



Amanda Caselato Andolfatto Souza

Dissertação

Eficácia de um dispositivo mecânico
de agitação da irrigação na redução
bacteriana após instrumentação
endodôntica

Araçatuba
2018

Amanda Caselato Andolfatto Souza

Eficácia de um dispositivo mecânico
de agitação da irrigação na redução
bacteriana após instrumentação
endodôntica

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da
Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho",
Campus de Araçatuba, para obtenção do título de Mestre em
Ciência Odontológica, área de concentração Endodontia.

Orientador: Prof. Assoc. Rogério de Castilho Jacinto

Araçatuba
2018

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

S729e Souza, Amanda Caselato Andolfatto.
Eficácia de um dispositivo mecânico de agitação da irrigação na redução bacteriana após instrumentação endodôntica / Amanda Caselato Andolfatto Souza. - Araçatuba, 2018
11 f. : il. ; tab.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientador: Prof. Rogério de Castilho Jacinto

1. Endodontia 2. Tratamento do canal radicular 3. Ácido edético I. Título

Black D24
CDD 617.67

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, **Sirlene de Fátima Caselato Souza e Antônio Roberto Andolfatto de Souza**. As pessoas que mais amo e que são tão importantes em minha vida.

Muito obrigada pela família que formaram com tanto amor, carinho, dedicação, educação, respeito e alegria!!!! E por transmitirem isso a mim e ao meu irmão! Isto é, com toda certeza, fundamental para formação do nosso caráter. Obrigada por todos os bons exemplos sempre transmitidos a nós, como generosidade, amor ao próximo e humildade. Obrigada por serem a minha base!

Me sinto privilegiada diante de tanto amor, conforto e acolhimento! E por ter tido uma infância, a melhor fase da minha vida, tão alegre!! Obrigada por sempre estarem ao meu lado em todos os momentos! E por nunca desistirem de mim!!

Obrigada por me incentivarem a seguir meus sonhos e batalhar junto comigo para que eles se tornem realidade. Obrigada por, na maioria das vezes, passarem por cima de suas vontades para que as minhas sejam feitas!

Sou eternamente grata por me ensinarem que sem a perseverança não há nada que possamos conseguir e sem ela não chegaremos a lugar algum.

Obrigada por serem tão humanos, atenciosos e amorosos comigo!

Poderia tentar explicar o amor que sinto por vocês com palavras, mas estas são pequenas perto do meu sentimento!

A conquista desse trabalho é nossa, pois vocês me apoiaram e proporcionaram todo suporte necessário para realização deste. Muito obrigada por tudo!! Amo vocês incondicionalmente!! Peço desculpas pelas minhas falhas e pelas noites mal dormidas.

**“...O que está escrito em mim
Comigo ficará guardado
Se lhe dá prazer
A vida segue sempre em frente
O que se há de fazer...”**
*O Caderno
Toquinho*

Agradecimientos

Agradecimentos especiais

A **Deus**, primeiramente, por toda sua majestade e misericórdia!! Muito obrigada Senhor, por me conceber com toda Sua graça. Obrigada por me proporcionar a família em que nasci, o ambiente em que vivo e as pessoas da minha vida. É sempre para meu crescimento e para o meu melhor. Obrigada pela vida abençoada. Obrigada por todo discernimento, felicidade e luz no meu caminho! Sou eternamente grata pela Sua companhia!

**“... Em tempos de guerra
Nunca pare de lutar
Não baixe a guarda,
Nunca pare de lutar...”**

*Pde. Fábio de Melo
Nunca Pare de Sonhar*

Ao meu irmão, **Vitor Hugo Caselato Andolfatto Souza**, pela companhia, pela força, pelos momentos felizes e pelo seu jeito de ser. Você me ensina tanto, Vitinho, mesmo que sem querer, a levar a vida de uma maneira mais leve (ainda tenho muito o que aprender). Obrigada por ser um dos meus alicerces. Muito obrigada por ter me escolhido como irmã, eu te amo incondicionalmente!! Conte comigo para o que você precisar, maninho!

Aos meus tios, **Marina Aparecida Colaferro e José Roberto de Souza Andolfatto**, por me acolherem em sua residência como uma verdadeira filha, por tamanho zelo e proteção desde a época da especialização que se iniciou em 2014, aliás por sempre receber a mim e minha família em vossa casa. Muito obrigada por serem tão atenciosos comigo. O amor que sinto por vocês é imensurável! Contem sempre comigo. Obrigada por não me deixarem cair nos momentos de dificuldade durante esse tempo, quando meus pais estavam em São José do Rio Preto, e por toda ajuda e carinho!!! Essa homenagem se estende à minha prima **Camila Colaferro**, que durante esse tempo foi

essencial nas conversas durante o almoço, nos conselhos e nas risadas. Muito obrigada, Mi, pela sua presença em minha vida!!

Ao meu namorado, **Vitor Kazuo Shimada**, por toda sua atenção e cuidado para com minha pessoa. Você é muito especial e querido. Obrigada pela sua disponibilidade, por tratar bem a minha família, por ser tão prestativo nos eventos familiares e pela sua bondade. Você chegou de repente e foi tão bom para mim. Amo muito você!!

À minha cunhada, **Eduarda Sayeg Corbucci**, pela delicadeza, pela educação, pelas conversas e pela sua paciência! Obrigada por estar ao lado do meu irmão, fazê-lo feliz e amado. Por ajuda-lo tanto! Amo você!!

À minha família **Caselato** e à **Andolfatto**, por apoiarem meus sonhos, por estarem sempre presentes, por me fazerem rir mesmo em tempos de agonia, por me ensinarem a ver a beleza da vida. Muito obrigada pelas orações, pelo tempo e pelo amor dedicado a mim!! A cada um de vocês o meu muito obrigada!!!

À grande amiga **Carina dos Santos Souza**, pelo seu jeito sossegado e amigo de ser! Muito obrigada por deixar meus dias mais leves, com nossas conversas, com aquele conselho depois de um longo dia estressante durante os nossos treinos na academia. Obrigada por permitir que eu entrasse na sua casa e na sua vida para conhecer o seu filhinho tão alegre, Nick!!! Amo você!

Às minhas **amigas de ouro**, aquelas de longa data, e que estarão presentes em mim por toda vida: **Marcela Monne de Oliveira, Ana Luísa Vita Ricci, Giovanna Gomes Diniz, Cássia Sanches Guimarães, Ellen Del Maschio Mallagoli**, meninas, não imagino uma vida sem vocês...quantos momentos marcantes, dramáticos, cenas inusitadas, engraçadas, momentos difíceis...quantas ocasiões especiais...difícil mensurar!!!! Aprendemos tantas coisas juntas no decorrer de todos esses anos, seja em viagens ou nas conversas no sofá da casa da Ana ou nos nossos finais de semana lá no sítio...cada uma com seu jeito de ser e com seu mundinho paralelo, mas sempre apoiando a outra. Sempre que penso em vocês, lembro-me das risadas...muito obrigada por estarem ao meu lado, por inúmeros momentos alegres e por apoiarem meus sonhos!!! Sou

eternamente grata pela oportunidade de ter vocês em minha vida desde sempre. Amo vocês incondicionalmente!!!

À minha amiga **Thaís Merlo Cavazzanna**, por ter feito meu processo de coaching, por me ajudar a me conhecer melhor e chegar mais perto daquilo que eu queria para a minha profissão!! Sou eternamente grata pela nossa convivência na escola, pelos estudos de matemática e pelo tempo que passamos juntas! Amo você, Thai!!

À tia **Mônica Monne de Oliveira**, por fazer papel de mãe, às vezes, por me incluir em sua família, por me dar tanto carinho e cuidado. Por me proporcionar tantos momentos especiais e marcantes na infância e na adolescência. Por me incentivar a buscar um futuro melhor, por ser uma tia psicóloga e, principalmente, por me incentivar a estar onde estou hoje!! Amo você!!

Agradecimentos aos amigos da pós-graduação

À minha grande amiga, **Camila Ambrósio Dias Machado**, sem a qual a realização deste trabalho não seria possível. Você foi fundamental nessa etapa da minha vida, Camis, nunca me esquecerei de você, de toda sua ajuda, da sua presença e das nossas risadas!!! Obrigada por me mostrar esse jeito delicado e otimista de ver o mundo! Admiro muito você pela sua capacidade, pelo otimismo e pela sua força. Tenho muito orgulho da nossa trajetória, Camis, de tudo que corremos atrás, das nossas conversas escondidas no laboratório de microbiologia quando ninguém além de nós podia resolver o problema. E, claro, nunca me esquecerei de todo suporte que você me deu quando as coisas pareciam impossíveis de serem solucionadas, sua calma sempre me surpreendia!! Amo você!

À minha grande amiga **Mariane Maffei Azuma**, por se mostrar tão disposta a ajudar a mim e a quem precisasse desde a especialização, por ser tão brilhante em seus trabalhos, tão inteligente e dedicada!! Obrigada por estar presente em grandes decisões dessa etapa da minha vida mesmo com a distância. Obrigada por me apresentar à outra grande amiga **Carolina Cardoso de Moraes Barros**, que desde seu primeiro dia de pós-graduanda convive comigo. Obrigada, Carol, por esse seu jeitinho meigo e prestativo!!

Obrigada pelas comilanças, pelo suporte, por estar presente e pelas conversas! Amo vocês!!!

Às minhas grandes amigas da pós-graduação que quero levar para o resto da vida **Vanessa Abreu Sanches Marques e Letícia Citelli Conti**, mesmo não compartilhando o dia-a-dia de laboratório, atualmente, eu as considero demais!! Vocês participaram de um momento muito especial da minha vida, o começo dessa etapa. Ensinar-me a mexer em plataforma Lattes, me ajudaram com os slides dos primeiros seminários, me orientaram com algumas questões de pós-graduação, sempre me incentivando a seguir em frente, vocês foram sempre muito prestativas comigo!! Obrigada, meninas, por serem tão parceiras, por compartilhar momentos que jamais esquecerei, congressos, viagens e comilanças. Muito obrigada **Van**, por ser amiga, por ter esse coração gigante e por me acolher amorosamente em sua vida!! Muito obrigada **Lê**, por ser essa amiga doce, por se preocupar comigo e me ajudar tanto, por me acolher tão bem em sua casa!!! Amo muito vocês!!

À amiga **Francine Benetti**, muito obrigada **Fran**, por toda essa sua generosidade e humildade, por ajudar não só a mim, mas a todos no departamento!! Obrigada por todo suporte nos seminários e no departamento!! Amo você!!!

Ao meu amigo **Carlos Roberto Emerenciano Bueno**, pelo bom humor que contagia o departamento, pelos conhecimentos transmitidos, pelas inúmeras vezes que me ajudou com artigos, periódicos, dúvidas clínicas, pelo incentivo à pesquisa e pela amizade!!

Ao meu amigo **Leopoldo Cosme Damião**, por me ouvir nos meus momentos de desespero e por transmitir suas palavras de conforto e incentivo!! Admiro você pela sua perseverança e capacidade!!!

Ao meu amigo **Renan Dal Fabro**, por todo seu conhecimento de tecnologia e pelos conhecimentos transmitidos, pelos momentos divertidos e pela sua amizade!! Obrigada pela sua presença nas disciplinas do mestrado e nos congressos da vida!!

Aos meus amigos de departamento e de pós-graduação **Pedro Henrique Chaves**, pelas nossas imitações engraçadas e risadas no departamento. **Caroline Loureiro**, por me ajudar com a realização das coletas da pesquisa quando a Camilinha não pôde participar. Obrigada pela sua disponibilidade. **Lariana Camargo, Cristiane Cantiga, Jimena Lama Sarmiento, Juliana Trizzi** pelo acolhimento e entretenimento. **Thamires Cavazanna**, por compartilhar comigo as disciplinas durante o primeiro ano de mestrado e os momentos descontraídos no departamento de pediatria. **Hiskell Fernandes**, pelo seu jeito espontâneo e descontraído de ser. **Karina Caiaffa, Marjorie Gallinari, João Rafael Amadeu**, pelos momentos agradáveis e descontraídos no departamento e por tantos conhecimentos transmitidos.

Agradecimento aos professores

Ao meu orientador **Prof. Associado Rogério de Castilho Jacinto**, por ter aceitado me orientar no mestrado realizando assim meu sonho de fazer pós-graduação strictu sensu. Por ampliar minha visão para a pesquisa e para a vida acadêmica, a qual é maravilhosa, porém muito árdua. Pelos ensinamentos transmitidos. Agradeço pelas broncas, pois com elas tive a oportunidade de crescer e aprender. Agradeço muito sua paciência!! Tenho muita admiração pela sua inteligência e competência!! Peço desculpas pelos meus erros, pela minha ansiedade, que por muitas vezes me impede de ver os pequenos detalhes das coisas, pela falta de experiência e pelas minhas limitações! Muito obrigada por esse tempo de orientação!!

Ao **Prof. Titular João Eduardo Gomes Filho**, por me mostrar seu lado humano desde o dia em que te conheci no escritório da tia Marina, no qual ajudou sem pretensão alguma uma recém-formada a encontrar o caminho a seguir na profissão. Pela sua bondade naquele dia e nos dias de convivência no departamento, nos quais é sempre muito atencioso. Agradeço pelo constante incentivo para o estudo dos casos na clínica da especialização e para a vida docente. Tenho muita admiração pelo profissional paciente que és!! Muito obrigada professor!!

Ao **Prof. Marcos Sérgio Endo**, que aceitou fazer parte da minha banca examinadora na defesa de dissertação de mestrado tão prontamente. Muito obrigada

professor! Apesar de não o conhecer pessoalmente, tenho ótimas recomendações da sua pessoa e admiro seu trabalho!

Ao **Prof. Eloi Dezan Junior**, por ter participado como membro efetivo da minha banca examinadora no exame geral de qualificação, por suas sugestões, por sua atenção, pelos conhecimentos transmitidos tanto na docência como na clínica!! Aprendo muito com o senhor!

Ao **Prof. Douglas Monteiro**, que aceitou prontamente o convite para participar da minha banca examinadora no exame geral de qualificação e por todas suas sugestões no dia do exame. Muito obrigada professor!!

Ao **Prof. Luciano Tavares Ângelo Cintra**, por ser exemplo de professor e pesquisador. Obrigada por nos mostrar sua excelente didática e os mínimos detalhes com que se monta uma aula. Tenho uma grande admiração pela sua pessoa, professor, além da sua eficiência para solucionar e lidar com várias coisas ao mesmo tempo. Obrigada por permitir que eu e os demais alunos da pós entrássemos em sua casa junto à sua família para compartilhar de bons momentos de descontração!

Ao **Prof. Gustavo Sivieri de Araújo**, por todas suas dicas nos seminários, pela sua atenção e pela sua presença para todos do departamento. Admiro sua perseverança.

À **Profa. Cristiane Duque**, por ter sido tão acessível, por se mostrar disposta a ajudar em qualquer ocasião, por ter aceitado me orientar no doutorado. Admiro a maneira como trata seus alunos e o exemplo de professora que sempre mostrou ser.

Ao **Prof. Paulo Tobias**, que aceitou prontamente o convite de ser suplente da minha banca examinadora na defesa da dissertação e por suas sugestões no departamento.

A todos os **Professores da Pós-Graduação** pelos ensinamentos transmitidos nas disciplinas da pós-graduação. Vocês contribuíram muito para meu crescimento, agradeço por me ajudarem a chegar até aqui. Foi uma honra ter a oportunidade de conhecê-los. Meus sinceros agradecimentos!

A todos os **professores** que fizeram parte da minha formação!!

Agradecimento aos Funcionários

Aos **Funcionários da FOA-UNESP**, por serem acolhedores, por desejarem bom-dia, até amanhã, bom trabalho. Agradeço pelo cafezinho e as bolachinhas no departamento. Pelos momentos de descontração pelas risadas. Por sempre se disporem a nos ajudar, muito obrigada **Nelci, Peterson, João Rafael, Elaine e Carlos**. Aos vigilantes, **Márcio e Willian**, por cuidar da instituição com tanta responsabilidade. As funcionárias da seção de pós-graduação, **Cris, Lilian e Valéria**, por trabalharem para que toda a burocracia seja executada corretamente, pela paciência de sempre esclarecendo todas as minhas dúvidas e pelos e-mails informando o que era importante. Obrigada!

À **Faculdade de Odontologia de Araçatuba FOA UNESP**, na pessoa do **Prof. Titular Wilson Roberto Poe** e ao **Programa de Pós-graduação Em Ciência Odontológica**, obrigada pela oportunidade e pela estrutura a mim fornecidas.

Aos pacientes

Agradeço a todos os pacientes que aceitaram participar da pesquisa.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Capes

Agradeço por me concederem recursos fundamentais para minha manutenção na pós-graduação e para a finalização do mestrado.

Epígrafe

“ A persistência é o caminho do êxito. ”

Charles Chaplin

Souza, ACA. Eficácia de um dispositivo mecânico de agitação da irrigação na redução bacteriana após instrumentação endodôntica. 2018. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2018.

Resumo

O objetivo do presente estudo foi avaliar a efetividade na redução bacteriana de um protocolo de irrigação final de canais radiculares com infecção primária utilizando o sistema Easy Clean. Vinte e quatro canais radiculares com infecções endodônticas primárias crônicas foram analisados. As amostras foram coletadas com 3 pontas de papel estéreis em meio de transporte microbiológico antes da instrumentação (S1), após instrumentação rotatória com dois sistemas diferentes (S2), e após o protocolo final de irrigação utilizando o Easy Clean para agitação das soluções de irrigação (S3). Técnica de cultura foi utilizada para determinar a contagem de unidades formadoras de colônia (UFC/mL). Os resultados foram analisados estatisticamente pelo teste Mann-Whitney ao nível de significância de 5% para comparação entre as variáveis. Bactérias foram detectadas em 100% dos casos analisados, mostrando em S1 uma média de $2,0 \times 10^6$ UFC/mL, em S2 $2,3 \times 10^4$ UFC/mL e em S3 $6,6 \times 10^3$ UFC/mL. Em conclusão, embora não tenha sido estatisticamente significativa, houve uma redução no número de bactérias após o uso da Easy Clean. Portanto, pode-se sugerir que o protocolo final de irrigação com o auxílio do Easy Clean auxilia na redução de bactérias.

Palavras-chave: Endodontia, Tratamento do Canal Radicular, EDTA, Easy Clean.

Souza, ACA. Efficacy of a Mechanical Irrigant Agitating Device in bacterial reduction after endodontic instrumentation. 2018. Dissertação (Mestrado). – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2018.

Abstract

The objective of the present study was to evaluate the effectiveness in the bacterial reduction of a final irrigation protocol of root canals with primary infection using the Easy Clean system. Twenty-four root canals with chronic primary infection were analyzed. Samples were collected with 3 sterile paper points in microbiological transport medium before instrumentation (S1), after rotary instrumentation with two different systems (S2), and after the final irrigation protocol using the Easy Clean system for agitation irrigating solutions (S3). Culture technique was used to determine the count of colony forming units (CFU/mL). The results were statistically analyzed by the Mann-Whitney test at a significance level of 5% for comparison among the variables. Bacteria were detected in 100% of analyzed cases, showing in S1 a mean of 2.0×10^6 CFU/mL, in S2 2.3×10^4 CFU/mL, and in S3 6.6×10^3 CFU/mL. Statistically significant differences were found between the rotary systems Protaper Next and HyFlex CM in the reduction of the bacterial load, but not in the analysis before and after Easy Clean. In conclusion, although not statistically significant, there was a reduction in the number of bacteria after using Easy Clean. Therefore, it could be suggested that the final irrigation protocol with the aid Easy Clean assists in the reduction of bacteria.

Keywords: endodontics, root canal infection, EDTA, Easy Clean.

Lista de Figuras

Figure 1 –Percentage of the media of cultivable bacteria reduction found in primarily infected root canals before and after Easy Clean in different rotary systems of chemomechanical preparation of root canals.

Lista de Tabelas

Table 1 - Mean and standard deviation of cultivable bacteria (CFU/mL) on initial (S1), before Easy Clean (S2), and after Easy Clean (S3) samples.

Sumário

1. Abstract	01
2. Introduction	02
3. Methodology	03
4. Results	06
5. Discussion	06
6. Acknowledgments	08
7. References	08

Efficacy of a Mechanical Irrigant Agitating Device in bacterial reduction after endodontic instrumentation

Abstract

The objective of the present study was to evaluate the effectiveness in the bacterial reduction of a final irrigation protocol of root canals with primary infection using the Easy Clean system. Twenty-four root canals with chronic primary infection were analyzed. Samples were collected with 3 sterile paper points in microbiological transport medium before instrumentation (S1), after rotary instrumentation with two different systems (S2), and after the final irrigation protocol using the Easy Clean system for agitation irrigating solutions (S3). Culture techniques were used to determine the count of colony forming units (CFU/mL). The results were statistically analyzed by the Mann-Whitney test at a significance level of 5% for comparison among variables. Bacteria were detected in 100% of analyzed cases, showing in S1 a mean of 2.0×10^6 CFU/mL, in S2 2.3×10^4 CFU/mL, and in S3 6.6×10^3 CFU/mL. Statistically significant differences were found between the rotary systems Protaper Next and HyFlex CM in the reduction of the bacterial load, but not in the analysis before and after Easy Clean. In conclusion, although not statistically significant, there was a reduction in the number of bacteria after using Easy Clean. Therefore, it could be suggested that the final irrigation protocol with the aid Easy Clean assists in the reduction of bacteria.

Keywords: endodontics, root canal infection, EDTA, Easy Clean.

Introduction

Bacteria are the main etiological factor of pulp infection and apical periodontitis development ⁽¹⁾. In order to treat root canal infections, mechanical instrumentation alone is not totally effective for removing bacterial biofilm and reducing the presence of bacteria in the root canals ^(2, 3). Therefore, for a more effective cleaning of the root canal chemical agents are necessary to improve the action of mechanical instrumentation ⁽⁴⁾. Irrigation of the root canals aims the disinfection, lubrication and cleaning, thus eliminating tissue debris formed by the cutting action of instruments on dentine, and neutralizing bacteria and their products^(5, 6).

The most widely chemical substance used to promote disinfection of root canals is sodium hypochlorite (NaOCl) ⁽⁷⁾. Studies have shown that to disinfect anatomical complexity of the root canals an agitation of the irrigation solution is necessary ^(8, 9). Moreover, the association between NaOCl and Ethylenediaminetetraacetic Acid (EDTA) has been used to improve the cleaning of root canal walls and provide the penetration of antimicrobial substances into the dentinal tubules and root canal ramifications, since it is a chelating agent that promotes smear layer removal of dentine walls ⁽¹⁰⁾.

Regardless of the instrumentation techniques; instruments; or chemical substances used; chemomechanical procedures are insufficient for complete disinfection of root canals, since the anatomical complexity such as lateral canals, apical ramifications, tissue remnants, isthmuses and other areas are normally untouched by endodontic instruments ⁽¹¹⁾. Therefore, some techniques have been suggested to improve the action of endodontic irrigants. The most widely used and evaluated techniques of irrigation are passive or continuous ultrasonic irrigation ⁽¹²⁻¹⁴⁾. Techniques that promote ultrasonic activation of irrigating solutions are used to remove the smear layer from the apical region and improve the penetration of the solutions ^(9, 15-17). However, these techniques require specific ultrasonic device and tips, which might enhance the cost of the treatment.

Easy Clean (Easy Dental Equipment, Belo Horizonte, MG, Brazil), is a plastic rotary endodontic instrument with an active part presenting “aircraft wing” shape, with a 25/04 tip. It can be used either in reciprocating motion, which has shown good results in cleaning the mesial canal walls on mandibular molars with root curvature ⁽¹⁴⁾, and also in rotary motion. When Easy Clean is used in continuous rotation, it is as effective as passive ultrasonic irrigation for the removal of dentine debris from canal walls ⁽¹³⁾. Nevertheless,

there is no report in the literature clinically evaluating the bacterial load reduction after using Easy Clean.

Therefore, the present clinical study was conducted to evaluate the efficacy of agitation in final irrigation protocol with the use of Easy Clean in the reduction bacterial culture from infected root canals after instrumentation with two of different rotary systems. The null hypothesis is that there is no difference in bacterial load reduction before and after use of Easy Clean.

Methodology

Selection of patients

The study was approved by the Research Ethics Committee of Araçatuba School of Dentistry- UNESP, under the protocol number 1.768.156. A total of twenty-four patients presenting primary endodontic infections were included in the study. From each patient, only posterior teeth with primary endodontic infections, absence of spontaneous pain, presence of apical lesion seen on radiographic examination, absence of periodontal pocket with depth greater than 4 mm, and possibility of total isolation with rubber dam, and intact pulp chamber walls were included.

Patients were selected regardless of age, color, gender, social class or social groups. Well-detailed anamnesis was performed containing oral and dental history and each patient consented to participate in the study through a free informed consent. The diagnosis of pulpal necrosis was confirmed by a negative response to the cold test. Patients who received antibiotic treatment in the last three months or who had systematic diseases were not included in the study.

Clinical protocol and sample collection

The method used for disinfection of the operative field followed protocol previously described in the literature^(18, 19). Concisely, the teeth were cleaned and isolated with rubber dam. The dental crown and surrounding structures were disinfected with 30% H₂O₂ (volume/volume [V/V] for 30 s.), followed by 2.5% sodium hypochlorite (NaOCl) for the same period, and then inactivated with 5% sodium thiosulfate. The decontamination of the other surfaces of the crown was verified by collecting a smear sample from the surface of the crown to be plated on a blood plate, which was incubated

both aerobically and anaerobically for the verification of microbial growth. Any of these samples presented positive results.

A two-stage access cavity preparation was made without the use of water spray but under manual irrigation with sterile saline solution and using high-speed diamond burs. In the first stage, major contaminants were removed. In the second stage, before entering the pulp chamber, the access cavity was disinfected according to the previously described protocol and new burs were used for pulp chamber access. The sterility of the internal surface of the access cavity was checked as previously described.

The second step was entering the pulp chamber, according to the protocol described above. When the pulp chamber was reached and exposed, the first collection (S1) was performed with three paper points, which were stored on Eppendorf containing VMGA III (Viability Medium Goteborg Agar III). Each paper point was consecutively introduced into the full length of the canal determined radiographically, which stayed in this position for one minute; if the canal was dry, the paper point was moistened with sterile saline solution to ensure sample acquisition.

Next, the files were adapted to an electric motor (VDW Silver; VDW), the cervical and middle thirds were decontaminated with the files of one of the rotary system randomly assigned (Pro Taper Next or HyFlex CM), using the pecking motion and introduced into the full length less 04 mm. Then, electronic odontometer (root ZX mini, J Morita) was performed with the file 15 K or 20 K according with the diameter of the root canal. The complete instrumentation of the canal was performed according to the manufacture using pecking motion with one of the automated systems Pro Taper Next: X1(17/04), X2(25/06), X3(30/07) (n=12), or HyFlex CM: 25/08, 20/04, 25/04, 20/06, 30/04, 40/04 (n=12). During the instrumentation, root canals were filled with 1 mL of 2.5% sodium hypochlorite using a syringe (30-gauge needle) before the use of each instrument ⁽²⁰⁾.

Then, the solution in the root canal was inactivated with 5% sodium thiosulfate. After instrumentation, the second sample (S2) was collected with three paper points, which were introduced into the working length determined by the electronic apex locator. The final irrigation protocol was performed after S2 collection, which was adapted from Alves et al. 2012 ⁽⁵⁾ as follows: 2 mL of 2.5% NaOCl, agitated with Easy Clean for 20 seconds, 1 mL of EDTA, agitated for 20 seconds and 2 mL of 2.5% NaOCl followed by agitation for 20 seconds. The protocol used the easy clean in low rotation (20,000 rpm), and was introduced in the working length determined by the electronic apex

locator. There was no instrument fracture during the final irrigation protocol. After the final cleaning protocol the root canal was inactivated with 5% sodium thiosulfate. Then, S3 samples was collected with three paper points at the working length and transferred to an Eppendorf containing VMGA following the same protocol mentioned above.

After the samples collection all cases received intracanal medication and temporary restoration. When the endodontic procedure was finished, all samples were transported to the microbiology laboratory and analyzed as described below.

All teeth included in the study had the endodontic treatment completed after a period of 14 to 21 days. All teeth were restored with composite resin.

Determination of bacterial culture count

The method used for culture procedures in the study had been previously reported by Martinho 2014 ⁽²¹⁾. The samples were processed after 2 to 3 hours of collections. Concisely, the transport media containing the root canal samples were agitated for 60 seconds (Vortex; Marconi, Piracicaba, São Paulo, Brazil). Serial 10-fold dilutions were made up to 10^{-4} in tubes containing Brain Heart Infusion (BHI) broth (BHI; DifcoLaboratories Inc., Detroit, USA). Fifty microliters of the serial dilutions were plated onto 5% defibrinated sheep blood fastidious anaerobe BHI agar which was supplemented with 5 mg L^{-1} hemin and 1 mg L^{-1} menadione. The plates were incubated at 37°C in anaerobic atmosphere for 14 days, to culture non -selectively obligate and facultative anaerobes. After this period, colony-forming units (CFUs) were visually quantified for each plate.

Statistical Analyzes

The data collected (CFU/mL) were statistically analyzed by using SigmaPlot 12.0TM (Chicago, IL, USA). The significant level was always set at 5% ($P < .05$). The Shapiro-Wilk was used to verify the normality of the data that failed and showed a non-normal distribution. A comparison between the samples S1 S2 and S3 was performed by using Mann-Whitney test.

Results

Bacteria were found in all initial samples of the 24 root canals tested. The values of samples ranged between 1.4×10^3 and 3.9×10^6 (median value 2.4×10^6). Mean values of bacterial counts found in all groups tested at different sampling times are shown in Table 1.

Statistically significant differences were found between the rotary systems Protaper Next and HyFlex CM in the reduction of the bacterial load ($P < 0.05$). In PTN group, there was not bacterial growth in 2/12 (16.6%). In HCM, there was not bacterial growth in 7/12 (58.3%).

Figure 1 shows the percentage of bacterial reduction between samples S2 and S3. Among the systems, there was no statistically significant difference, but a decrease was observed in the Protaper Next system.

Overall, there was a quantitative reduction in bacterial load after the protocol with Easy Clean in relation to the samples before Easy Clean, but it was not statistically significant ($p > 0.05$).

Discussion

The present study evaluated the efficacy of a plastic device, named Easy Clean, in reduction of the bacterial load of infected root canals with periapical lesions after instrumentation with two different rotary systems. In order to obtain a successful endodontic treatment, it is necessary to clean and shape the root canal system, removing organic and inorganic tissues and reducing the bacterial load. Studies have shown that after root canal instrumentation, a large amount of debris are adhered to dentinal walls, especially in the apical area ⁽¹²⁾. Therefore, bacteria present in dentinal tubules and ramifications of the canal system might not be reached during root canal instrumentation.

EDTA is widely used in endodontics to remove the contaminated smear layer and debris formed during chemomechanical preparation, opening the dentinal tubules to receive an intracanal medication or an endodontic sealer ⁽⁹⁾. The ultrasonic activation of EDTA has been shown to be effective in reducing bacteria and endotoxin levels in the root canals of teeth with pulp necrosis and apical periodontitis ⁽²⁰⁾. Therefore, the present manuscript presents a protocol of final agitation of the irrigants based on the rationale that firstly, NaOCl was agitated to improve removal of organic tissues, secondly EDTA was used and agitated to improve smear layer removal, consequently opening the

dentinal tubules and exposing possible canal ramifications; and finally NaOCl was applied and agitated to penetrate in these regions.

All initial samples were positive for the presence of bacteria and the mean number of CFU values per canal 2.4×10^6 CFU/mL, which is comparable to previous studies ^(6, 7, 21). Besides, the present results indicate a substantial bacterial load reduction after chemomechanical preparation (S2), especially when HyFlex CM was used, with negative cultures being observed in 58.3% of HyFlex CM cases. This results could be a consequence of HyFlex CM been a system with 6 instruments, while Protaper next has 3, as microorganisms are prone to reduction when the instrumentation system presents a larger number of files, thus requiring a higher frequency of irrigation during the biomechanical preparation. Although CFU count is a reliable method for evaluating the potential of antimicrobial agents to kill viable bacterial cells, it is important to emphasize that negative samples does not necessarily mean bacteria absence, since they could be below detection levels. Another limitation to be considered is the samples were collected only from the surfaces of the main canal, but it should be taken into account that there may be bacteria in the isthmus, ramifications and dentinal tubules. Therefore, negative cultures can also be a result of several limitations associated with sampling procedure, culture techniques, and presence of as-yet-uncultivated bacteria ⁽²²⁾.

The present research used the protocol of final activation of the irrigating solution with Easy Clean in low continuous rotation inside root canals. Although the manufacturer has developed Easy Clean to operate in reciprocating mode ⁽⁶⁾, recent studies have shown greater effectiveness when used with micro motor at approximately 20,000 rpm⁽¹⁴⁾. In the study of Cesario et al. ⁽¹³⁾, when Easy Clean was used in continuous rotation, the results were statistically superior to those of conventional irrigation and similar to those of the passive ultrasonic irrigation group. The differences in the results of the Easy Clean used in reciprocating movement and continuous rotation could be explained due to differences in kinematics and rotation speed, thus altering the distribution of the irrigating solution throughout the flattened areas, resulting in better debris removal. In the present study, even though no statistical differences were observed between samples collected after root canal instrumentation (S2) and after the final protocol of agitation of irrigants (S3) a quantitative reduction was observed overall. Therefore, it can be speculated that added to the mentioned advantages of using an agitation protocol and the results obtained, there is a tendency towards an improvement of the decontamination of the root canal after applying the protocol proposed in the study.

However, regarding the results found, we hypothesized that Easy Clean has been more effective in the Protaper Next system. Because even with a greater amplitude when using the HyFlex CM system that has a more number of files, there was no statistical difference in the bacterial reduction among the systems.

According with the results obtained and with the limitations of the methodology used, the authors of this study concluded it was not statistically relevant after the use of Easy Clean. Thus, further studies on bacterial reduction are required using the Easy Clean.

Acknowledgments

Supported by Brazilian agencies CAPES.

References

1. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The Effects of Surgical Exposures of Dental Pulps in Germ-Free and Conventional Laboratory Rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1965;20:340-349.
2. Sjogren U, Figdor D, Persson S, Sundqvist G. Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 1997;30(5):297-306.
3. Machado ME, Sapia LA, Cai S, Martins GH, Nabeshima CK. Comparison of two rotary systems in root canal preparation regarding disinfection. *J Endod* 2010;36(7):1238-1240.
4. Pappen FG, Shen Y, Qian W, Leonardo MR, Giardino L, Haapasalo M. In vitro antibacterial action of Tetraclean, MTAD and five experimental irrigation solutions. *Int Endod J* 2010;43(6):528-535.
5. Alves FR, Rocas IN, Almeida BM, Neves MA, Zoffoli J, Siqueira JF, Jr. Quantitative molecular and culture analyses of bacterial elimination in oval-shaped root canals by a single-file instrumentation technique. *Int Endod J* 2012;45(9):871-877.
6. Siqueira JF, Jr., Paiva SS, Rocas IN. Reduction in the cultivable bacterial populations in infected root canals by a chlorhexidine-based antimicrobial protocol. *J Endod* 2007;33(5):541-547.
7. Gomes BP, Martinho FC, Vianna ME. Comparison of 2.5% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine gel on oral bacterial lipopolysaccharide reduction from primarily infected root canals. *J Endod* 2009;35(10):1350-1353.
8. Leoni GB, Versiani MA, Silva-Sousa YT, Bruniera JF, Pecora JD, Sousa-Neto MD. Ex vivo evaluation of four final irrigation protocols on the removal of hard-tissue debris from the mesial root canal system of mandibular first molars. *Int Endod J* 2017;50(4):398-406.
9. Schmidt TF, Teixeira CS, Felipe MC, Felipe WT, Pashley DH, Bortoluzzi EA. Effect of Ultrasonic Activation of Irrigants on Smear Layer Removal. *J Endod* 2015;41(8):1359-1363.
10. Grundling GL, Melo TA, Montagner F, Scarparo RK, Vier-Pelisser FV. QMix(R) irrigant reduces lipopolysaccharide (LPS) levels in an in vitro model. *J Appl Oral Sci* 2015;23(4):431-435.
11. Siqueira JF, Jr., Alves FR, Versiani MA, Rocas IN, Almeida BM, Neves MA, et al. Correlative bacteriologic and micro-computed tomographic analysis of mandibular molar mesial canals prepared by self-adjusting file, reciproc, and twisted file systems. *J Endod* 2013;39(8):1044-1050.
12. Kato AS, Cunha RS, da Silveira Bueno CE, Pelegrine RA, Fontana CE, de Martin AS. Investigation of the Efficacy of Passive Ultrasonic Irrigation Versus Irrigation with Reciprocating Activation: An Environmental Scanning Electron Microscopic Study. *J Endod* 2016;42(4):659-663.
13. Cesario F, Hungaro Duarte MA, Duque JA, Alcalde MP, de Andrade FB, Reis So MV, et al. Comparisons by microcomputed tomography of the efficiency of different irrigation techniques for removing dentinal debris from artificial grooves. *J Conserv Dent* 2018;21(4):383-387.

14. Duque JA, Duarte MA, Canali LC, Zancan RF, Vivan RR, Bernardes RA, et al. Comparative Effectiveness of New Mechanical Irrigant Agitating Devices for Debris Removal from the Canal and Isthmus of Mesial Roots of Mandibular Molars. *J Endod* 2017;43(2):326-331.
15. Mozo S, Llena C, Forner L. Review of ultrasonic irrigation in endodontics: increasing action of irrigating solutions. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2012;17(3):e512-516.
16. Jiang LM, Lak B, Eijsvogels LM, Wesselink P, van der Sluis LW. Comparison of the cleaning efficacy of different final irrigation techniques. *J Endod* 2012;38(6):838-841.
17. van der Sluis LW, Versluis M, Wu MK, Wesselink PR. Passive ultrasonic irrigation of the root canal: a review of the literature. *Int Endod J* 2007;40(6):415-426.
18. Martinho FC, Chiesa WM, Marinho AC, Zaia AA, Ferraz CC, Almeida JF, et al. Clinical investigation of the efficacy of chemomechanical preparation with rotary nickel-titanium files for removal of endotoxin from primarily infected root canals. *J Endod* 2010;36(11):1766-1769.
19. Xavier AC, Martinho FC, Chung A, Oliveira LD, Jorge AO, Valera MC, et al. One-visit versus two-visit root canal treatment: effectiveness in the removal of endotoxins and cultivable bacteria. *J Endod* 2013;39(8):959-964.
20. Herrera DR, Martinho FC, de-Jesus-Soares A, Zaia AA, Ferraz CCR, Almeida JFA, et al. Clinical efficacy of EDTA ultrasonic activation in the reduction of endotoxins and cultivable bacteria. *Int Endod J* 2017;50(10):933-940.
21. Martinho FC, Gomes AP, Fernandes AM, Ferreira NS, Endo MS, Freitas LF, et al. Clinical comparison of the effectiveness of single-file reciprocating systems and rotary systems for removal of endotoxins and cultivable bacteria from primarily infected root canals. *J Endod* 2014;40(5):625-629.
22. Vianna ME, Horz HP, Conrads G, Feres M, Gomes BP. Comparative analysis of endodontic pathogens using checkerboard hybridization in relation to culture. *Oral Microbiol Immunol* 2008;23(4):282-290.

Table

Table 1- Mean and standard deviation of cultivable bacteria (CFU/mL) on initial, before Easy Clean, and after easy Clean samples.

	PTN	HCM
Initial	$3.9 \times 10^6 \pm 8.8 \times 10^6$	$5.7 \times 10^5 \pm 9.2 \times 10^5$
Before Easy Clean	$4.9 \times 10^4 \pm 1.1 \times 10^5$ *	$1.6 \times 10^3 \pm 5.0 \times 10^3$ *
After Easy Clean	$1.1 \times 10^4 \pm 1.7 \times 10^4$	$1.4 \times 10^3 \pm 5.0 \times 10^3$

* statistical significance for bacteria between the different instruments ($P < 0.05$).

Figure