultados semelhantes aos do grupo controle<sup>13,19,68</sup>. Por outro lado, estudos in vitro recentes mostraram que a utilização de ácido cítrico e tetraciclina podem favorecer a adesão inicial de coágulo e componentes sanguíneos às raízes tratadas<sup>60,67</sup>. Também, a

utilização do PRP mostrou-se mais eficaz quando utilizada em conjunto ao condicionamento químico radicular<sup>67</sup>.

Os estudos que investigaram, *in vitro*, a aplicação do ácido cítrico com o objetivo de se obter a biomodificação radicular utilizaram diferentes parâmetros de concentração, tempo e modo de aplicação dessa substância<sup>28-29,32,39,44,96-98,104</sup>, com resultados conflitantes, de tal maneira que não se tinha uma padronização desses parâmetros para a utilização do ácido cítrico em pesquisas. Esta questão levou-nos ao desenvolvimento de um trabalho com o objetivo de estabelecer os parâmetros de concentração, tempo e modo de aplicação para a utilização do ácido cítrico. Este foi o objetivo do Estudo I, no qual diferentes concentrações, tempos e modos de aplicação foram avaliados, *in vitro*, estabelecendo-se assim a aplicação com pincel por 3 minutos de ácido cítrico na concentração de 25% como a mais eficaz na biomodificação radicular. Embora este parâmetro tenha sido estabelecido, os resultados deste estudo mostraram uma grande prevalência das amostras avaliadas apresentando hiperdesmineralização, condição esta também presente na concentração estabelecida. Este fato levantou o questionamento da interferência relacionada ao grau de mineralização da superfície radicular frente a ação dos agentes químicos utilizados. Fontanari et al<sup>42</sup> (2011) mostrou uma tendência ao favorecimento do sucesso da biomodificação radicular em dentes não expostos ao meio bucal e por outro lado uma maior dificuldade de obtenção de resultados

favoráveis em dentes expostos ao meio bucal e à placa bacteriana. Esses autores ainda comentam em seu estudo que dentes que ainda não foram expostos à placa bacteriana provavelmente tenham um grau de mineralização menor que dentes que já foram expostos a placa bacteriana e assim tornam-se mais fáceis de serem desmineralizados. Assim sendo, este acontecimento é uma das dificuldades que temos quanto a padronização de aplicação de produtos para alcançar a exposição de fibras colágenas dentinárias ou cementárias pois ainda não é possível saber qual o grau de mineralização que a superfície radicular a ser biomodificada apresenta.

Uma vez que a biomodificação radicular tem se mostrado uma condição difícil de ser obtida, mas considerando-se também o resultado positivo da utilização do ácido cítrico demonstrado pela adesão de coágulo e componentes sanguíneos, buscou-se avaliar a capacidade do ácido cítrico e do cloridrato de tetraciclina como terapia complementar à instrumentação periodontal, buscando não apenas a remoção de smear layer, mas também uma descontaminação da superfície radicular. O ácido cítrico foi utilizado levando-se em consideração resultados favoráveis obtidos quanto à formação de uma rede de fibrina e adesão de componentes sanguíneos à superfície radicular. O cloridrato de tetraciclina foi selecionado em decorrência dos seus, também favoráveis resultados em relação à formação de uma rede de fibrina e também por



sua propriedade antimicrobiana e capacidade de sofrer adsorção à superfície dentinária<sup>60</sup>.

Essa condição foi avaliada de duas maneiras, pela adesão de coágulo e componentes sanguíneos após diferentes meios de instrumentação, aqui representado pelo Estudo II e pela avaliação da rugosidade produzida na superfície radicular, representada pelo Estudo III.

No Estudo II pode-se observar que o condicionamento químico favoreceu a adesão inicial de coágulo e componentes sanguíneos nos grupos submetidos à raspagem e alisamento radicular, sendo que o ácido cítrico foi superior no Grupo I (instrumentação manual vigorosa) e o cloridrato de tetraciclina foi superior no Grupo IV (instrumentação com ultrassom + instrumentação manual vigorosa). Uma hipótese sugerida é que os dentes perdidos por doença periodontal possuem sua superfície radicular com alto grau de mineralização<sup>91</sup> e que a raspagem e alisamento radicular são eficazes na remoção dessa camada superficial mais mineralizada, expondo uma camada de dentina passível de sofrer biomodificação, enquanto que uma camada mais mineralizada é mantida quando apenas se destaca o cálculo dental. Também, estudos mostram que endotoxinas podem ser encontradas nesta camada, o que dificultaria a ação dos agentes químicos<sup>40,66</sup>.

A presença de endotoxinas, assim como o grau de mineralização podem estar relacionadas ao tempo de exposição dos

dentos à placa bacteriana. Da mesma maneira que não se pode determinar o grau de mineralização radicular, também não se pode determinar a presença, quantidade e profundidade de endotoxinas adsorvidas à superfície radicular, bem como sua efetiva remoção. O cemento é uma estrutura permeável que permite a adsorção de endotoxinas e bactérias, tanto que estudos discutem a necessidade da total remoção do cemento. Por outro lado, outros estudos<sup>2-3,6</sup> sugerem que as endotoxinas bacterianas podem estar forte e profundamente aderidas à superfície radicular, sendo que apenas a raspagem e alisamento radicular não seriam suficientes para sua remoção, visto que a remoção de grande quantidade de estrutura dental seria necessária para a completa eliminação dessas endotoxinas, outros autores<sup>66</sup> sugerem que a ligação destas endotoxinas à superfície radicular é fraca e superficial, podendo ser facilmente eliminada com poucos movimentos de raspagem e alisamento radicular. Não somente as endotoxinas podem aderir-se à dentina, mas também podemos observar a penetração de bactérias no interior dos túbulos dentinários<sup>2-3</sup>. Neste caso, a instrumentação não seria suficiente para eliminação dessas bactérias, podendo ser utilizada uma descontaminação química como tratamento coadjuvante à instrumentação radicular.

Todos esses fatores em conjunto podem influenciar no sucesso da descontaminação e biomodificação radicular. No Estudo II, embora tenham sido utilizados dentes com grande quantidade de cálculo

aderido, não se pode saber o tempo de exposição e formação do cálculo aderido. Este pode ter sido um fator que influenciou nos resultados obtidos no Estudo II.

É importante ressaltar também que apesar de não haver diferença estatística entre as formas de instrumentação e entre as substâncias utilizadas na biomodificação, todos os grupos foram significativamente diferentes do grupo controle (Grupo V – cálculo aderido), mostrando que apesar das diferenças, os tratamentos foram melhores que o controle.

Os resultados do Estudo III mostraram que os espécimes dos Grupos II (Instrumentação manual somente destacando-se o cálculo visível) e III (Instrumentação com ultrassom somente destacando cálculo visível) apresentaram maior rugosidade em sua superfície radicular, indicado tanto pelos parâmetros aferidos por meio do rugosímetro quanto pelas fotomicrografias obtidas. E também que a raspagem e alisamento radicular foram eficazes na remoção do cálculo dental e obtenção de uma superfície “mais lisa” que a utilização do aparelho ultrassônico ou mesmo da utilização de curetas para destacar o cálculo apenas. Apesar de menor, a rugosidade média (Ra) produzida pela instrumentação manual não foi tão diferente da instrumentação destacando cálculo. Por outro lado, quando avaliados os outros parâmetros (Rt, Ry, Rz), estes foram bastante superiores a instrumentação manual, o que indicaria a presença de picos e vales com maior diferença entre si e conseqüente maior

irregularidade da superfície, apesar de semelhança nos valores de rugosidade média (Ra).

Ao analisar conjuntamente os Estudos II e III pode-se observar alguns resultados em relação a influência da rugosidade e do condicionamento químico da superfície radicular. Os resultados do Estudo II mostram que o condicionamento químico radicular favoreceu a adesão de coágulo e componentes sanguíneos nos subgrupos nos quais os espécimes foram condicionados com ácido cítrico ou TTC HCl, sendo que no Grupo I (instrumentação manual vigorosa) o ácido cítrico (Ib) foi superior em relação a TTC HCl (1c) e ao controle (Ia). Por outro lado, no Grupo IV (instrumentação com ultrassom + instrumentação manual vigorosa), a TTC HCl foi superior aos demais subgrupos. Pode-se observar nestes grupos, segundo o Estudo III, um pequeno aumento na rugosidade média (Ra) para o ácido cítrico, provavelmente em decorrência da hiperdesmineralização pela ação do ácido cítrico. Por outro lado, a TTC HCl não alterou consideravelmente a rugosidade média (Ra) para esses dois grupos. Para os grupos II (cálculo destacado com curetas) e III (cálculo destacado com ultrassom), a TTC HCl e o ácido cítrico diminuíram a rugosidade média (Ra), provavelmente desmineralizando o cálculo residual dos espécimes avaliados. Nestes grupos, obteve-se uma maior diminuição da rugosidade com a TTC HCl. O Grupo V (controle), apresentou os maiores valores de rugosidade, o que já se esperava visto que a superfície com cálculo apresenta uma

superfície rugosa<sup>87</sup>. O ácido cítrico reduziu a rugosidade da superfície com cálculo, porém mesmo assim ficou bastante acima dos outros grupos.

Segundo os estudos II e III, a instrumentação radicular parece ser fator fundamental na adesão de coágulo e células sanguíneas, uma vez que os espécimes que receberam instrumentação vigorosa (Grupos I e IV) apresentaram melhores resultados para adesão de coágulo e células sanguíneas. Por sua vez, apenas a descontaminação com ácido cítrico ou TTH HCl não foram suficientemente eficazes para que ocorresse a adesão de coágulo e células sanguíneas, como observado na superfície com cálculo (Grupo V). Assim, pode-se observar que apenas descontaminar quimicamente uma superfície com cálculo não permitiu que sobre esta houvesse adesão de coágulo e células sanguíneas e que mesmo nos espécimes que tiveram o cálculo apenas destacados (Grupos II e III), a descontaminação química não favoreceu a adesão de coágulo e células sanguíneas. Apenas nos espécimes efetivamente instrumentados, utilizando-se instrumentos manuais apenas (Grupo I) ou após instrumentação ultrassônica (Grupo IV), a descontaminação química parece ter influenciado positivamente na adesão de coágulo e células sanguíneas.

Os subgrupos Ia, no qual os espécimes foram vigorosamente instrumentados apenas com curetas e IVa, no qual os espécimes foram instrumentados vigorosamente com curetas após a

raspagem com ultrassom, não apresentaram formação de rede de fibrina e adesão de coágulo considerável. Este resultado está em acordo com Leite<sup>60</sup> (2010), porém não concorda com os resultados obtidos por Oliveira<sup>73</sup> (2010) onde se pode observar a adesão de coágulo e rede de fibrina recobrendo toda a superfície radicular observada ao MEV. Sendo assim, provavelmente algum fator relativo à superfície radicular dos dentes utilizados, pode ter interferido no presente estudo e no estudo de Leite<sup>60</sup> (2010), uma vez que todos os dentes foram perdidos por doença periodontal severa; provavelmente o que dificultou a adesão de coágulo nos espécimes desta tese e do trabalho de Leite<sup>60</sup> (2010) está relacionado a quantidade de cálculo aderido à raiz e conseqüentemente a quantidade e penetração de endotoxinas na superfície radicular assim como o grau de mineralização dessas superfícies o que denotaria uma superfície radicular bastante contaminada que talvez esteja também correlacionada com o tempo de exposição da raiz à placa bacteriana, na qual mesmo após a associação da instrumentação manual vigorosa e instrumentação com o ultrassom, endotoxinas bacterianas adsorvidas a superfície radicular ou até mesmo bactérias no interior de túbulos dentinários, ainda podem ter contribuído para a não adesão de coágulo. Ainda podemos levantar a hipótese da própria smear layer que pode estar contaminada já que ela é composta de raspas de estrutura dental contaminada ou não, cálculo e placa bacteriana dependendo de uma série de fatores como: profundidade de contaminação e grau de mineralização da raiz,

quantidade de movimentos de instrumentação, grau de afiação do instrumental, tipo de instrumento utilizado, força utilizada para instrumentar, tipo de dente, a anatomia radicular e conhecimento e treinamento do operador. Interessante notar que a adesão de coágulo e rede de fibrina considerável, somente ocorreu após a descontaminação com ácido cítrico ou TTC HCl, nas amostras que sofreram instrumentação manual vigorosa. Por outro lado, nas amostras que não foram instrumentadas, a descontaminação química não produziu efeito quanto a adesão de coágulo e rede de fibrina. Ressalta-se então a importância da descontaminação mecânica previamente a descontaminação química.

Os resultados desta tese mostraram que a metodologia de adesão de coágulo proposta por Baker<sup>10</sup> (2005) e utilizada por Theodoro<sup>100</sup> (2006), Leite<sup>60</sup> (2010) e Oliveira<sup>73</sup> (2010) foi eficaz para mostrar que não há adesão de coágulo em superfícies rugosas e contaminadas como podemos observar nas amostras com cálculo (Grupo V). Assim, podemos supor que para aderir coágulo a superfície radicular pode até estar rugosa, mas principalmente precisa estar descontaminada. Além disso, esses resultados possibilitam novas discussões e ampliam ainda mais o campo de pesquisa nesta área. Uma mudança no enfoque dado aos procedimentos de biomodificação radicular pode ser proposta, uma vez que as substâncias utilizadas, embora não contribuíssem significativamente na adesão de coágulo e elementos sanguíneos nos Grupos II e III, possibilitaram uma discreta redução nos valores de

rugosidade desses grupos. A aplicação clínica dessas substâncias como coadjuvantes à raspagem e alisamento radicular deve novamente ser questionada, não apenas objetivando remoção de smear layer e exposição de fibras colágenas que favorecem a adesão da rede de fibrina, organização e estabilização do coágulo, mas principalmente como tratamento complementar atuando na descontaminação da superfície radicular. A associação a fatores de crescimento, entre outros complementam aspectos que devem ser considerados em pesquisas futuras sobre tratamento da doença periodontal.



## ***CONCLUSÃO***

Os resultados obtidos, frente às metodologias utilizadas, permitiram concluir que:

1. Os parâmetros mais favoráveis para obtenção da biomodificação radicular com ácido cítrico são a utilização de uma concentração de 25%, aplicada com pincel, nos tempos de 1 e 3 minutos.
2. A utilização do condicionamento químico radicular, quando realizados após raspagem e alisamento radicular, favoreceu a formação de uma rede de fibrina e adesão de elementos sanguíneos.
3. O procedimento de raspagem e alisamento radicular produziu superfícies com menor rugosidade.
4. O condicionamento radicular favoreceu a uma discreta redução nos parâmetros de rugosidade nos grupos que tiveram o cálculo apenas destacado e um aumento na rugosidade nos grupos que foram previamente submetidos à raspagem e alisamento radicular.
5. Uma condição essencial para que ocorra adesão de coágulo à superfície radicular é que a mesma apresente-se descontaminada.

## ***REFERÊNCIAS\****

1. Abi Rached AD. Remoção de smear layer de superfícies radiculares utilizando diferentes concentrações, modos e tempos de aplicação de cloridrato de tetraciclina. Análise por meio de microscopia eletrônica de varredura. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2003.
2. Adriaens PA, De Boever JA, Loesche WJ. Bacterial invasion in root cementum and radicular dentin of periodontally diseased teeth in humans. A reservoir of periodontopathic bacteria. *J Periodontol.* 1988; 59: 222-30.
3. Adriaens PA, Edwards CA, De Boever JA, Loesche WJ. Ultrastructural observations on bacterial invasion in cementum and radicular dentin of periodontally diseased human teeth. *J Periodontol.* 1988; 59: 493-503.
4. Agustin Zeron J. [Glossary of periodontal terms]. *Rev ADM.* 1990; 47: 350-8.
5. Albair WB, Cobb CM, Killoy WJ. Connective tissue attachment to periodontally diseased roots after citric acid demineralization. *J Periodontol.* 1982; 53: 515-26.
6. Aleo JJ, De Renzis FA, Farber PA, Varboncoeur AP. The presence and biologic activity of cementum-bound endotoxin. *J Periodontol.* 1974; 45: 672-5.
7. Allen DL, Kerr DA. Tissue Response in the Guinea Pig to Sterile and Non-Sterile Calculus. *J Periodontol.* 1965; 36: 121-6.

\* De acordo com o estilo Vancouver. Disponível em: [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)

8. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol.* 1999; 4: 1-6.
9. Armitage GC. Diagnosis of periodontal diseases. *J Periodontol.* 2003; 74: 1237-47.
10. Baker DL, Stanley Pavlow SA, Wikesjo UM. Fibrin clot adhesion to dentin conditioned with protein constructs: an in vitro proof-of-principle study. *J Clin Periodontol.* 2005; 32: 561-6.
11. Baker PJ, Rotch HA, Trombelli L, Wikesjo UM. An in vitro screening model to evaluate root conditioning protocols for periodontal regenerative procedures. *J Periodontol.* 2000; 71: 1139-43.
12. Batista LHC. Estudo in vitro da eficácia de um gel de EDTA-T na remoção da "smear layer" da superfície radicular. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2002.
13. Bittencourt S, Ribeiro Edel P, Sallum EA, Sallum AW, Nociti FH, Jr., Casati MZ. Root surface biomodification with EDTA for the treatment of gingival recession with a semilunar coronally repositioned flap. *J Periodontol.* 2007; 78: 1695-701.
14. Blomlof J, Blomlof L, Lindskog S. Effect of different concentrations of EDTA on smear removal and collagen exposure in periodontitis-affected root surfaces. *J Clin Periodontol.* 1997; 24: 534-7.
15. Blomlof J, Jansson L, Blomlof L, Lindskog S. Root surface etching at neutral pH promotes periodontal healing. *J Clin Periodontol.* 1996; 23: 50-5.
16. Blomlof J, Lindskog S. Periodontal tissue-vitality after different etching modalities. *J Clin Periodontol.* 1995; 22: 464-8.

17. Blomlof JP, Blomlof LB, Lindskog SF. Smear layer formed by different root planing modalities and its removal by an ethylenediaminetetraacetic acid gel preparation. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 1997; 17: 242-9.
18. Blomlof JP, Blomlof LB, Lindskog SF. Smear removal and collagen exposure after non-surgical root planing followed by etching with an EDTA gel preparation. *J Periodontol.* 1996; 67: 841-5.
19. Blomlof L, Jonsson B, Blomlof J, Lindskog S. A clinical study of root surface conditioning with an EDTA gel. II. Surgical periodontal treatment. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2000; 20: 566-73.
20. Bollen CM, Quirynen M. Microbiological response to mechanical treatment in combination with adjunctive therapy. A review of the literature. *J Periodontol.* 1996; 67: 1143-58.
21. Braun A, Krause F, Frentzen M, Jepsen S. Efficiency of subgingival calculus removal with the Vector-system compared to ultrasonic scaling and hand instrumentation in vitro. *J Periodontal Res.* 2005; 40: 48-52.
22. Breschi L, Gobbi P, Lopes M, Prati C, Falconi M, Teti G, et al. Immunocytochemical analysis of dentin: a double-labeling technique. *J Biomed Mater Res A.* 2003; 67: 11-7.
23. Breschi L, Perdigao J, Gobbi P, Mazzotti G, Falconi M, Lopes M. Immunocytochemical identification of type I collagen in acid-etched dentin. *J Biomed Mater Res A.* 2003; 66: 764-9.
24. Bulman JS, Osborn JF. Measuring diagnostic consistency. *Br Dent J.* 1989; 166: 377-81.

25. Busslinger A, Lampe K, Beuchat M, Lehmann B. A comparative in vitro study of a magnetostrictive and a piezoelectric ultrasonic scaling instrument. *J Clin Periodontol*. 2001; 28: 642-9.
26. Caton JG, Greenstein G. Factors related to periodontal regeneration. *Periodontol 2000*. 1993; 1: 9-15.
27. Cavassim R, Leite FR, Zandim DL, Dantas AA, Sampaio JE. Smear layer removal for collagen fiber exposure after citric acid conditionings. *J Contemp Dent Pract*. 2010; 11: E001-8.
28. Chaves E, Cox C, Morrison E, Caffesse R. The effect of citric acid application on periodontally involved root surfaces. 1. An in vitro light microscopic study. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 1992; 12: 219-29.
29. Chaves E, Cox CF, Morrison E, Caffesse R. The effect of citric acid application on periodontally involved root surfaces. II. An in vitro scanning electron microscopic study. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 1993; 13: 188-96.
30. Cheetham WA, Wilson M, Kieser JB. Root surface debridement--an in vitro assessment. *J Clin Periodontol*. 1988; 15: 288-92.
31. Choo A, Delac DM, Messer LB. Oral hygiene measures and promotion: review and considerations. *Aust Dent J*. 2001; 46: 166-73.
32. Codelli GR, Fry HR, Davis JW. Burnished versus nonburnished application of citric acid to human diseased root surfaces: the effect of time and method of application. *Quintessence Int*. 1991; 22: 277-83.

33. Coldiron NB, Yukna RA, Weir J, Caudill RF. A quantitative study of cementum removal with hand cures. *J Periodontol.* 1990; 61: 293-9.
34. Copulos TA, Low SB, Walker CB, Trebilcock YY, Hefti AF. Comparative analysis between a modified ultrasonic tip and hand instruments on clinical parameters of periodontal disease. *J Periodontol.* 1993; 64: 694-700.
35. Corbet EF, Vaughan AJ, Kieser JB. The periodontally-involved root surface. *J Clin Periodontol.* 1993; 20: 402-10.
36. Dayan S, Stashenko P, Niederman R, Kupper TS. Oral epithelial overexpression of IL-1alpha causes periodontal disease. *J Dent Res.* 2004; 83: 786-90.
37. Drago MR. A clinical evaluation of hand and ultrasonic instruments on subgingival debridement. 1. With unmodified and modified ultrasonic inserts. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 1992; 12: 310-23.
38. Eberhard J, Ehlers H, Falk W, Acil Y, Albers HK, Jepsen S. Efficacy of subgingival calculus removal with Er:YAG laser compared to mechanical debridement: an in situ study. *J Clin Periodontol.* 2003; 30: 511-8.
39. Fardal O, Lowenberg BF. A quantitative analysis of the migration, attachment, and orientation of human gingival fibroblasts to human dental root surfaces in vitro. *J Periodontol.* 1990; 61: 529-35.
40. Feres M, Gursky LC, Faveri M, Tsuzuki CO, Figueiredo LC. Clinical and microbiological benefits of strict supragingival plaque control as

part of the active phase of periodontal therapy. *J Clin Periodontol.* 2009; 36: 857-67.

41. Flemmig TF. Periodontitis. *Ann Periodontol.* 1999; 4: 32-8.
42. Fontanari LA, Pinto SC, Cavassim R, Spin-Neto R, Ishi Ede P, Sampaio JE. Influence of dental exposure to oral environment on smear layer removal and collagen exhibition after using different conditioning agents. *Braz Dent J.* 2011; 22: 479-85.
43. Garnick JJ, Dent J. A scanning electron micrographical study of root surfaces and subgingival bacteria after hand and ultrasonic instrumentation. *J Periodontol.* 1989; 60: 441-7.
44. Hanes PJ, O'Brien NJ, Garnick JJ. A morphological comparison of radicular dentin following root planing and treatment with citric acid or tetracycline HCl. *J Clin Periodontol.* 1991; 18: 660-8.
45. Hanes PJ, Polson AM, Frederick GT. Initial wound healing attachments to demineralized dentin. *J Periodontol.* 1988; 59: 176-83.
46. Hussein A, Slot DE, Van der Weijden GA. The efficacy of oral irrigation in addition to a toothbrush on plaque and the clinical parameters of periodontal inflammation: a systematic review. *Int J Dent Hyg.* 2008; 6: 304-14.
47. Ishi EP, Dantas AA, Batista LH, Onofre MA, Sampaio JE. Smear layer removal and collagen fiber exposure using tetracycline hydrochloride conditioning. *J Contemp Dent Pract.* 2008; 9: 25-33.

48. Jenny RJ, Mann KG. Factor V: a prototype pro-cofactor for vitamin K-dependent enzyme complexes in blood clotting. *Baillieres Clin Haematol.* 1989; 2: 919-44.
49. Jepsen S, Ayna M, Hedderich J, Eberhard J. Significant influence of scaler tip design on root substance loss resulting from ultrasonic scaling: a laserprofilometric in vitro study. *J Clin Periodontol.* 2004; 31: 1003-6.
50. Jones SJ, Lozdan J, Boyde A. Tooth surfaces treated in situ with periodontal instruments. Scanning electron microscopic studies. *Br Dent J.* 1972; 132: 57-64.
51. Jotikasthira NE, Lie T, Leknes KN. Comparative in vitro studies of sonic, ultrasonic and reciprocating scaling instruments. *J Clin Periodontol.* 1992; 19: 560-9.
52. Karring T, Nyman S, Lindhe J, Sirirat M. Potentials for root resorption during periodontal wound healing. *J Clin Periodontol.* 1984; 11: 41-52.
53. Kawai K, Urano M, Ebisu S. Effect of surface roughness of porcelain on adhesion of bacteria and their synthesizing glucans. *J Prosthet Dent.* 2000; 83: 664-7.
54. Kawashima H, Sato S, Kishida M, Ito K. A comparison of root surface instrumentation using two piezoelectric ultrasonic scalers and a hand scaler in vivo. *J Periodontal Res.* 2007; 42: 90-5.
55. Kepic TJ, O'Leary TJ, Kafrawy AH. Total calculus removal: an attainable objective? *J Periodontol.* 1990; 61: 16-20.



56. Kerry GJ. Roughness of root surfaces after use of ultrasonic instruments and hand cures. *J Periodontol.* 1967; 38: 340-6.
57. Lea SC, Landini G, Walmsley AD. Displacement amplitude of ultrasonic scaler inserts. *J Clin Periodontol.* 2003; 30: 505-10.
58. Lee A, Heasman PA, Kelly PJ. An in vitro comparative study of a reciprocating scaler for root surface debridement. *J Dent.* 1996; 24: 81-6.
59. Leite FR, Moreira CS, Theodoro LH, Sampaio JE. Blood cell attachment to root surfaces treated with EDTA gel. *Braz Oral Res.* 2005; 19: 88-92.
60. Leite FR, Sampaio JE, Zandim DL, Dantas AA, Leite ER, Leite AA. Influence of root-surface conditioning with acid and chelating agents on clot stabilization. *Quintessence Int.* 2010; 41: 341-9.
61. Leknes KN, Lie T, Wikesjo UM, Bogle GC, Selvig KA. Influence of tooth instrumentation roughness on subgingival microbial colonization. *J Periodontol.* 1994; 65: 303-8.
62. Lie T, Leknes KN. Evaluation of the effect on root surfaces of air turbine scalers and ultrasonic instrumentation. *J Periodontol.* 1985; 56: 522-31.
63. Lie T, Meyer K. Calculus removal and loss of tooth substance in response to different periodontal instruments. A scanning electron microscope study. *J Clin Periodontol.* 1977; 4: 250-62.
64. Loe H, Theilade E, Jensen SB. Experimental Gingivitis in Man. *J Periodontol.* 1965; 36: 177-87.

65. Lowenguth RA, Blieden TM. Periodontal regeneration: root surface demineralization. *Periodontol 2000*. 1993; 1: 54-68.
66. Magnusson I, Lindhe J, Yoneyama T, Liljenberg B. Recolonization of a subgingival microbiota following scaling in deep pockets. *J Clin Periodontol*. 1984; 11: 193-207.
67. Magri LV, Cavassim R, Sampaio JEC. Adesão de células sanguíneas em raízes biomodificadas de pacientes fumantes. *Revista PerioNews*. 2011; 5: 50-6.
68. Mayfield L, Soderholm G, Norderyd O, Attstrom R. Root conditioning using EDTA gel as an adjunct to surgical therapy for the treatment of intraosseous periodontal defects. *J Clin Periodontol*. 1998; 25: 707-14.
69. Meyer K, Lie T. Root surface roughness in response to periodontal instrumentation studied by combined use of microroughness measurements and scanning electron microscopy. *J Clin Periodontol*. 1977; 4: 77-91.
70. Mondelli RF, Wang L, Garcia FC, Prakki A, Mondelli J, Franco EB, et al. Evaluation of weight loss and surface roughness of compomers after simulated toothbrushing abrasion test. *J Appl Oral Sci*. 2005; 13: 131-5.
71. Nalbandian J, Cote N. Direct histological comparison of periodontal wound healing in the beagle dog with and without citric acid conditioning. *J Periodontal Res*. 1982; 17: 552-62.
72. Nunn ME. Understanding the etiology of periodontitis: an overview of periodontal risk factors. *Periodontol 2000*. 2003; 32: 11-23.

73. Oliveira GJPL, Sampaio JEC, Marcantonio RAC. Effects of Er,Cr:YSGG laser irradiation on root surfaces for adhesion of blood components and morphology. *Photomedicine and Laser Surgery*. 2010; 28: 751-6.
74. Pameijer CH, Stallard RE, Hiep N. Surface characteristics of teeth following periodontal instrumentation: a scanning electron microscope study. *J Periodontol*. 1972; 43: 628-33.
75. Pilatti GL. Estudo "in vitro" da eficácia de um gel de EDTA na remoção da "smear layer" da superfície radicular. Influência da concentração, tempo e forma de aplicação. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2001.
76. Polimeni G, Xiropaidis AV, Wikesjo UM. Biology and principles of periodontal wound healing/regeneration. *Periodontol 2000*. 2006; 41: 30-47.
77. Polson AM, Caton J. Factors influencing periodontal repair and regeneration. *J Periodontol*. 1982; 53: 617-25.
78. Polson AM, Frederick GT, Ladenheim S, Hanes PJ. The production of a root surface smear layer by instrumentation and its removal by citric acid. *J Periodontol*. 1984; 55: 443-6.
79. Polson AM, Proye MP. Effect of root surface alterations on periodontal healing. II. Citric acid treatment of the denuded root. *J Clin Periodontol*. 1982; 9: 441-54.
80. Polson AM, Proye MP. Fibrin linkage: a precursor for new attachment. *J Periodontol*. 1983; 54: 141-7.

81. Proye MP, Polson AM. Effect of root surface alterations on periodontal healing. I. Surgical denudation. *J Clin Periodontol.* 1982; 9: 428-40.
82. Proye MP, Polson AM. Repair in different zones of the periodontium after tooth reimplantation. *J Periodontol.* 1982; 53: 379-89.
83. Quirynen M, Bollen CM. The influence of surface roughness and surface-free energy on supra- and subgingival plaque formation in man. A review of the literature. *J Clin Periodontol.* 1995; 22: 1-14.
84. Ruggeri A, Jr., Prati C, Mazzoni A, Nucci C, Di Lenarda R, Mazzotti G, et al. Effects of citric acid and EDTA conditioning on exposed root dentin: An immunohistochemical analysis of collagen and proteoglycans. *Arch Oral Biol.* 2007; 52: 1-8.
85. Saito SK, Lovadino JR, Kroll LB. Rugosidade e pigmentação superficial de materiais iônicos. *Pesqui Odontol Bras.* 2000; 14: 351-6.
86. Sampaio JEC. Eficiência de detergentes e EDTA na remoção da "smear layer" de superfícies radiculares submetidas a raspagem e aplainamento. Análise através da microscopia eletrônica de varredura. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 1999.
87. Santos FA, Pochapski MT, Leal PC, Gimenes-Sakima PP, Marcantonio E, Jr. Comparative study on the effect of ultrasonic instruments on the root surface in vivo. *Clin Oral Investig.* 2008; 12: 143-50.



88. Schenk G, Flemmig TF, Lob S, Ruckdeschel G, Hickel R. Lack of antimicrobial effect on periodontopathic bacteria by ultrasonic and sonic scalers in vitro. *J Clin Periodontol.* 2000; 27: 116-9.
89. Schlageter L, Rateitschak-Pluss EM, Schwarz JP. Root surface smoothness or roughness following open debridement. An in vivo study. *J Clin Periodontol.* 1996; 23: 460-4.
90. Sherman PR, Hutchens LH, Jr., Jewson LG. The effectiveness of subgingival scaling and root planing. II. Clinical responses related to residual calculus. *J Periodontol.* 1990; 61: 9-15.
91. Smulow JB, Turesky SS, Hill RG. The effect of supragingival plaque removal on anaerobic bacteria deep periodontal pockets. *J Am Dent Assoc.* 1983; 107: 737-42.
92. Socransky SS, Haffajee AD. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. *J Periodontol.* 1992; 63: 322-31.
93. Socransky SS, Haffajee AD. The nature of periodontal diseases. *Ann Periodontol.* 1997; 2: 3-10.
94. Sousa CP. Estudo in vitro da eficácia do gel de EDTA 24% na remoção de "smear layer" e exposição de fibras colágenas da superfície radicular. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2004.
95. Steinberg AD, Willey R. Scanning electron microscopy observations of initial clot formation on treated root surfaces. *J Periodontol.* 1988; 59: 403-11.

96. Sterrett JD, Bain C. Citric acid burnishing of dentinal root surfaces. A preliminary scanning electron microscopy report. *J Can Dent Assoc.* 1987; 53: 395-7.
97. Sterrett JD, Delaney B, Rizkalla A, Hawkins CH. Optimal citric acid concentration for dentinal demineralization. *Quintessence Int.* 1991; 22: 371-5.
98. Sterrett JD, Murphy HJ. Citric acid burnishing of dentinal root surfaces. A scanning electron microscopy report. *J Clin Periodontol.* 1989; 16: 98-104.
99. Theodoro LH. Ação do laser de Er:YAG e de diodo na adesão de elementos sanguíneos e na morfologia de superfície radicular irradiadas. Estudo através de microscopia eletrônica de varredura. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2003.
100. Theodoro LH, Sampaio JE, Haypek P, Bachmann L, Zezell DM, Garcia VG. Effect of Er:YAG and Diode lasers on the adhesion of blood components and on the morphology of irradiated root surfaces. *J Periodontal Res.* 2006; 41: 381-90.
101. Trenter SC, Landini G, Walmsley AD. Effect of loading on the vibration characteristics of thin magnetostrictive ultrasonic scaler inserts. *J Periodontol.* 2003; 74: 1308-15.
102. Van Volkinburg JW, Green E, Armitage GC. The nature of root surfaces after curette, cavitron and alpha-sonic instrumentation. *J Periodontal Res.* 1976; 11: 374-81.
103. Walmsley AD, Laird WR, Lumley PJ. Ultrasound in dentistry. Part 2- -Periodontology and endodontics. *J Dent.* 1992; 20: 11-7.

104. Wen CR, Caffesse RG, Morrison EC, Nasjleti CE, Parikh UK. In vitro effects of citric acid application techniques on dentin surfaces. *J Periodontol.* 1992; 63: 883-9.
105. Wikesjo UM, Claffey N, Egelberg J. Periodontal repair in dogs. Effect of heparin treatment of the root surface. *J Clin Periodontol.* 1991; 18: 60-4.
106. Wikesjo UM, Nilveus RE, Selvig KA. Significance of early healing events on periodontal repair: a review. *J Periodontol.* 1992; 63: 158-65.
107. Wikesjo UM, Selvig KA. Periodontal wound healing and regeneration. *Periodontol 2000.* 1999; 19: 21-39.
108. Wolff L, Dahlen G, Aeppli D. Bacteria as risk markers for periodontitis. *J Periodontol.* 1994; 65: 498-510.
109. Ximenez-Fyvie LA, Haffajee AD, Som S, Thompson M, Torresyap G, Socransky SS. The effect of repeated professional supragingival plaque removal on the composition of the supra- and subgingival microbiota. *J Clin Periodontol.* 2000; 27: 637-47.
110. Yukna RA, Scott JB, Aichelmann-Reidy ME, LeBlanc DM, Mayer ET. Clinical evaluation of the speed and effectiveness of subgingival calculus removal on single-rooted teeth with diamond-coated ultrasonic tips. *J Periodontol.* 1997; 68: 436-42.

# ANEXO 1

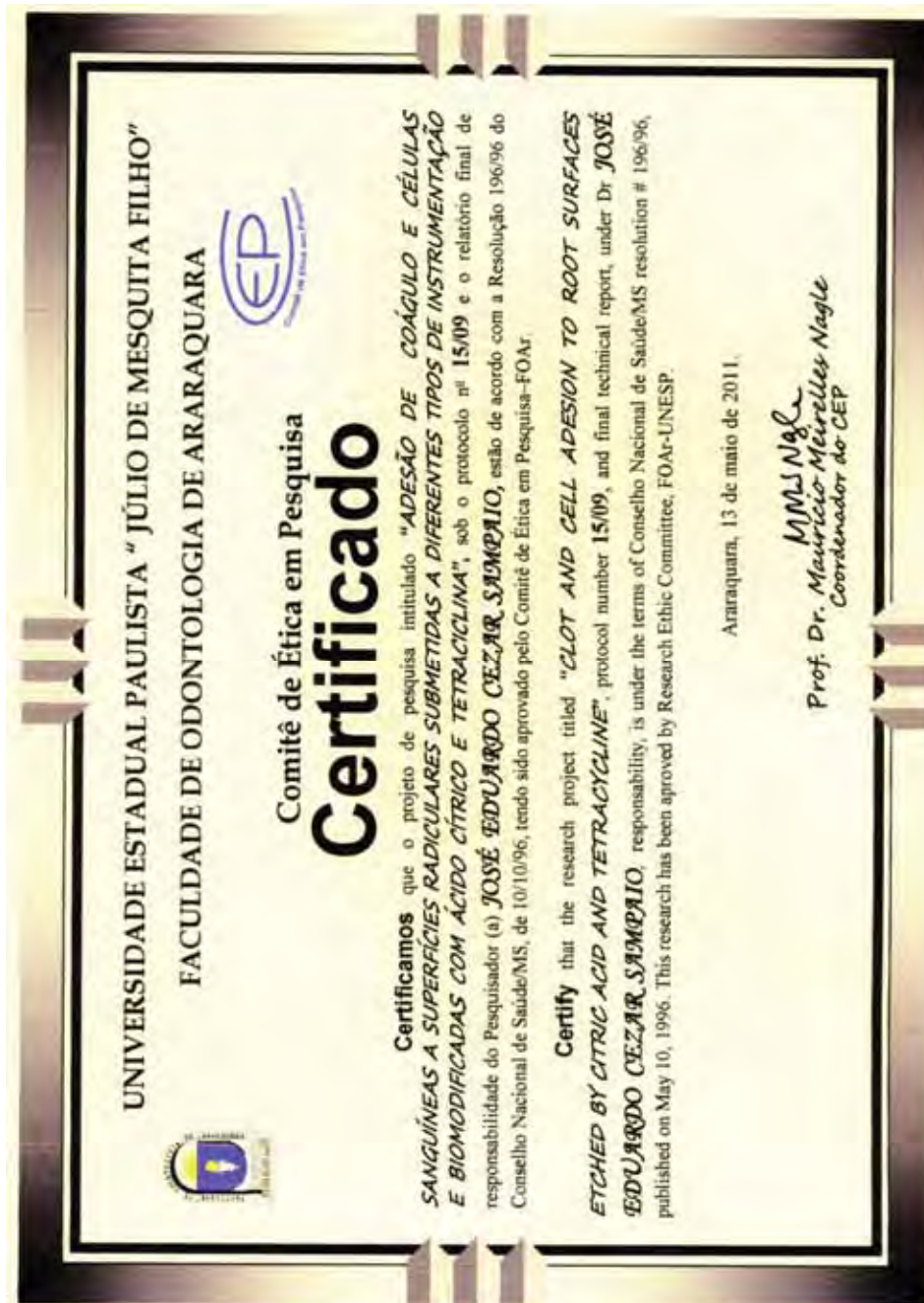
Certificado emitido pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP (Protocolo CEP-FO/CAr nº 31/06).

	<p>UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA</p>
	
	<p>Comitê de Ética em Pesquisa</p>
	<h2>Certificado</h2>
	<p><b>Certificamos</b> que o projeto de pesquisa intitulado "AVALIAÇÃO IN VITRO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES, TEMPOS E MODOS DE APLICAÇÃO DO ÁCIDO CÍTRICO NA BIOMODIFICAÇÃO RADICULAR. ANÁLISE POR MEIO DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA", sob o protocolo nº 31/06, de responsabilidade do Pesquisador (a) JOSÉ EDUARDO CEZAR SAMPAIO, está de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS, de 10/10/96, tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa-FOAr, com validade de 01 (um) ano, quando será avaliado o relatório final da pesquisa.</p>
	<p><b>Certify</b> that the research project titled "IN VITRO EVALUATION OF ROOT SURFACE BIOMODIFICATION BY MEANS OF CITRIC ACID DIFFERENT CONCENTRATIONS, MODES AND APPLICATION TIMES. A SEM EVALUATION", protocol number 31/06, under Dr JOSÉ EDUARDO CEZAR SAMPAIO, responsibility, is under the terms of Conselho Nacional de Saúde/MS resolution # 196/96, published on May 10, 1996. This research has been approved by Research Ethic Committee, FOAr-UNESP. Approval is granted for 01 (one) year when the final review of this study will occur. Araraquara, 22 de setembro de 2006.</p>
	<p>Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Mirian Aparecida Onofre Coordenadora</p>



## Anexo 2

Certificado emitido pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP (Protocolo CEP-FO/CAr nº 15/09).



## *Anexo 3*



### CÂMPUS DE ARARAQUARA FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Pesquisa: **Adesão de coágulo e células sangüíneas a superfícies radiculares submetidas a diferentes tipos de instrumentações e biomodificadas com ácido cítrico e tetraciclina**

Pesquisador responsável: José Eduardo Cezar Sampaio

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Por esse instrumento particular, declaro, para os devidos fins éticos e legais, que eu (nome) \_\_\_\_\_, (nacionalidade) \_\_\_\_\_, (profissão) \_\_\_\_\_, portador do R.G. \_\_\_\_\_, C.I.C. \_\_\_\_\_, residente à Rua/ Av. \_\_\_\_\_, na cidade de \_\_\_\_\_, Estado de \_\_\_\_\_, concordo em participar da pesquisa intitulada: “Adesão de coágulo e células sangüíneas a superfícies radiculares submetidas a diferentes tipos de instrumentações e biomodificadas com ácido cítrico e tetraciclina”. Declaro ter sido esclarecido sobre os seguintes pontos:

1. O trabalho a ser realizado tem caráter científico, tendo por finalidade de avaliar adesão de células do meu sangue sobre a raiz dental, submetida a diferentes tratamentos.
2. Ao participar desse trabalho, estarei contribuindo para a tentativa de melhorar a recuperação do tecido gengival e sua saúde nos vários procedimentos clínicos odontológicos. Minha contribuição será por meio da doação de 5mL de tecido sangüíneo em cada uma das 8 coletas
3. Doarei o que exceder desses 5mL de tecido sangüíneo a serem retirados, após a realização dos exames laboratoriais, sendo estes hemograma e coagulograma,

para aplicação sobre as amostras dentais. Tenho ciência que todo o material excedente será descartado adequadamente e de forma alguma armazenado.

4. Tenho ciência de que os resultados desses exames citados no item 3, poderão ser divulgados quando da publicação deste trabalho, mas tenho garantida a preservação da minha identidade.
5. Todo o procedimento poderá ser documentado por meio fotográfico, desde que não haja meios para identificar-me.
6. Minha preocupação como voluntário deverá se restringir apenas à utilização deste material.
7. Tenho ciência de que a coleta do sangue será realizada por pessoal capacitado, sob supervisão de uma enfermeira padrão para evitar e minimizar riscos e danos previamente esclarecidos. Tenho ciência, também, que todo o procedimento segue normas de biossegurança (utilização de paramentação – luvas, máscara e gorro – pela pessoa que fará a coleta do sangue; utilização de seringas e agulhas estéreis e descartáveis; anti-sepsia da pele antes da coleta de acordo com o protocolo para coleta de sangue do Laboratório de Hematologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP (FCFAr).
8. Os materiais utilizados para a coleta serão todos descartáveis.
9. Não terei nenhuma despesa ao participar desse estudo.
10. Meu nome será mantido em sigilo, assegurando assim minha privacidade e se desejar, deverei ser informado sobre os resultados dessa pesquisa.
11. Qualquer pergunta ou novidade sobre os procedimentos a serem realizados ou em relação à pesquisa, que surgirem durante o período experimental, serão esclarecidos e respondidos a mim, mesmo que isso implique em desistência.
12. Além disso, tenho ciência de que posso me retirar da pesquisa a qualquer momento, sem sofrer nenhum prejuízo ou causar dano à pesquisa em andamento, aos pesquisadores ou a qualquer tratamento a ser realizado posteriormente nesta faculdade.
13. Tomei conhecimento de que o procedimento para coleta de sangue não gera qualquer dano físico ou financeiro, principalmente em quantidades inferiores a 100mL, não havendo a necessidade de ser indenizado por parte da equipe responsável ou pela instituição (FOAr/UNESP).

14. Em caso de problemas ou dúvidas devo procurar o pesquisador Prof. Dr. José Eduardo Cezar Sampaio no telefone (016) 3301-6374. O pesquisador responsável e o responsável pelo Laboratório de Hematologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de UNESP (FCFar) me garantem total assistência na ocorrência de qualquer acidente.
15. E em caso de reclamações, recursos ou notificação de anormalidade que não possa ser resolvida pelos pesquisadores, deverei entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Odontologia, Campus de Araraquara – UNESP, pelos telefones (016) 3301-6432 ou (016) 3301-6434..

Desta forma, uma vez tendo lido e entendido tais esclarecimentos e, por estar de pleno acordo com o que está escrito acima, dato e assino esse Termo de Consentimento.

Araraquara, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 200\_.

---

Assinatura do Paciente

---

Assinatura do Pesquisador Responsável

Autorizo a reprodução deste trabalho.  
(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 22 de março de 2012.

**RODRIGO CAVASSIM**