



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA



RODRIGO CAVASSIM

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

ARARAQUARA
2008



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA



RODRIGO CAVASSIM

**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**

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

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

**ARARAQUARA
2008**

Cavassim, Rodrigo

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 / Rodrigo Cavassim. – Araraquara : [s.n.], 2008.
120 f. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Cezar Sampaio

1. Camada de esfregaço 2. Colágeno 3. Ácido cítrico
4. Microscopia eletrônica de varredura I. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marley Cristina Chiusoli Montagnoli CRB 8/5646

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Araraquara / UNESP

RODRIGO CAVASSIM

**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**

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Presidente e OrientadorProf. Dr. José Eduardo Cezar Sampaio
2º Examinador.....Prof. Dr. Gibson Luiz Pilatti
3º ExaminadorProf. Dr. Joni Augusto Cirelli

Araraquara, 24 de março de 2008.

DADOS CURRICULARES

RODRIGO CAVASSIM

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

DEDICATÓRIA

Àqueles, que, mesmo à distância, estiveram ao meu lado todos os dias e que, somente por eles e com eles eu consegui chegar até aqui!

Meus pais: Janete e Agostinho

Minha irmã: Daiane

A quem, sempre presente ao meu lado, me deu conforto, carinho e compreensão em todos os momentos que necessitei, trazendo a alegria fundamental para conclusão deste trabalho!

Minha namorada: Diulie Graziela

Esta é a forma mais singela e sincera de agradecê-los por todo o apoio e incentivo durante essa jornada. A vocês meu muito obrigado!!!!!!

AGRADECIMENTOS

A Deus

Pela sabedoria com que conduziu meus passos durante essa jornada.

Nos momentos mais difíceis de minha trajetória, senti Sua presença
guiando-me e orientando-me.

Ao professor, orientador e amigo **José Eduardo Cezar Sampaio**. Por ter,
desde o princípio, acreditado e confiado a mim a difícil tarefa de conduzir
esta linha de pesquisa. A toda a família Sampaio pelos agradáveis
momentos de descontração que certamente tornaram mais prazerosa
minha estada nesta cidade.

Ao **Prof. Amauri Antiquera Leite** e sua família por terem aberto as portas
de sua casa, me recebendo quando cheguei em Araraquara. Com
certeza, grandes amigos!

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 da
Diretora Prof^ª. Dr^ª. Rosemary Adriana Chiérnici Marcantonio e do seu Vice-
Diretor Prof. Dr. José Cláudio Martins Segalla, pela competência com que
conduziram esta faculdade nos últimos anos.

Ao ex-coordenador do curso de Pós-Graduação em Periodontia, **Prof. Dr. Carlos Rossa Júnior**, e à atual coordenadora, **Prof^a. Dr^a. Silvana Regina Perez Orrico**, pela competência e dedicação como conduzem este curso de Pós-Graduação.

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

Ao **Carlinhos** e ao colega de doutorado **Eduardo Ishi de Paula**, pela ajuda e orientação com a análise estatística.

A todos os funcionários do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia, em especial, à **Cláudia, Maria do Rosário, Regina Lúcia, Terezinha, Zezé e Estér**, 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 à **Maria Helena** que prontamente tirou todas as dúvidas em relação às normas de redação.

Aos meus colegas de turma: **Aline, Ana Lúcia, Marina, Roberta, Romeu, Rubens, Sabrina, Wagner e Yeon**.

À nossa equipe de trabalho:

Andréa Abi Rached, que muitas vezes deixou seus afazeres e sua família para auxiliar no preparo dos espécimes e na microscopia.

Dani Zandim, que deixou seus afazeres para auxiliar no preparo dos espécimes

Fábio Renato Manzolli Leite, que desde minha chegada em Araraquara, orientou e auxiliou nos propósitos desta pesquisa.

A todos os **amigos do curso de Pós-Graduação e da disciplina de Periodontia**.

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 **Amigos** que mesmo à distância, me deram forças, algumas broncas e conselhos.

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, na pessoa da coordenadora **Prof^a. Dr^a. Maria Rita Brancini de Oliveira**.

À **CAPES**, pelo apoio financeiro.

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

Muito Obrigado!

Tua caminhada ainda não terminou...

A realidade te acolhe dizendo que pela frente o horizonte da vida necessita de tuas palavras e do teu silêncio.

Se amanhã sentires saudades, lembra-te da fantasia e sonha com tua próxima vitória.

Vitória que todas as armas do mundo jamais conseguirão obter, porque é uma vitória que surge da paz e não do ressentimento.

É certo que irás encontrar situações tempestuosas novamente, mas haverá de ver sempre o lado bom da chuva que cai e não a faceta do raio que destrói.

Se não consegues entender que o céu deve estar dentro de ti, é inútil buscá-lo acima das nuvens e ao lado das estrelas. Por mais que tenhas errado e erres, para ti haverá sempre esperança, enquanto te envergonhares de teus erros.

Tu és jovem.

Atender a quem te chama é belo, lutar por quem te rejeita é quase chegar a perfeição.

A juventude precisa de sonhos e se nutrir de lembranças, assim como o leito dos rios precisa da água que rola e o coração necessita de afeto.

Não faças do amanhã o sinônimo de nunca, nem o ontem te seja o mesmo que nunca mais.

Teus passos ficaram!

Olhes para trás... mas vá em frente pois há muitos que precisam que chegues para poderem seguir-te.

Charles Chaplin

SUMÁRIO

RESUMO	10
ABSTRACT	11
INTRODUÇÃO	12
REVISÃO DA LITERATURA	17
PROPOSIÇÃO	40
MATERIAL E MÉTODO	42
Obtenção dos dentes	43
Preparo dos espécimes	43
Tratamento dos espécimes	45
Observação dos espécimes em microscopia eletrônica de varredura ..	49
Análise das Fotomicrografias	53
Análise Estatística	58
RESULTADO	59
DISCUSSÃO	71
CONCLUSÃO	84
REFERÊNCIAS	86
ANEXOS	105

Cavassim R. 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 [dissertação mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2008.

RESUMO

A raspagem cria “smear layer” que pode obliterar os túbulos dentinários e recobrir a raiz dental, podendo acarretar atraso no reparo de feridas periodontais. Diversas substâncias são utilizadas para biomodificação radicular com objetivo de remover tecido mineralizado e expor as fibras colágenas da matriz dentinária, favorecendo a quimiotaxia e migração de células do ligamento periodontal. Este estudo avaliou diferentes concentrações, modos e tempos de aplicação de ácido cítrico na biomodificação radicular. Dentes humanos tiveram duas áreas de 3x2 mm delimitadas apicalmente a junção cimento-esmalte com a utilização de fresa cilíndrica, instrumentadas com 50 movimentos de raspagem utilizando curetas de Gracey 5/6 e em seguida, espécimes foram obtidos e divididos 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 seguidas metalizadas e levadas para observação em microscopia eletrônica de varredura. Um examinador treinado, calibrado e cego avaliou as fotomicrografias obtidas utilizando o Índice de Remoção de Smear Layer proposto por Sampaio em 1999, atribuindo escores de 1 a 8. A análise estatística foi realizada comparando-se as proporções dos escores obtidos, e mostrou que a concentração de 25 % aplicada por fricção suave no tempo de 3 minutos é recomendada para utilização do ácido cítrico na biomodificação radicular.

Palavras-chave: Camada de esfregaço; colágeno; ácido cítrico; microscopia eletrônica de varredura.

Cavassim R. An in vitro evaluation of the root surface biomodification by the use of different concentrations, modes and application times of citric acid. A scanning electron microscopy evaluation [dissertação mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2008.

ABSTRACT

The root scaling produces a smear layer which contains microorganisms and toxins that obliterates the dentinal tubules and covers the root surface, affecting the periodontal healing process. Different substances have been used to promote root biomodification with the purpose of creating the demineralization of the root surface and the collagen fibrils' exposure. The aim of this study was to evaluate different concentrations, modes and application times of citric acid in the root biomodification. Human teeth had an area of 3x2mm delimited from the apical to the cement-enamel junction. This area was scaled, with 50 strokes by hand instruments, to produce smear layer. The specimens were divided in 6 groups. (45 samples/group): physiologic solution (control) and citric acid (0.5%, 1%, 2%, 15% and 25%). The application time was 1', 2' and 3' to each group. The application modes were: a) topic application, with cotton pellets; b) brushing, with a soft brush; c) burnishing, with cotton pellets. In all modes, the solution was renewed every 30". The samples were submitted to ethylic alcohol and HMDS dehydration and then they were evaluated using the scanning electron microscopy. A blind and trained examiner evaluated photomicrographs based on Sampaio's index (1999). Data were statistically analyzed by means of a binomial test ($p \leq 0.05$). The statistical analysis showed that the best results were achieved with the 25% concentration applied by brushing for 3 minutes. Thus, these parameters are the recommended for root biomodification with the citric acid.

Keywords: Smear layer; collagen; citric acid; scanning electron microscopy.

INTRODUÇÃO

A doença periodontal é multifatorial, sendo os microrganismos presentes na placa bacteriana os principais fatores etiológicos locais da doença periodontal (Løe et al.⁷⁴, 1965). A placa dá origem ao cálculo dental, depósito duro mineralizado o qual se adere às superfícies duras da cavidade bucal, sejam elas dentárias ou não. Na superfície do cálculo há sempre uma camada de placa bacteriana não mineralizada, um reservatório de bactérias responsáveis pela inflamação dos tecidos periodontais^{6,73,85}.

A raspagem e alisamento radicular (RAR) é o procedimento clínico utilizado rotineiramente no tratamento da doença periodontal. Objetiva a descontaminação da superfície radicular por meio da remoção dos depósitos mineralizados ou não, podendo ser realizada com instrumentos manuais, rotatórios, sônicos e ultra-sônicos⁷¹⁻⁷³. A RAR é um procedimento eficaz na remoção do cálculo dentário, no entanto, independente da maneira como é realizado, este procedimento leva à formação de uma camada com aproximadamente 2 a 15 µm de espessura, formada por restos orgânicos e inorgânicos, entre eles, raspas de dentina e cimento, cálculo dental, fragmentos de processos odontoblásticos e bactérias, recebendo a denominação “smear layer”^{10,14,17,41,56,60,86,91,104}. A “smear layer” depositada sobre a superfície radicular não fornece condições aceitáveis para a regeneração dos tecidos periodontais. Segundo alguns autores, podendo até atuar como

um reservatório de bactérias e como nicho para recolonização da bolsa periodontal, bem como dificultando a adesão de fibroblastos e retardando o processo de reparo, propiciando a formação de epitélio juncional longo e impedindo o restabelecimento de nova inserção conjuntiva^{2,3,49,65,80,91}.

Estudos sugerem que a superfície radicular exposta à doença periodontal sofre alterações que impedem a adesão celular^{88-91,93}. Essas alterações incluem alterações na composição e densidade minerais;^{106,107} contaminação com bactérias e endotoxinas encontradas, tanto na superfície radicular, quanto penetrando nos túbulos dentinários^{2,3,5,42,43,54,130}. Apenas os procedimentos de raspagem e alisamento radicular não são suficientes para eliminação de todos os fatores negativos relacionados à doença periodontal, os quais favorecem a formação de epitélio juncional longo, que atua como barreira física entre o tecido conjuntivo gengival e a superfície radicular impedindo a formação de nova inserção conjuntiva nessas superfícies radiculares^{61,93,94}.

Assim, diferentes tratamentos químicos com agentes desmineralizadores vêm sendo propostos na literatura como coadjuvantes ao tratamento periodontal na descontaminação radicular, promovendo uma biomodificação desta superfície^{1,12,40,47,53,56,63,66,67,76,95,105,114,124,126}. Os objetivos principais desta terapia consistem na remoção da “smear layer” e exposição de fibras colágenas de dentina, formadas principalmente por colágeno tipo I, que possui atividades quimiotáticas para fibroblastos e propicia estabilização do coágulo pela formação de uma rede de

fibrina^{13,77,90,100}. Consegue-se, assim, um ambiente mais propício para formação de nova inserção conjuntiva, impedindo a migração do epitélio juncional longo^{35,37,82}.

Na biomodificação radicular, o ácido cítrico foi um dos primeiros agentes utilizados apresentando bons resultados em relação a nova inserção conjuntiva, cementogênese e neoformação óssea, sendo contra-indicado por alguns autores devido ao seu baixo pH, responsável pela citotoxicidade^{4,26,27,29,36,37,66,68,69,82,83,95-98}.

O Cloridrato de tetraciclina é também uma substância de baixo pH proposta para biomodificação radicular^{1,123} e apresenta, além da capacidade de remoção de “smear layer”, uma adsorção à superfície dental com liberação lenta por até 14 dias³⁰. Além disso, outra vantagem, como promover adesão e proliferação de fibroblastos pode ser observada com a utilização desta substância^{8,31,50,59,67,112,126}.

Como alternativa às substâncias de baixo pH, foi proposta a utilização do EDTA¹⁵, que possui capacidade de remoção da matriz inorgânica da dentina pela quelação de íons cálcio e não por desmineralização como ocorre com as substâncias mencionadas anteriormente^{9,12-15,18,20,46,63,105,111}.

Outra substância com propriedade quelante semelhante ao EDTA é o citrato de sódio. Apesar de não serem encontrados estudos onde ele é empregado na biomodificação radicular, o citrato de sódio apresenta características citotóxicas para fibroblastos gengivais menos

acentuadas do que o ácido cítrico justificando sua utilização para este fim⁶⁸. Ele é o anticoagulante de escolha para bolsas de sangue, pois apresenta menor grau de toxicidade celular em comparação ao EDTA³⁹. Outro fator importante, é que o citrato de sódio apresenta uma ligação menos estável ao íon cálcio do que o EDTA, sugerindo uma reação mais controlada, podendo tornar sua remoção da superfície dental mais fácil⁸⁴.

No entanto, um estudo comparativo in vitro entre cloridrato de tetraciclina, EDTA, citrato de sódio e ácido cítrico mostrou que superfícies biomodificadas com este último, apresentaram melhores resultados quanto à adesão de elementos sangüíneos⁷⁰. Este resultado é promissor porque a firme adesão de um coágulo à superfície radicular é bastante favorável para a obtenção de regeneração periodontal.

Diante das evidências científicas apresentadas e na ausência de estudos conclusivos sobre o assunto, propomos um estudo experimental com objetivo de verificar em altas e baixas concentrações, qual a melhor forma e tempo de aplicação do ácido cítrico na biomodificação radicular.

REVISÃO DA LITERATURA

Os primeiros trabalhos de biomodificação radicular datam do final do século XIX e utilizaram ácidos para desmineralização da superfície radicular¹²². Estudos posteriores em cães, realizados por Register⁹⁵ e Register, Burdick^{96,97} apontaram a utilização do ácido cítrico aplicado por 2 ou 3 minutos como substância capaz de favorecer cementogênese e formação de nova inserção. Por outro lado, Stahl, Froum¹¹³ (1977) não conseguiram obter esses resultados com aplicação passiva em dentes humanos removidos em bloco 16 semanas após o tratamento.

Garret et al.⁴⁷ (1978) constataram, em estudo in vitro, que a remoção dos depósitos mineralizados seguida da aplicação passiva de ácido cítrico (pH 1) por 3 minutos permitiu observar, por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV), túbulos dentinários obliterados por “smear layer”.

Estudos em cães *Beagle*, realizados por Crigger et al.³⁷ (1978), Nilvéus et al.⁸³ (1980) e Nilvéus, Egelberg⁸² (1980), avaliaram a utilização de ácido cítrico associado a uma espuma de gelatina reabsorvível (Gelfoam® - Pharmacia & Upjohn Co., EUA) em procedimentos regenerativos. Segundo os autores, a utilização de Gelfoam® não influenciou na formação de nova inserção conjuntiva com resultados favoráveis ao tratamento com ácido cítrico, observados por meio de análise histológica e histométrica.

Os bons resultados observados em cães estimularam Cole et al.³⁵ (1981) a testar a utilização do ácido cítrico como coadjuvante no tratamento cirúrgico periodontal de 61 dentes distribuídos em 2 grupos, sendo que no primeiro grupo os dentes foram tratados apenas por raspagem e alisamento radicular (RAR) (grupo controle) e os dentes do segundo grupo foram tratados por RAR seguida de aplicação passiva de ácido cítrico com bolinhas de algodão por um tempo de 3-5 minutos e irrigação com solução salina por 1 minuto. Mesmo o ganho de inserção tendo sido maior para o grupo tratado com ácido cítrico (média=2,1 mm) em comparação ao grupo controle (média=1,5 mm), este ganho não foi clinicamente relevante, bem como a metodologia utilizada não permitiu estabelecer se houve formação de nova inserção ou formação de epitélio juncional longo.

Outro estudo realizado por Renvert, Egelberg⁹⁸ (1981) avaliou a influência do ácido cítrico no tratamento de 13 dentes com evidências radiográficas de defeitos infra-ósseos e profundidade de sondagem residual após raspagem. Os autores utilizaram um modelo de boca dividida com cirurgias à retalho, sendo os dentes do grupo teste submetidos à instrumentação manual e aplicação passiva de ácido cítrico (pH 1) com bolinhas de algodão, tendo como controle apenas instrumentação. Os resultados mostraram que os dentes tratados com ácido cítrico obtiveram maior ganho ósseo e ganho clínico de inserção

que o grupo controle, no entanto sem diferenças estatisticamente significantes.

No ano seguinte, Albair et al.⁴ selecionaram pacientes com periodontite moderada e avançada, cujos dentes estavam indicados para exodontia. Esses dentes foram raspados e alisados, e em seguida receberam aplicação passiva de ácido cítrico (pH 1.0) com bolinhas de algodão por 5 minutos. Como controles, foram utilizados os dentes contralaterais, os quais receberam apenas raspagem e alisamento radicular. As exodontias foram realizadas entre 6 e 15 semanas e as raízes divididas ao meio para observação em MEV e em microscopia óptica. Os resultados mostraram remoção incompleta do cimento em todas as superfícies radiculares avaliadas com formação de nova inserção sobre este cimento não removido ou neoformado em seis dos nove espécimes avaliados. Por outro lado, todos os espécimes do grupo controle apresentaram formação de epitélio juncional longo.

Com objetivo de melhor avaliar o potencial de indução de regeneração do ácido cítrico, Polson, Proye⁸⁹ (1982) utilizaram 12 pré-molares extraídos de macacos. Esses dentes tiveram o terço coronário instrumentado e tratado com ácido cítrico (pH 1.0) aplicado por fricção suave por 3 minutos e reimplantados imediatamente. Os resultados histológicos iniciais não mostraram fibras inseridas na superfície radicular, apenas uma rede de fibrina recobrendo a raiz três dias após o reimplante. Somente após vinte e um dias é que se pode observar nova inserção

conjuntiva à superfície radicular, no entanto sem neoformação cementária e com lacunas de reabsorção ao longo da superfície radicular.

Em outro trabalho com humanos, Common, McFall Jr.³⁶ (1982) avaliaram clínica e histologicamente o efeito do tratamento com ácido cítrico (pH 1, aplicado por fricção durante 2 minutos) na cicatrização de retalhos posicionados lateralmente em incisivos inferiores indicados para exodontia por motivos protéticos. A análise histológica, após 5 meses, mostrou formação de novo cimento e fibras colágenas dispostas paralelamente à superfície radicular, com algumas regiões de fibras orientadas perpendicularmente e inseridas no cimento depositado.

Cogen et al.³³ (1983) avaliaram os efeitos do tratamento da superfície radicular na viabilidade e migração de fibroblastos humanos marcados radioativamente em 50 dentes comprometidos periodontalmente, sendo esses divididos em grupos tratados com ácido cítrico (pH 1.0 por 3 minutos) sem raspagem radicular; apenas raspagem radicular; raspagem radicular seguida de aplicação de ácido cítrico (pH 1.0, por 3 minutos) e espécimes que não receberam nenhum tratamento. Nenhum dos grupos, independente do tratamento, apresentou efeitos adversos na viabilidade das células. Entretanto, somente as superfícies instrumentadas, com ou sem aplicação de ácido cítrico, proporcionaram condições para adesão e crescimento radicular enfatizando assim a importância da descontaminação mecânica da superfície radicular.

Fernyhough, Page⁴⁵ (1983) avaliaram a capacidade de crescimento e síntese de fibroblastos em meios de cultura contendo raízes instrumentadas e tratadas com ácido cítrico (pH 1, por 3 minutos) ou fibronectina. Ambos os tratamentos mostraram-se compatíveis com o crescimento de fibroblastos.

Kashani et al.⁶² (1984) observaram respostas histológicas semelhantes, sem diferenças de cicatrização, após procedimento cirúrgico em dentes humanos indicados para exodontia por doença periodontal que receberam apenas instrumentação manual, e dentes que receberam instrumentação manual e aplicação de ácido cítrico (pH 1.0 por 5 minutos).

Polson et al.⁹¹ (1984) caracterizaram a formação e remoção de “smear layer”, com uso de tratamento químico da superfície radicular, em um estudo com dentes instrumentados que receberam aplicação passiva de ácido cítrico (pH 1, por 3 minutos) e dentes apenas instrumentados. A observação da superfície dos espécimes, por meio de MEV, mostrou a presença de uma superfície irregular sem indícios de abertura de túbulos dentinários nos espécimes instrumentados e túbulos dentinários expostos livres de “smear layer”, com dentina peritubular de aspecto fibrilar denso nos espécimes previamente instrumentados e tratados com ácido cítrico.

Na tentativa de melhorar os resultados obtidos com o ácido cítrico na biomodificação radicular, Willey, Steinberg¹²⁷ (1984)

utilizaram após a aplicação dessa substância de pH 1 por 3 minutos, a incubação de espécimes de dentina desprovidos de cemento em soluções contendo elastase, hialuronidase, pronase e collagenase. Ao examinar os espécimes por meio de MEV, os autores constataram que a collagenase favoreceu uma maior exposição de colágeno da superfície radicular em relação à desmineralização isoladamente, devido à remoção de componentes da matriz extracelular, inclusive hidrolisando algumas das fibrilas colágenas.

Baseados em estudos anteriores^{89,90}, os quais mostraram que a presença de uma camada de fibrina na superfície radicular tratada precede a inserção de fibras colágenas, Caffesse et al.²⁶ (1985) avaliaram o efeito da biomodificação radicular com ácido cítrico e aplicação de fibronectina em dentes de cães *Beagle* tratados cirurgicamente. Foram testadas a aplicação de ácido cítrico (pH 1.0 de forma passiva por 3 minutos), fibronectina, ácido cítrico e fibronectina, e apenas o procedimento cirúrgico, sendo que em todos os grupos os dentes receberam raspagem e alisamento radicular. Os resultados mostraram diferenças estatísticas significantes entre os tratamentos testados, sendo que as áreas tratadas com ácido cítrico e fibronectina apresentaram nova e maior inserção em comparação aos outros grupos testados.

Na tentativa de estabelecer parâmetros para a aplicação do ácido cítrico, Sterrett, Bain¹¹⁵ (1987) analisaram a topografia da superfície radicular comparando a aplicação passiva com bolinhas de

algodão durante 5 minutos e renovação 3 vezes por minuto, com aplicação por fricção vigorosa das bolinhas de algodão. As fotomicrografias obtidas dos espécimes que receberam fricção mostraram túbulos dentinários abertos com fibras colágenas densas expostas, da mesma forma que os espécimes tratados passivamente também apresentaram túbulos abertos, mas com poucas fibras expostas.

Com objetivo de melhor avaliar a cicatrização de cirurgias a retalho após biomodificação radicular com ácido cítrico, Moore et al.⁷⁹ (1987) realizaram um estudo duplo-cego controlado em modelo de boca dividida em humanos. Os dentes testes receberam aplicação por fricção vigorosa de ácido cítrico (pH 0.6 durante 3 minutos, com renovação da solução a cada minuto). Os resultados do ponto de vista clínico, bem como estatístico, sugerem que as diferenças na cicatrização entre os sítios tratados ou não com ácido cítrico não foram significantes.

Para melhor compreender os efeitos da biomodificação radicular após cirurgias a retalho, Steinberg, Willey¹¹⁴ (1988) avaliaram os estágios iniciais da formação do coágulo em dentes extraídos, tratados e reimplantados. Foram utilizados dentes com e sem doença periodontal, avaliando-se superfícies de ligamento periodontal saudável; superfícies acometidas por doença periodontal; superfície radicular com doença periodontal instrumentada com instrumentos manuais; superfície com doença periodontal instrumentada e tratada com fricção suave (uso de pincel macio) de ácido cítrico (pH 1, por 3 minutos). Os resultados

mostraram que a formação inicial de coágulo deu-se mais rapidamente nas superfícies tratadas com ácido cítrico, sugerindo que a presença de fibras colágenas possa ter influenciado a obtenção deste resultado. Em contrapartida, superfícies acometidas por doença periodontal e instrumentadas não apresentaram formação de coágulo.

Ao investigar a migração de células epiteliais sobre superfícies radiculares, Larjava et al.⁶⁹ (1988) encontraram resultados que mostraram influência da desmineralização radicular com ácido cítrico (pH 1, por 5 minutos) na direção de migração do tecido epitelial, causando um atraso na migração do epitélio entre o tecido conjuntivo e a superfície radicular na maioria dos espécimes, fato que pode favorecer o processo de nova inserção conjuntiva.

Com objetivo de validar os resultados obtidos¹¹⁵ em 1987, Sterrett, Murphy¹¹⁶ (1989) utilizaram 20 espécimes, obtidos de 10 dentes comprometidos periodontalmente, para aplicação de ácido cítrico (pH 1 por 5 minutos) por fricção vigorosa e aplicação passiva, sendo a solução renovada a cada 30 segundos em ambos os grupos. Ambas as formas de aplicação mostraram-se capazes de remover a “smear layer”, no entanto as fibras colágenas apresentaram aspecto mais denso no grupo tratado com fricção.

Fardal, Lowenberg⁴⁴ (1990) utilizaram 120 fragmentos de superfícies radiculares afetadas e não afetadas por doença periodontal para avaliar in vitro a migração, adesão e orientação de fibroblastos. Os

fragmentos submetidos à raspagem e alisamento, receberam tratamento com ácido cítrico (pH 1, por 3 minutos) ou EDTA 18% (por 30 minutos). Segundo os autores, o ácido cítrico associado à instrumentação manual mostrou-se eficaz na criação de uma superfície biologicamente compatível, comparável a superfícies não afetadas pela doença periodontal.

A comparação, por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) da morfologia dentinária radicular de dentes submetidos à raspagem e tratamento com ácido cítrico (pH 1) ou cloridrato de tetraciclina 0,5% (pH 3.2) aplicados por 5 minutos, resultou em uma exposição maior de túbulos dentinários e exposição de fibras colágenas com o ácido cítrico, sendo a tetraciclina incapaz de remover “smear layer” e expor fibras colágenas em todos os espécimes avaliados no estudo de Hanes et al.⁵³ (1991)

Diante dos resultados favoráveis obtidos com o ácido cítrico até então, Sterrett et al.¹²⁰ (1991) aplicaram diferentes concentrações de ácido cítrico (0, 0.1, 1, 8, 24, 56 e 80%) na superfície dentinária de molares bovinos. A quantidade de íons cálcio removida foi avaliada por meio da absorção dessa substância depositada na superfície radicular com bolinhas de algodão e posterior diluição em tubos de ensaio com água destilada. A solução obtida foi então avaliada por espectrofotometria de absorção atômica. O ácido cítrico 24% (pH 1.42) promoveu maior remoção de íons cálcio, medidos em partes por milhão

(ppm), possivelmente associada com uma maior exposição de fibras colágenas.

Assim, tempo e modo de aplicação foram avaliados por Codelli et al.³² (1991) em 10 dentes extraídos por doença periodontal, os quais tiveram a superfície instrumentada com curetas Gracey 11/12 e comparadas as aplicações por fricção vigorosa de solução salina por 5 minutos (controle), aplicação passiva de ácido cítrico por 3 ou 5 minutos e fricção vigorosa de ácido cítrico por 3 ou 5 minutos. A avaliação por meio de microscopia eletrônica de varredura mostrou diferentes características morfológicas, sendo alcançados melhores resultados por meio da aplicação por fricção no tempo de 3 minutos. Os autores observaram exposição de uma rede de fibras colágenas compatíveis com completa desmineralização. Por outro lado, a aplicação por 5 minutos promoveu uma hiperdesmineralização com desnaturação das fibras colágenas.

Procedimentos de regeneração tecidual guiada, associando-se biomodificação radicular com ácido cítrico, foram avaliados em cães por Caffesse et al.²⁷ (1991) e em humanos por Handelsman et al.⁵² (1991). No estudo em cães foi utilizado um modelo de boca dividida, no qual foi avaliada a aplicação de ácido cítrico (pH 1, por 3 minutos) e fibronectina autógena seguidos de colocação de uma membrana não reabsorvível (Gore Tex, WL Gore and Associates), comparando à utilização de membrana sem tratamento da superfície radicular (controle). Esse estudo demonstrou que os dentes tratados com ácido cítrico e

fibronectina antes da colocação da membrana mostraram resultados discretamente melhores que o grupo controle, porém sem diferenças estatísticas. O estudo em humanos⁵² avaliou o condicionamento radicular com solução saturada de ácido cítrico (pH 1 por 3 minutos) associado a colocação de uma membrana de PTFE comparando à utilização de membrana sem condicionamento radicular em sítios com profundidade de sondagem persistente de 7 mm e defeito ósseo de 4 mm após terapia básica. Observou-se melhora estatisticamente significativa nos parâmetros de profundidade de sondagem e nível de inserção 6 meses após a avaliação inicial, mas sem diferenças entre os grupos.

A morfologia da superfície radicular de terceiros molares submetidos à raspagem e aplicação de uma solução saturada de ácido cítrico ou de cloridrato de tetraciclina (100 mg/mL) por 30, 60, 120 ou 240 segundos, aplicados por gotejamento ou fricção foi avaliada por Labahn et al.⁶⁶ (1992). Os resultados da análise por meio de microscopia eletrônica de varredura mostraram maior abertura dos túbulos dentinários com a utilização do ácido cítrico, sendo o grau de desmineralização diretamente proporcional ao tempo de aplicação, porém sem diferenças quanto à forma de aplicação.

No mesmo ano, Wen et al.¹²⁵ avaliaram descritivamente o número e a área de superfície dos túbulos expostos obtidos por diferentes técnicas de aplicação de ácido cítrico. Quarenta espécimes foram divididos em 5 grupos e tratados por imersão em ácido cítrico, aplicação

passiva, fricção vigorosa ou fricção suave, comparando estas formas de aplicação com um grupo controle que não recebeu tratamento químico da superfície radicular. A observação dos espécimes em microscopia eletrônica de varredura mostrou grande variabilidade entre os grupos. A aplicação passiva e por fricção suave mostraram se capazes em expor fibras intertubulares e um grande número de túbulos dentinários. Por outro lado, a fricção vigorosa ocasionou uma hiperdesmineralização da superfície radicular com dissolução química das fibras colágenas.

O efeito da aplicação de ácido cítrico em 40 dentes extraídos por doença periodontal severa foi avaliado em estudo in vitro por meio de microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura (MEV) por Chaves et al.^{28,29} nos anos de 1992 e 1993 respectivamente. As superfícies testadas foram: superfícies não instrumentadas; superfícies que receberam aplicação de ácido cítrico (pH 1 por 3 minutos) após remoção de depósitos mineralizados; superfícies instrumentadas e superfícies instrumentadas que receberam aplicação de ácido cítrico comparadas a dentes saudáveis. Quando analisadas por microscopia óptica, não foram observadas alterações nos grupos tratados com ácido cítrico. Os resultados obtidos por meio de MEV mostraram que a aplicação de ácido cítrico não promoveu desmineralização da superfície radicular em dentes não instrumentados. Entretanto, nos dentes instrumentados e tratados com ácido cítrico, observou-se remoção da

“smear layer”, com túbulos dentinários abertos e fibras colágenas expostas pela desmineralização da dentina peritubular e intertubular.

As metodologias utilizadas até então não apresentaram resultados conclusivos sobre qual a melhor concentração e tempo de aplicação. Assim, Sterrett et al.¹¹⁷ (1993) propuseram avaliar a capacidade de desmineralização de diferentes soluções de ácido cítrico (0, 10, 20, 25, 30, 35, 40 e 65%) de respectivos pH (5.81, 1.95, 1.77, 1.62, 1.55, 1.46, 1.36 e 1.01) em 15 molares bovinos. As soluções foram aplicadas passivamente por 1, 2 ou 3 minutos e os resultados da análise, por meio de espectrofotometria de absorção atômica, mostraram que as concentrações de 25 e 30% removeram mais íons cálcio que as demais, e que concentrações mais elevadas promoveram menor grau de desmineralização, o qual se mostrou diretamente proporcional ao tempo de aplicação.

No mesmo ano, Dyer et al.⁴⁰ compararam a eficácia do tratamento da superfície radicular com ácido cítrico (pH 1.0, durante 3 minutos) ou cloridrato de tetraciclina 100 mg/mL (pH 1.7, por 5 minutos) e regiões que não receberam tratamento químico em procedimentos de regeneração tecidual guiada em 8 cães com doença periodontal natural. Os animais foram sacrificados 4 meses após os procedimentos cirúrgicos e as avaliações histológica e histométrica mostraram formação estatisticamente superior de cemento com fibras colágenas inseridas nos espécimes que não receberam tratamento químico da superfície radicular.

Procedimentos de regeneração tecidual guiada também foram utilizados por Sammons et al.¹⁰³ (1994) para avaliar a proliferação e migração de células progenitoras marcadas em defeitos periodontais em cães. Os defeitos foram tratados com aplicação tópica de ácido cítrico, tetraciclina ou água estéril (grupo controle), com e sem utilização de membrana não reabsorvível (Gore-Tex, WL Gore and Associates). Após 1, 3, 7 e 21 dias os animais foram sacrificados, as peças removidas e avaliadas histologicamente, obtendo-se resultados que sugerem inibição de proliferação celular nos dentes que receberam tratamento químico nos períodos de 1 e 3 dias. E mesmo aos 7 e 21, as diferenças entre os grupos tratados quimicamente foram mínimas, sem vantagens em relação ao grupo controle.

A topografia da superfície radicular, após raspagem e alisamento radicular seguida de aplicação de ácido cítrico a 30%, foi avaliada por Sterrett et al.¹¹⁸ (1995) em estudo que avaliou três formas de aplicação: passiva, fricção suave e fricção vigorosa. Vinte dentes humanos foram utilizados nos três tratamentos propostos. Os resultados mostraram maior exposição de fibras colágenas e uma característica mais densa com a utilização das formas de fricção do que com a aplicação passiva.

Devido à falta de estudos comparativos das substâncias utilizadas na biomodificação radicular e de avaliação sobre os efeitos daquelas nas células do ligamento periodontal, Blomlöf, Lindskog^{13,14}

(1995) realizaram dois estudos. O primeiro, avaliando a textura superficial dentinária de 56 dentes extraídos de macacos, tratados com ácido cítrico (pH 1), ácido fosfórico a 37% (pH 1), EDTA 24% (pH 7), aplicados por 20 segundos ou 3 minutos e como controle, a aplicação por fricção vigorosa de solução tampão fosfato (pH 7.2) e a não realização de tratamento. O mesmo tratamento foi realizado em 16 incisivos laterais de macacos que foram extraídos, tratados e reimplantados. O tratamento com EDTA a 24% mostrou-se superior aos outros tratamentos por remover seletivamente a “smear layer”, expondo fibras colágenas e favorecendo a colonização celular e formação de tecido conjuntivo, resultados estes não obtidos com ácido cítrico e ácido fosfórico que também não apresentaram colonização celular, possivelmente causada pela necrose de células do ligamento periodontal adjacente. No segundo estudo, os autores avaliaram os efeitos da aplicação de ácido cítrico e ácido ortofosfórico 37% (ambos com pH 1) e do ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 24% (pH 7.0), aplicados respectivamente por 20 segundos e 3 minutos sobre a vitalidade celular dos tecidos periodontais por meio de avaliação em retalhos gengivais da atividade da enzima lactato-desidrogenase (LDH) envolvida na glicólise anaeróbia. Foi observada uma redução de atividade da LDH nos espécimes que entraram em contato com o ácido cítrico e ácido fosfórico, sugerindo que o uso de substâncias de baixo pH pode comprometer, mesmo que temporariamente, a vitalidade das células dos tecidos periodontais.

Ainda preocupados com efeitos deletérios do baixo pH apresentado pelo ácido cítrico, Blomlöf et al.¹⁸ (1996) compararam este com o EDTA de pH neutro, quanto a capacidade em promover melhor reparo periodontal em animais. As superfícies dentinárias foram expostas pela remoção do osso alveolar e tratadas com aplicação passiva de ácido cítrico (pH 1, por 3 minutos) ou EDTA 24% (por 8 minutos). Como controle foi utilizado um grupo de dentes que tiveram a superfície dentinária exposta sem receber tratamento algum. Os resultados histológicos e histométricos mostraram superioridade do EDTA em relação ao ácido cítrico, o qual apresentou efeito necrosante superficial no tecido conjuntivo.

Babay⁷ (1997) observou que a irrigação ultra-sônica de superfícies radiculares sem doença periodontal, antes e após o condicionamento ácido da superfície radicular com solução saturada de ácido cítrico (pH 1) ou solução de cloridrato de tetraciclina (pH 1.8) aplicados por imersão dos espécimes por 3 minutos, proporcionou remoção da “smear layer” e exposição das fibras colágenas em todos os espécimes avaliados.

Para avaliar o efeito da concentração da tetraciclina na biomodificação radicular, Sterrett et al.¹²¹ (1997) testaram as concentrações de 0, 25, 50, 75, 100, 125 e 150 mg/mL, comparando com solução de ácido cítrico a 30% em 3 molares bovinos em uma avaliação por meio de espectrofotometria de absorção atômica da quantidade de

íons cálcio liberada por cada solução. Os resultados mostraram não haver diferenças entre as concentrações de 75, 100, 125 e 150 mg/mL quanto a desmineralização radicular. Por outro lado, a solução de ácido cítrico a 30% mostrou-se capaz em remover de 3 a 5,5 mais íons cálcio que o cloridrato de tetraciclina, mostrando-se mais eficaz que esta na desmineralização da superfície radicular.

Bergenholtz, Babay¹² (1998) compararam in vitro a eficácia de solução salina, cloridrato de tetraciclina (pH 1.8), solução saturada de ácido cítrico (pH 1) e EDTA a 8% em solução fosfatada (pH 7.3) aplicados por fricção vigorosa e passivamente. Obteve-se uma superfície fibrilar com a aplicação passiva, enquanto que a fricção causou rompimento no arranjo das fibras colágenas. Quanto ao tipo de agente, o ácido cítrico proporcionou melhores resultados.

Rompen et al.¹⁰⁰ (1999) utilizaram dentes extraídos por indicação ortodôntica para comparar o tratamento da superfície radicular com solução aquosa de ácido cítrico a 3% (pH 1.85) ou cloridrato de minociclina (pH 3.8) quanto a proliferação e síntese protéica de fibroblastos do ligamento periodontal, sendo que essa, foi significativamente maior nos espécimes condicionados em relação aos não tratados, independente da substância empregada. Os autores concluem que o condicionamento da superfície radicular com essas substâncias favorece a adesão, proliferação e síntese protéica das células do ligamento periodontal.

Lan et al.⁶⁸ (1999) também estudaram os efeitos do baixo pH do ácido cítrico na viabilidade, adesão e síntese protéica de fibroblastos gengivais humanos. Os resultados contrariam o trabalho de Rompen et al.¹⁰⁰, mostrando que o ácido cítrico causa acidose extracelular, suprimindo a adesão celular e retardando a colonização da superfície radicular por estas células. O contato direto com o tecido gengival causou necrose celular imediata.

Num estudo mais completo que o anterior, Zaman et al.¹³¹ (2000) avaliaram o efeito da imersão de fragmentos radiculares de dentes expostos à doença periodontal em substâncias de baixo pH, como o ácido cítrico (pH 1.29) e tetraciclina HCl a 100 mg/mL (pH 2.00) em comparação ao EDTA a 24% (pH 7.04) e também espécimes não tratados, na adesão e orientação de células do ligamento periodontal. A avaliação por microscopia de fase não mostrou diferença quanto à adesão e orientação das células na dentina e cimento, havendo uma superioridade do tratamento com EDTA e ácido cítrico em relação aos demais. Os autores concluem que a biomodificação radicular com essas substâncias pode favorecer o processo regenerativo periodontal, não havendo necessidade de completa remoção do cimento radicular contaminado.

O estudo de Blomlöf et al.¹⁹ (2000) deu seqüência aos anteriores, comparando tratamentos com aplicação passiva de bolinhas de algodão de solução fisiológica por 20 segundos com aplicação passiva de solução aquosa saturada de ácido cítrico (pH 1 por 20 segundos) e

aplicação de gel de EDTA a 24% (por 2 minutos) em procedimentos cirúrgicos periodontais. A avaliação de profundidade de sondagem e ganho de inserção não mostraram diferenças entre os tratamentos utilizados.

Acreditando que a formação de nova inserção é diretamente influenciada pelas características da superfície radicular, Baker et al.¹⁰ (2000) estudaram in vitro a adsorção e adesão do coágulo a superfícies radiculares tratadas por imersão em solução saturada de ácido cítrico por 5 minutos. As amostras tratadas apresentaram uma rede de fibrina sobre a dentina com grande presença de elementos celulares, especialmente eritrócitos, ao contrário das amostras não tratadas que apresentaram deposição esparsa de proteínas fibrosas, com poucos eritrócitos.

Até então os trabalhos vinham analisando apenas as propriedades dos agentes quanto à remoção da “smear layer” e exposição das fibras colágenas sem, no entanto, avaliar o que realmente acontecia com esse colágeno exposto. Pensando nisso é que Breschi et al.²² (2003) estudaram por meio de técnicas de imunocitoquímica a manutenção das propriedades antigênicas imunoquímicas das fibras colágenas após tratamento da superfície radicular de 20 pré-molares extraídos por razões ortodônticas e tratados aleatoriamente com ácido cítrico a 10% (por 15 ou 30 segundos), ácido maleico a 10% (por 15 ou 30 segundos), ácido fosfórico a 35% (por 15 ou 30 segundos), EDTA 0.5M

com pH 7.0 (por 1, 24, 48 ou 72 horas), comparando com superfícies não tratadas (controle). Por meio de análise de imunocitoquímica para colágeno tipo I e sulfato de condroitina, os autores puderam observar que os espécimes tratados com os ácidos maleico e cítrico apresentaram uma marcação difusa, intensa para fibras colágenas e proteoglicanas, resultado também obtido com o EDTA após 48h de aplicação e não observado para o ácido fosfórico, o qual resultou em grande coagulação das proteoglicanas.

No mesmo ano, Breschi et al.²³ estudaram também a presença de colágeno tipo I, alterando-se os tempos de aplicação em relação ao trabalho anterior do EDTA (0.5M, por 30 minutos), ácido fosfórico a 35% (por 15 ou 30 segundos e por 30 segundos seguido de irrigação com solução salina por 15 segundos e nova aplicação do ácido por 30 segundos) e nenhum tratamento (controle). Utilizando-se de técnicas de imunocitoquímica com anticorpos monoclonais para marcar colágeno tipo I, os autores observaram que quantidade significativamente maior de colágeno tipo I nos espécimes tratados com ácido fosfórico a 35% por 15 segundos e que a aplicação por tempos maiores levaram a modificações estruturais nas moléculas de colágeno.

Baker et al.⁹ (2005) avaliaram, na retenção do coágulo, o efeito do condicionamento de blocos de dentina humana com proteínas (albumina bovina ou proteínas da matriz do esmalte) associadas ao uso de ácido cítrico ou gel de EDTA a 24% e uma solução salina tampão de

fosfato utilizada como controle. Vinte minutos após a deposição de sangue humano fresco, os espécimes processados foram observados em MEV. Das substâncias testadas, o ácido cítrico foi o único capaz de promover uma superfície completamente livre de “smear layer” e também mais favorável a retenção do coágulo. As proteínas não foram eficazes na remoção de “smear layer”, nem proporcionaram retenção ao coágulo. Já os espécimes tratados com EDTA apresentaram pequena quantidade de coágulo aderido, o qual se soltava facilmente da superfície.

A adesão de coágulo também foi objeto de estudo de Leite⁷⁰ em 2006. Foram utilizados 150 fragmentos de dentes humanos que receberam raspagem e alisamento radicular e tratados com irrigação com 10 mL de solução fisiológica, EDTA a 24% (aplicado por fricção suave, com pincel macio por 3 minutos), ácido cítrico a 25% (aplicado por fricção vigorosa por 3 minutos), cloridrato de tetraciclina 50 mg/mL (aplicado por fricção vigorosa por 3 minutos) ou citrato de sódio a 30% (aplicado por fricção suave, com pincel por 3 minutos), sendo as soluções renovadas a cada 30 segundos. Após lavagem com água destilada, foi depositada uma gota de sangue humano sobre cada espécime. A observação em MEV mostrou que as substâncias testadas foram efetivas na remoção da “smear layer”, exceto o controle. Segundo o autor, os espécimes tratados com ácido cítrico apresentaram mais elementos sangüíneos aderidos.

Ruggeri Jr et al.¹⁰¹ (2007) estudaram as características do colágeno, por meio de análise imunohistoquímica, nas superfícies dentinárias expostas à doença periodontal após biomodificação com ácido cítrico a 10% e EDTA a 17% (ambos aplicados por fricção suave, com pincel por 2 minutos, seguido da lavagem dos espécimes com água destilada por 3 minutos) em fragmentos de 21 dentes humanos extraídos por doença periodontal e instrumentados com instrumentos manuais ou ultra-sônicos previamente ao condicionamento. Os resultados mostraram que somente o ácido cítrico removeu completamente a “smear layer”, bem como os espécimes tratados com esta substância apresentaram marcação mais intensa para colágeno tipo I e proteoglicanas, independente da instrumentação. Os autores concluem que o condicionamento radicular com ambas as substâncias permitiram a preservação das propriedades bioquímicas e estruturais da matriz dentinária, no entanto a aplicação de ácido cítrico por 2 minutos proporcionaram maior exposição de túbulos dentinários e fibras colágenas que correspondem a colágeno tipo I e proteoglicanas.

PROPOSIÇÃO

Foi objetivo neste estudo 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.

MATERIAL E MÉTODO

O projeto da presente pesquisa foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP (Protocolo CEP-FO/CAR nº 31/06) (Anexo 1).

Obtenção dos dentes

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

Os dentes utilizados foram mantidos em solução fisiológica até o momento do preparo das amostras 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 seqüência.

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 1). 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 2). 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 3).

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 4). 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).

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 5 e 6). Um corte longitudinal ao longo eixo do dente e paralelo às áreas de trabalho foi realizado com intuito de separá-las (Figura 7). Finalmente, um corte transversal no segundo sulco separou os espécimes (Figura 8).

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 9).

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 10A); **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 10B); **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 10C). 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.

Além disso, as soluções nos seus modos de aplicação avaliados foram utilizadas por três diferentes tempos: a) um minuto; b) dois minutos e c) três minutos.

Ao final da aplicação, os espécimes foram irrigados com 10 mL de água destilada utilizando-se uma seringa descartável de 10 mL (Becton Dickinson, São Paulo – SP) e sua respectiva agulha.

Para cada tempo de aplicação foram utilizadas 5 espécimes, sendo 3 diferentes tempos para cada forma de aplicação. Assim foram avaliados 45 espécimes para cada concentração, perfazendo um total de 270 espécimes no estudo.

Quadro 1 - Distribuição dos espécimes de acordo com a concentração, tempo e modo de aplicação empregados

Grupo	Passiva			Fricção Vigorosa			Fricção Suave			Total
	Tempo de Aplicação									
	1'	2'	3'	1'	2'	3'	1'	2'	3'	
I	5	5	5	5	5	5	5	5	5	45
II	5	5	5	5	5	5	5	5	5	45
III	5	5	5	5	5	5	5	5	5	45
IV	5	5	5	5	5	5	5	5	5	45
V	5	5	5	5	5	5	5	5	5	45
VI	5	5	5	5	5	5	5	5	5	45
Total	30	30	30	30	30	30	30	30	30	270

Os tempos de aplicação foram marcados com a utilização de um cronômetro. Para a lavagem dos espécimes foram utilizados 10 mL de solução fisiológica 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 seqüencial em concentrações crescentes de álcool etílico (30%, 50%, 70%, 80%, 95% e 100%) (Figura 11A), 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 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 μ L) de álcool etílico absoluto misturada a uma parte (800 μ L) de HMDS. Os espécimes ficaram imersos por 30 minutos e foram transferidos para outro orifício contendo apenas HMDS (1600 μ L), no qual permaneceram por 10 minutos (Figuras 11B e 11C). 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 μ 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 12).

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 13). Os “stubs” foram levados a um dessecador a vácuo por 24 horas para completa remoção da umidade e preservação até a metalização. (Figura 14). Na seqüência, 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 15).

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.



Figura 1 - Seleção dos dentes.

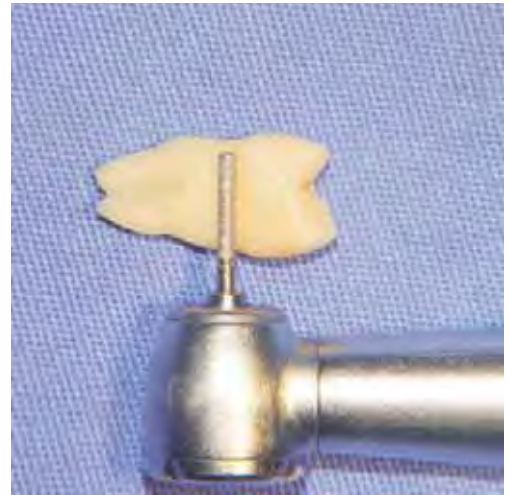


Figura 2 - Demarcação dos sulcos



Figura 3 - Área de trabalho.



Figura 4 - Raspagem e alisamento radicular.

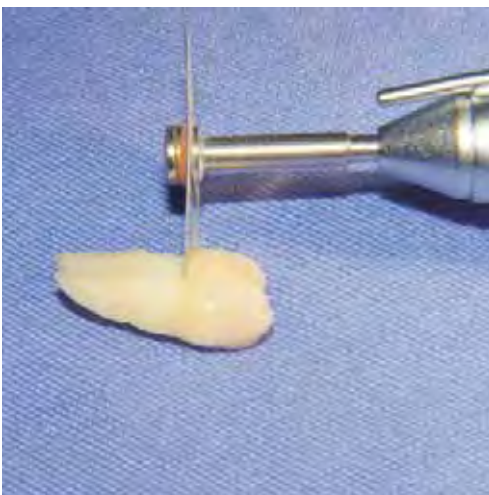


Figura 5 - Corte transversal ao longo eixo do dente, na altura do primeiro sulco.



Figura 6 - Coroa seccionada.

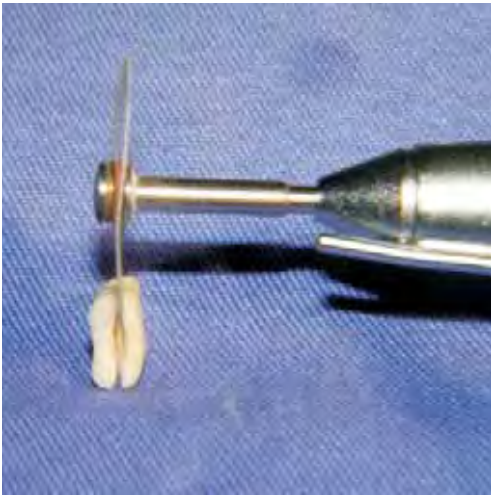


Figura 7 - Corte longitudinal ao longo eixo do dente, separando as faces preparadas.

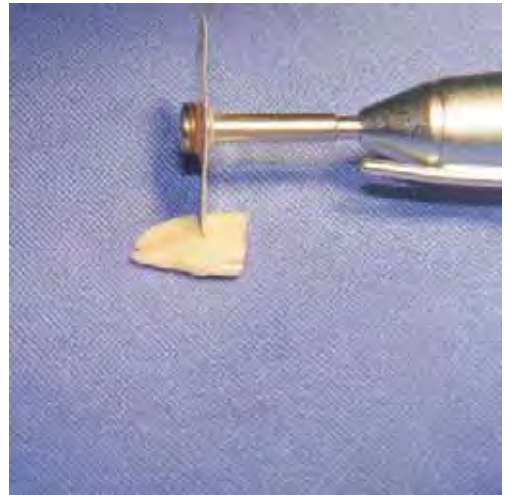


Figura 8 - Corte transversal ao longo eixo do dente, na altura do segundo sulco.



Figura 9 - Espécimes preparados.



FIGURA 10 - A) Aplicação passiva. B) Fricção Vigorosa. C) Fricção Suave.



FIGURA 11 - A) Desidratação em concentrações crescentes de álcool. B e C) Placas de acrílico codificadas para aplicação do HMDS.

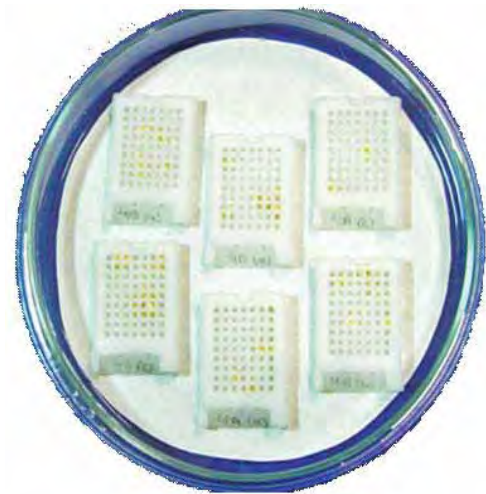


Figura 12 - Secagem em papel de filtro.



Figura 13 - Espécime tratado, colado em "stub" metálico.



Figura 14 - Dessecador a vácuo.



Figura 15 - Espécime metalizado.

Análise das fotomicrografias

As fotomicrografias obtidas foram avaliadas por um único examinador cego treinado e calibrado²⁵ (Kappa = 0.93) (Tabela A1 do Anexo 2) que atribuiu os graus de remoção de “smear layer” e exposição de fibras colágenas segundo o “Índice de Remoção de *Smear Layer*” proposto por Sampaio¹⁰⁴ (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.

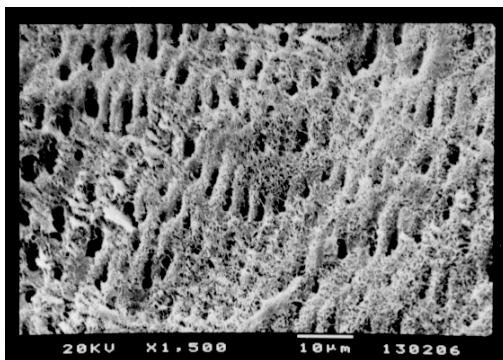


FIGURA 16 - Fotomicrografia com aumento de 1500x representando o grau 1.

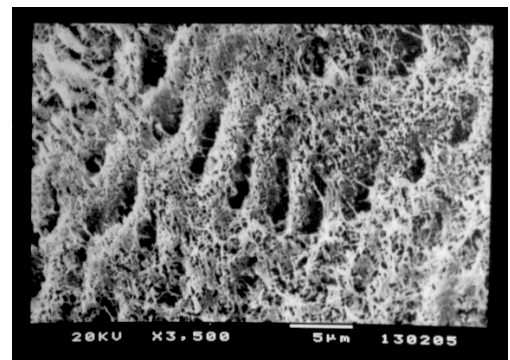


FIGURA 17 - Fotomicrografia com aumento de 3500x representando o grau 1.

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

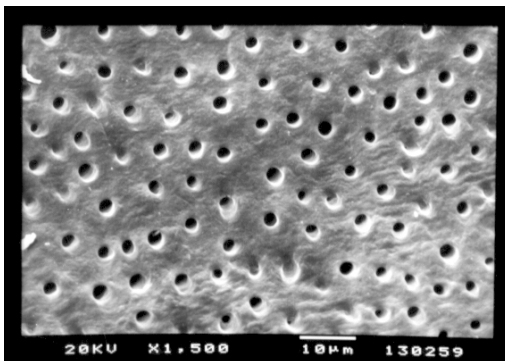


FIGURA 18 - Fotomicrografia com aumento de 1500x representando o grau 2.

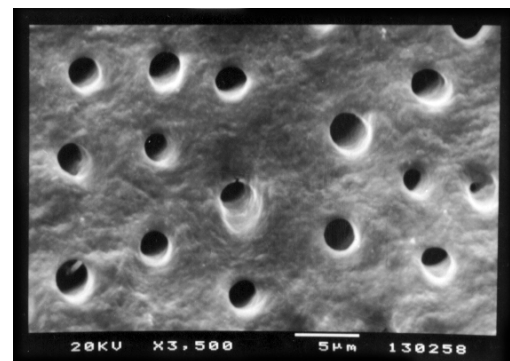


FIGURA 19 - Fotomicrografia com aumento de 3500x representando o grau 2.

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

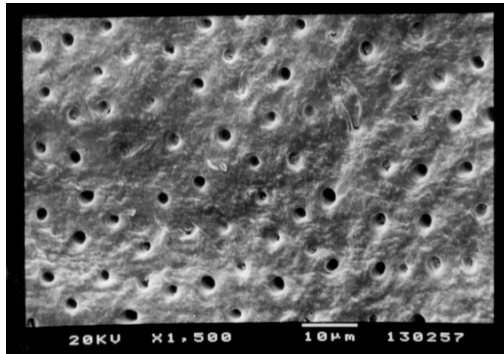


FIGURA 20 - Fotomicrografia com aumento de 1500x representando o grau 3

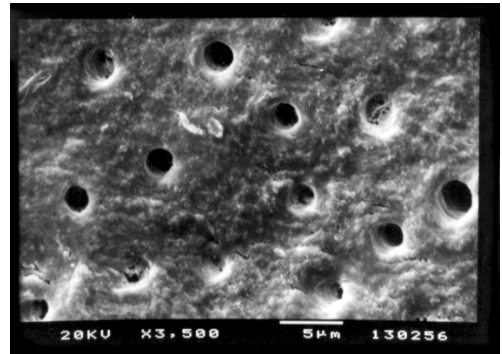


FIGURA 21 - Fotomicrografia com aumento de 3500x representando o grau 3.

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

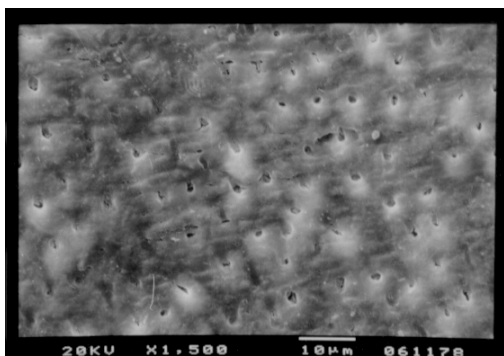


FIGURA 22 - Fotomicrografia com aumento 1500x representando o grau 4.

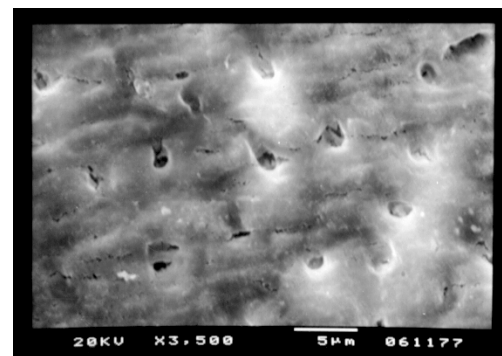


FIGURA 23 - Fotomicrografia com aumento de 3500x representando o grau 4.

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

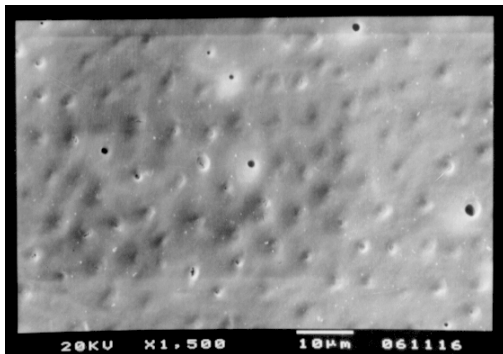


FIGURA 24 - Fotomicrografia com aumento de 1500x representando o grau 5.

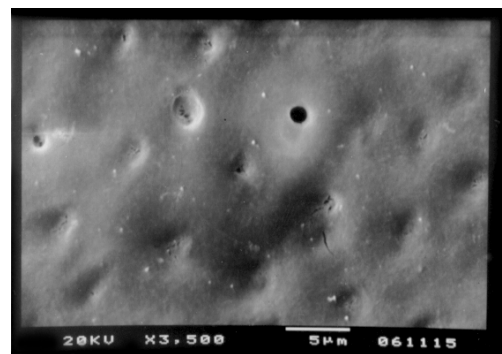


FIGURA 25 - Fotomicrografia com aumento de 3500x representando o grau 5.

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

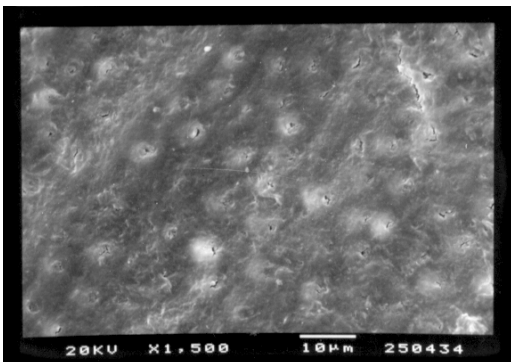


FIGURA 26 - Fotomicrografia com aumento de 1500x representando o grau 6.

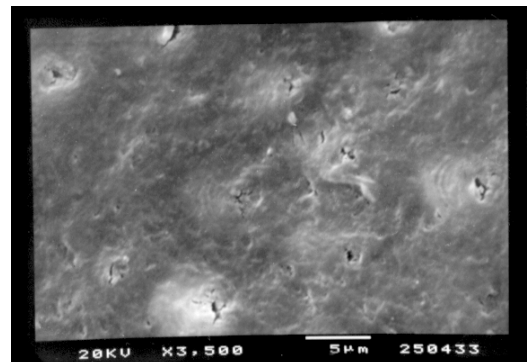


FIGURA 27 - Fotomicrografia com aumento de 3500x representando o grau 6.

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

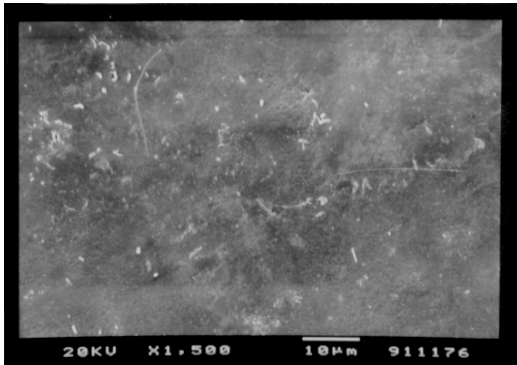


FIGURA 28 - Fotomicrografia com aumento de 1500x representando o grau 7.

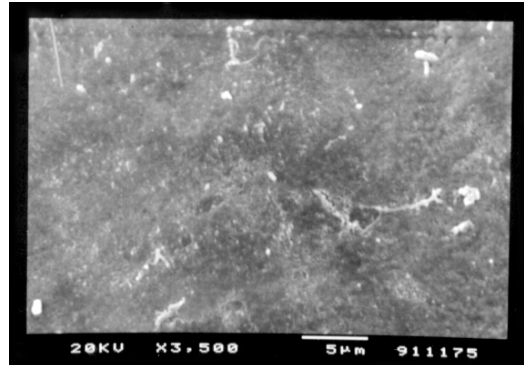


FIGURA 29 - Fotomicrografia com aumento de 3500x representando o grau 7.

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

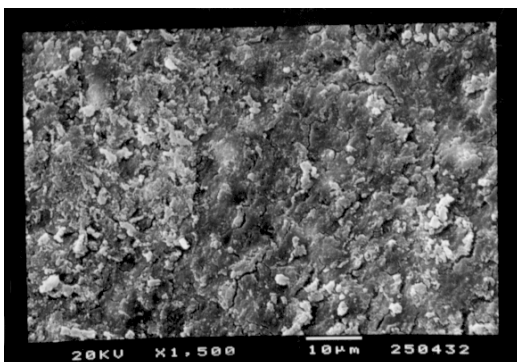


FIGURA 30 - Fotomicrografia com aumento de 1500x representando o grau 8.

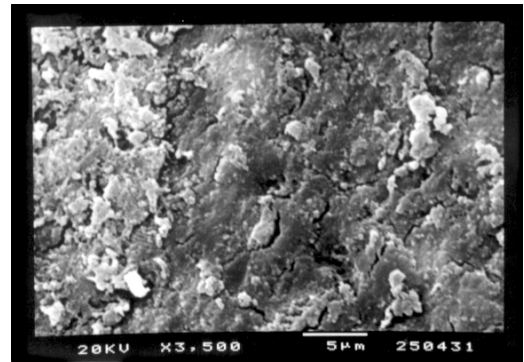


FIGURA 31 - Fotomicrografia com aumento de 3500x representando o grau 8.

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

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

Análise Estatística

O pequeno número de espécimes em cada grupo e o grande número de repetição de determinados escores limitaram a aplicação dos testes estatísticos. Portanto, agrupamos os escores que apresentam características semelhantes. Assim, foram agrupados os escores 1 e 2 (os quais representam ausência de smear layer), os escores 3 e 4 (os quais representam remoção parcial de smear layer) e os escores 6, 7 e 8 (os quais representam presença de smear layer). O escore 5 não foi agrupado com nenhum outro, pois representa hiperdesmineralização.

Foram, então, comparadas as proporções desses grupos de escores por meio de teste binomial, com o auxílio do programa BioEstat 4.0.

RESULTADO

A Tabela 2 ilustra a distribuição de todos os espécimes avaliados neste estudo. De acordo com esta Tabela, a distribuição dos escores, segundo o índice de remoção de “smear layer”^{*} para as diferentes concentrações de ácido cítrico, mostrou que a concentração mais eficaz na exposição de fibras colágenas foi a de 25%, com a produção de 12 espécimes com escore 1 (remoção da “smear layer” com exposição das fibras colágenas), representando 26,67% dos espécimes desse grupo; seguida das concentrações de 15% com 4 espécimes (8,89% dos espécimes desse grupo) e 1% com 3 espécimes (6,67% dos espécimes desse grupo). As concentrações de 0,5% e 2%, bem como o grupo controle, não produziram espécimes com escore 1.

Os escores 2 e 3 representaram poucos espécimes nas concentrações estudadas, portanto, não será descrita sua frequência.

O escore 4, no qual temos abertura parcial dos túbulos dentinários, distribuiu-se de tal maneira que, no grupo controle observamos apenas 2 espécimes; na concentração de 0,5% temos 14 espécimes (31,11% dos espécimes desse grupo); na concentração de 1% temos 7 espécimes (15,56% dos espécimes desse grupo); na concentração de 15% temos 15 espécimes (33,33% dos espécimes); não sendo observado nas concentrações de 15 e 25%.

* O índice de remoção de “smear layer” proposto por Sampaio¹⁰⁴ (1999) e modificado para este trabalho possui escores que vão de 1 a 8 em ordem decrescente de benefício.

O escore 5 (caracterizado por hiperdesmineralização) foi encontrado em todas as concentrações testadas e no grupo controle, no qual observamos 7 espécimes (15,56% dos espécimes); a concentração de 0,5% apresentou 14 espécimes (31,11% dos espécimes); a concentração de 1% apresentou 24 espécimes (53,33% dos espécimes); a de 2% apresentou 25 espécimes (55,56% dos espécimes); a de 15% apresentou 38 espécimes (84,44% dos espécimes) e a de 25% apresentou 31 espécimes (68,89 dos espécimes).

Considerando-se os escores nos quais não houve remoção de “smear layer” (escores 6, 7 e 8) observamos na Tabela 2 que o grupo controle apresentou uma frequência bastante alta desses escores (36 espécimes – 80% dos espécimes desse grupo) seguido pelos grupos de 0,5% (15 espécimes – 33,34% dos espécimes desse grupo), 1% (8 espécimes – 17,78% dos espécimes) e 2% (3 espécimes – 6,67% dos espécimes).

Tabela 2 – Distribuição da frequência dos escores referentes aos diferentes graus de remoção de “smear layer” conforme a concentração, a forma e o tempo de aplicação do agente condicionante

	Controle	0,5%	1%	2%	15%	25%
1.	4F3	2F3	1N1	2P1	1P2	1P1
2.	4F3	3F1	1N1	3N1	1P2	1N1
3.	5F1	4P1	1N1	4P1	1P3	1N1
4.	5F1	4P1	3P3	4P1	1N3	1N1
5.	5F1	4P2	3P3	4P2	2N2	1N2
6.	5F2	4P2	3N1	4P2	3P1	1N2
7.	5F2	4P2	4P2	4P2	3P3	1N3
8.	5F3	4P3	4P2	4P2	5P1	1N3
9.	5F3	4P3	4P2	4P2	5P1	1N3
10.	6P1	4P3	4P2	4P3	5P1	1N3
11.	6P2	4N3	4P3	4P3	5P1	1N3
12.	6P2	4N3	4P3	4P3	5P2	1F3
13.	6P2	4F1	4P3	4N1	5P2	2P3
14.	6P3	4F2	5N1	4N1	5P2	3P3
15.	6P3	4F2	5N2	4N2	5P3	5P1
16.	6N1	4F3	5N2	4N2	5P3	5P1
17.	6N1	5P3	5N2	4N2	5P3	5P1
18.	6N1	5N2	5N2	5P3	5N1	5P1
19.	6N2	5N2	5N2	5N1	5N1	5P2
20.	6N2	5N2	5N3	5N1	5N1	5P2
21.	6N2	5N3	5N3	5N2	5N1	5P2
22.	6N2	5N3	5N3	5N2	5N1	5P2
23.	6N3	5N3	5N3	5N3	5N2	5P2
24.	6N3	5F1	5F1	5N3	5N2	5P3
25.	6N3	5F1	5F1	5N3	5N2	5P3
26.	6N3	5F1	5F1	5N3	5N2	5P3
27.	6N3	5F2	5F1	5N3	5N3	5N1
28.	6F1	5F2	5F2	5F1	5N3	5N1
29.	6F1	5F2	5F2	5F1	5N3	5N2
30.	6F2	5F3	5F2	5F1	5N3	5N2
31.	6F2	6P1	5F2	5F1	5F1	5N2
32.	6F2	6P1	5F2	5F1	5F1	5F1
33.	6F3	6P2	5F3	5F2	5F1	5F1
34.	7P1	6P2	5F3	5F2	5F1	5F1
35.	7P1	6P3	5F3	5F2	5F1	5F1
36.	7P1	6N1	5F3	5F2	5F2	5F1
37.	7P1	6N1	5F3	5F2	5F2	5F2
38.	7P2	6N1	6P1	5F3	5F2	5F2
39.	7P2	6N1	6P1	5F3	5F2	5F2
40.	7P3	6N2	6P2	5F3	5F2	5F2
41.	7P3	6N2	7P1	5F3	5F3	5F2
42.	7P3	6F3	7P1	5F3	5F3	5F3
43.	7N1	8P1	7N3	6P1	5F3	5F3
44.	7N1	8N1	7F1	6P1	5F3	5F3
45.	7N2	8F3	8P1	6P3	5F3	5F3

escore 1
escore 2
escore 3
escore 4
escore 5
escore 6
escore 7
escore 8

Legenda: **escore** (1-8), **forma de aplicação** (passiva (P), fricção vigorosa (F), fricção suave (N)) e **tempo de aplicação**(1-3)

Nos Gráficos 1 a 4 estão agrupados os espécimes de acordo com a semelhança de características dos escores.

No Gráfico 1 estão representados os escores 1 ou 2 (túbulos dentinários abertos com e sem exposição de fibras colágenas), que aparecem com maior frequência na concentração de 25%, sendo significativamente diferente das demais.

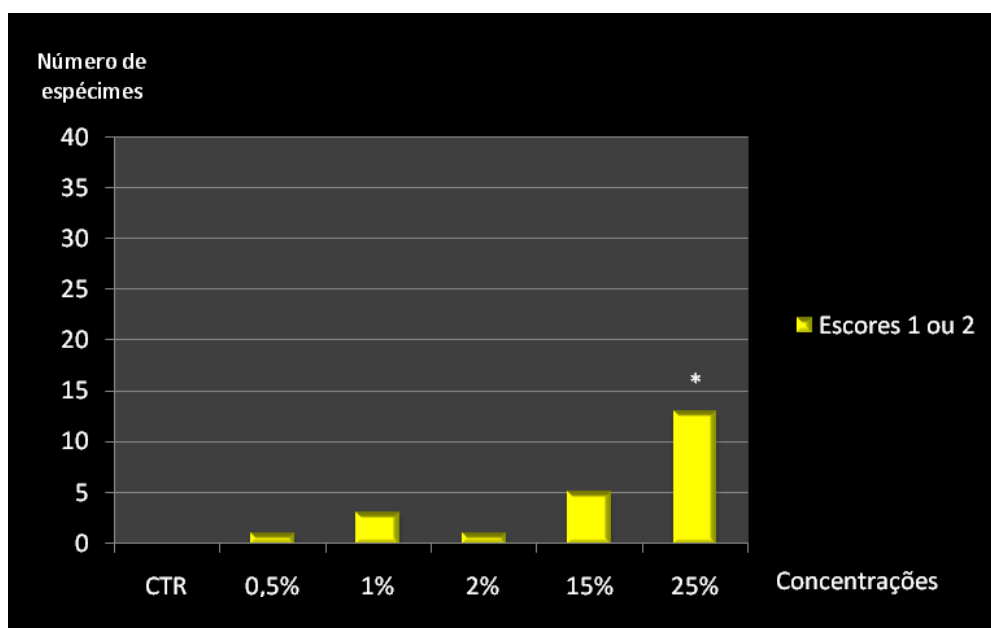


GRÁFICO 1 - Distribuição dos espécimes com escores 1 ou 2 para as concentrações testadas e grupo controle (CTR).

*Diferenças significantes quando comparado com as concentrações de 0.5, 1, 2, 15% e o grupo controle ($p < 0.05$).

No Gráfico 2 estão representados os escore 3 ou 4 (abertura parcial dos túbulos dentinários).

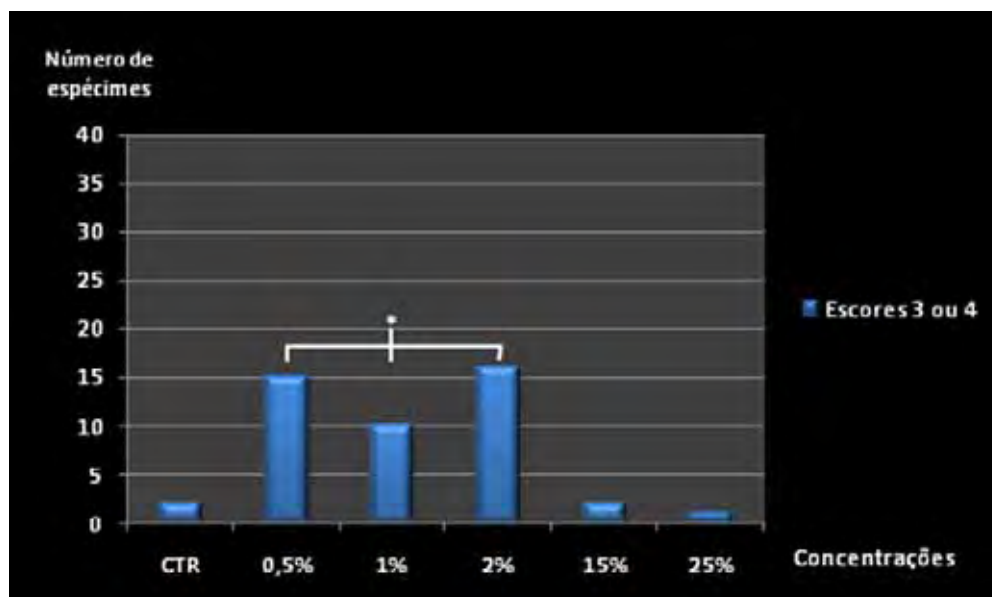


GRÁFICO 2 - Distribuição dos espécimes com escores 3 ou 4 para as concentrações testadas e grupo controle (CTR).

*Diferença não significativa entre as concentrações de 0.5, 1 e 2%. Diferença significativa destas quando comparadas às concentrações de 15, 25% e grupo controle ($p < 0.05$).

No Gráfico 3 está representado a distribuição do escore 5 (hiperdesmineralização). Observamos que menos espécimes foram obtidos nos grupos controle e 0.5%, sem diferenças estatísticas entre ambos, no entanto significativamente diferentes das demais concentrações. Sendo que, as que mais produziram espécimes com hiperdesmineralização foram as de 15% e 25%, sem diferenças significantes entre ambas.

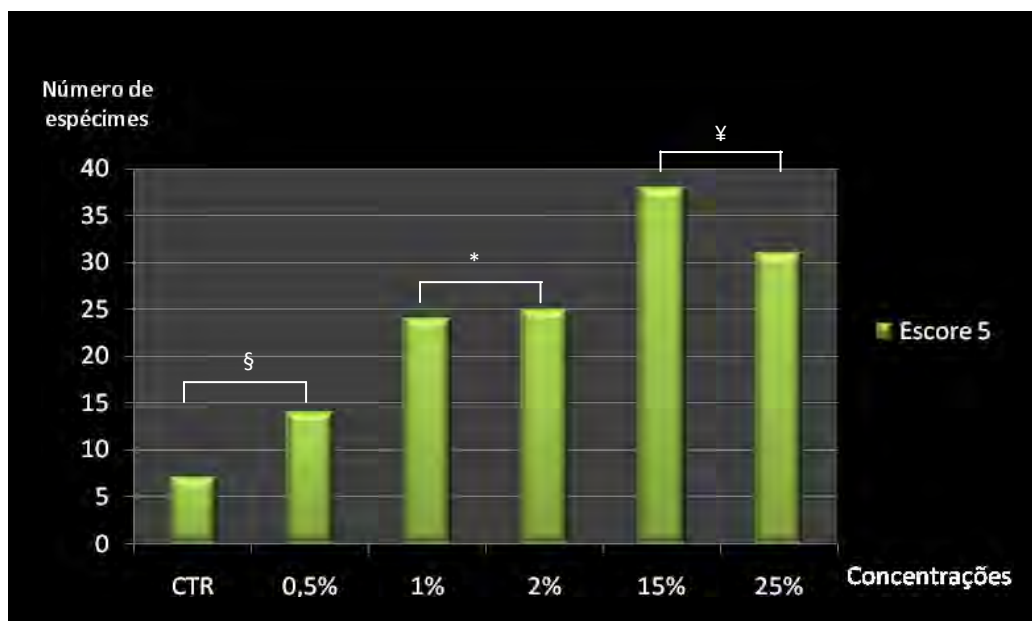


GRÁFICO 3 - Distribuição dos espécimes com escore 5 para as concentrações testadas e grupo controle (CTR).

§Diferenças não significantes entre o grupo controle e a concentração de 0.5%. Diferenças significantes destas quando comparadas às concentrações de 1, 2, 15 e 25% ($P<0.05$)

*Diferenças não significantes entre as concentrações de 1 e 2%. Entretanto, diferenças significantes entre as concentrações quando comparadas às concentrações de 0.5, 15, 25% e grupo controle ($p<0.05$).

¥Diferenças significantes quando comparadas às concentrações de 0.5, 1, 2 e grupo controle ($p<0.05$). Diferenças não significantes entre as concentrações de 15 e 25% ($p<0.05$).

No Gráfico 4 está representada a distribuição dos espécimes que apresentaram presença de “smear layer” (escores 6, 7 ou 8). O grupo controle produziu a maioria dos espécimes com presença de “smear layer”, com diferenças significantes das concentrações de 0.5, 1 e 2%.

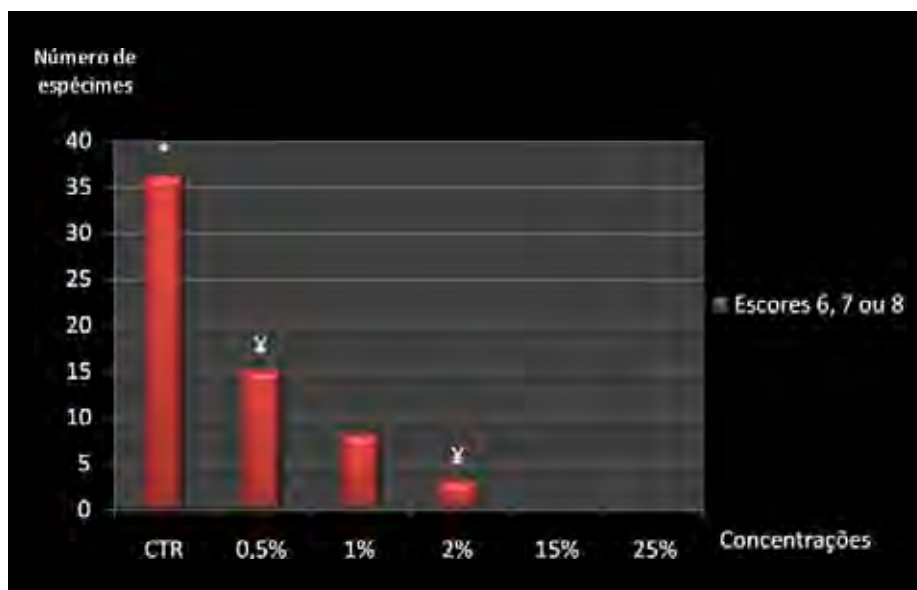


GRÁFICO 4 - Distribuição dos espécimes com escores 6, 7 ou 8 para as concentrações testadas e grupo controle (CTR).

*Diferenças significantes quando comparado com as concentrações de 0.5, 1 e 2% ($p < 0.05$).

‡Diferenças significantes entre as concentrações de 0.5 e 2% e diferenças não significantes quando comparadas a concentração de 1% ($p < 0.05$).

Para analisar a forma de aplicação, comparamos dentro das concentrações de 15% e 25% (Gráfico 5), as quais produziram mais espécimes com escore 1 ou 2. Excluímos a forma de aplicação “fricção”, visto que esta foi responsável por apenas 1 espécimes com escore 1 ou 2 na concentração de 25% e nenhum espécime na concentração de 15%.

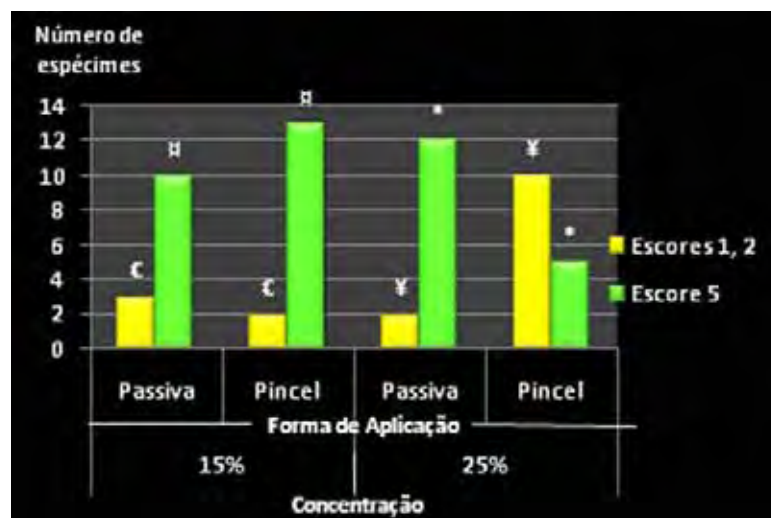


GRÁFICO 5 - Distribuição dos espécimes relativos aos escores 1, 2 e escore 5 dentro das concentrações de 15 e 25%.

¥ * Diferenças significantes quando comparadas as formas de aplicação “passiva” e “fricção suave” (pincel) ($p < 0.05$).

€ ✕ Diferenças não significantes.

Dentro da concentração de 25%, observamos uma diferença de proporções significativamente diferente entre as formas de aplicação “Fricção suave” e “Passiva” para os escores 1 ou 2 e para o escore 5. Nenhuma diferença foi encontrada entre os escores dentro da concentração de 15%.

O Gráfico 6 representa a distribuição dos espécimes dentro da concentração de 25%, para as formas de aplicação passiva e fricção suave, e nos diferentes tempos de aplicação. Podemos observar que a aplicação por fricção suave com pincel produziu maior número de espécimes com escore 1 ou 2.



GRÁFICO 6 - Distribuição dos espécimes segundo os diferentes tempos, dentro das formas de aplicação "Passiva" e "Pincel" na concentração de 25%.

Todas as concentrações, apresentaram espécimes com hiperdesmineralização (escore 5), num total de 139 espécimes. A concentração de 15% apresentou maior número de espécimes com escore 5, seguida das concentrações de 25, 2, 1, 0.5% e o grupo controle (Tabela 3).

Com relação às formas de aplicação, a mais prevalente entre os espécimes com escore 5 foi a por fricção, seguida pela aplicação por pincel e passiva (Tabela 3).

Com relação aos tempos de aplicação, os mais prevalentes entre os espécimes com escore 5 foi o tempo de 2 minutos, seguido por 3 minutos e 1 minutos (Tabela 3).

Tabela 3 – Distribuição da frequência do escore 5 nas concentrações, formas e tempos de aplicação do ácido cítrico.

*Diferenças significantes entre as formas de aplicação avaliadas, quando comparadas entre si ($p < 0.05$)

Concentrações						
	Controle	0.5	1	2	15	25
Frequência n(%)	7 (5,03)	14 (10,07)	24 (17,27)	25 (17,99)	38 (27,34)	31 (22,30)

Forma de aplicação			
	Passiva	Fricção suave	Fricção vigorosa
Frequência n(%)	24 (17,27) *	43 (30,93) *	72 (51,80) *C

Tempo de aplicação			
	1 minuto	2 minutos	3 minutos

Todas as concentrações, exceto o grupo controle, apresentaram espécimes com escore 1 ou 2 (23 espécimes no total) . A concentração que apresentou maior número de espécimes foi a de 25%, seguida das demais concentrações (Tabela 4).

Com relação a forma de aplicação, a que teve maior prevalência de espécimes com escores 1 ou 2 foi a aplicação com pincel (Tabela 4).

Com relação ao tempo, o que teve maior prevalência de escores 1 ou 2 foi o tempo de 3 minutos, seguido por 1 minuto e 2 minutos (Tabela 4).

Tabela 4 – Distribuição da frequência dos escores 1 ou 2 nas concentrações, formas e tempos de aplicação do ácido cítrico

*Diferenças significantes quando comparada com a aplicação passiva e fricção vigorosa (p<0.05)

Concentrações					
	0.5%	1%	2%	15%	25%
Frequência n(%)	1 (4,35)	3 (13,04)	1 (4,35)	5 (21,74)	13 (56,52)

Forma de aplicação			
	Passiva	Fricção suave	Fricção vigorosa
Frequência n(%)	6 (26,09)	15 (65,22) *	2 (8,69)

Tempo de aplicação			
	1 minuto	2 minutos	3 minutos
Frequência n(%)	8 (34,78)	5 (21,74)	10 (43,48)

DISCUSSÃO

O principal objetivo, e também um grande desafio da terapia periodontal regenerativa, é obter inserção de novo tecido conjuntivo às superfícies radiculares previamente expostas à doença periodontal, ou mesmo a cavidade bucal pela presença de recessões gengivais. Na literatura ainda há discussão a respeito da necessidade da remoção completa de *smear layer* e exposição de fibras colágenas para se obter nova inserção dos tecidos periodontais.

Albair et al.⁴ mostraram que é possível obter nova inserção sem remover completamente o cimento radicular. No entanto, outros estudos mostraram que para haver regeneração dos tecidos periodontais, perdidos ou modificados pela doença periodontal, é necessária a remoção completa da placa bacteriana, cálculo e endotoxinas bacterianas presentes na superfície radicular contaminada^{46,49,64}.

A raspagem e alisamento radicular são considerados meios eficazes de remoção de depósitos mineralizados da superfície radicular^{46,124}. Contudo, a ação mecânica dos instrumentos sobre a superfície radicular dos dentes afetados por doença periodontal resulta na formação de “*smear layer*”^{17,78,104}, por outro lado, estudos mostram a presença de endotoxinas e bactérias na superfície radicular, e também penetrando túbulos dentinários^{2,3,5,38,49}, havendo necessidade de terapias complementares.

Assim, foram propostas alternativas adicionais para tratamento da superfície radicular com a utilização de substâncias químicas capazes de remover “smear layer” e descontaminar esta superfície³⁸. Os primeiros agentes químicos utilizados no condicionamento radicular eram substâncias de caráter ácido (ácido sulfúrico e ácido clorídrico), os quais foram propostos empiricamente por Stewart¹²² (1899) e posteriormente os ácidos hidrocloreto, láctico, cítrico, fosfórico, tricloroacético e fórmico passaram a ser estudados cientificamente por Register^{95,96,97}. Entretanto, os bons resultados obtidos com o ácido cítrico por este autor não foram reproduzidos em outros estudos, além do que se observaram algumas desvantagens na utilização desta substância, como necrose superficial dos tecidos periodontais^{13,14,18,27,35,52,68,113}.

Outras substâncias foram propostas para serem utilizadas em substituição ao ácido cítrico. Uma delas, o cloridrato de tetraciclina, aproveitando suas características de adsorção à superfície radicular e inibição da collagenase^{50,58,126}. E outra, o EDTA (ácido etilenodiaminotetracético), cuja grande vantagem sobre as substâncias anteriormente citadas é o pH neutro^{15,16,18,105}.

As vantagens do uso das tetraciclina na biomodificação radicular foram questionadas por Ben-Yehouda¹¹ (1997) em um relato de caso isolado de reabsorções cervicais progressivas em dentes humanos relacionadas ao condicionamento radicular com tetraciclina. Polson,

Proye⁸⁹ (1982) e Caffesse et al.²⁶ (1985) observaram, em avaliações histológicas, lacunas de reabsorção não ativas em dentes de macacos e cães *Beagle* tratados com ácido cítrico. No entanto, dentes tratados com ácido cítrico e fibronectina não apresentaram sinais de reabsorção²⁶.

A maioria das metodologias avaliadas não contempla diferentes concentrações do ácido cítrico, havendo muitas diferenças metodológicas entre os estudos. Observamos neste trabalho uma variação de pH entre as concentrações estudadas e mesmo assim as concentrações mais baixas utilizadas apresentaram pH bastante baixo, como mostra a Tabela 1, o que segundo Blomlöf, Lindskog¹⁴ (1995), Blomlöf et al.¹⁸ (1996), Lan et al.⁶⁸ (1999), leva a efeitos citotóxicos os tecidos periodontais. Por outro lado, há estudos em que não há comprometimento dos tecidos periodontais^{100,108,131}, bem como observamos bons resultados obtidos em trabalhos de adesão de coágulo e elementos sangüíneos^{70,117}, e também na evidenciação de colágeno, por meio de técnicas imunohistoquímicas, em superfícies radiculares que apresentaram manutenção da integridade das fibras do tipo I após tratamento com ácido cítrico e ácido fosfórico, apesar do baixo pH apresentado por essas substâncias^{22,23}.

O colágeno fornece uma matriz extracelular capaz de ser colonizada por células, o que permitiu sua aplicação em aloenxertos para recuperação de áreas acometidas por queimaduras,¹²⁹ com alto potencial de promover agregação plaquetária^{24,102,128} e estabilização do coágulo por

meio da formação de uma rede de fibrina, o que o torna largamente utilizado na medicina para obtenção desses benefícios. Na periodontia, a presença de uma rede de fibrina e formação de um coágulo estável sobre a superfície dentinária são requisitos fundamentais para restabelecimento de nova inserção conjuntiva em procedimentos periodontais regenerativos, pois se acredita que o coágulo possa atrasar a migração apical do epitélio, evitando assim a formação de um epitélio juncional longo e permitindo que possa haver diferenciação celular necessária para formação de nova inserção^{9,14,89,90,99,114}.

A matriz colágena da dentina, quando exposta por agentes biomodificadores, parece exercer papel fundamental nos processos regenerativos periodontais, pois o colágeno tipo I presente nessa matriz parece ser quimiotático para neutrófilos polimorfonucleares, macrófagos e fibroblastos^{92,110}, bem como promove um substrato para formação de uma rede de fibrina^{75,112} e propicia condições para adesão e migração de fibroblastos⁴⁸.

Shuman¹⁰⁹ (2000) mostrou que a exposição de fibras colágenas favorece duas etapas da formação do coágulo: a primeira é a atuação na ativação da cascata de coagulação que dá origem a rede de fibrina; a segunda é a indução da adesão, agregação e degranulação plaquetária, resultando na formação e maturação do trombo. Inicialmente ocorre a deposição de uma camada protéica, seguida pela formação e estabilização da rede de fibrina devido à estimulação da degranulação

plaquetária. A morfologia e o grau de maturação dessa rede resultam na quantidade de eritrócitos aderidos à superfície. É importante ressaltar que a ativação das plaquetas leva não só a formação do trombo, mas também, a liberação de moléculas biologicamente ativas que influenciam no processo de reparo tecidual⁵⁷.

Baseando-se na literatura pertinente, nos parece evidente a importância de se obter uma superfície livre de “smear layer” e com fibras colágenas íntegras nas tentativas de regeneração periodontal.

Em nosso trabalho procuramos padronizar a metodologia utilizada da melhor maneira possível, a fim de evitar que variáveis pudessem interferir no estudo.

Os dentes utilizados neste estudo foram obtidos junto ao Banco de Dentes da FOAr e estavam armazenados em solução fisiológica, o que segundo Hawkins et al.⁵⁵ (1997) não influencia nos estudos desta natureza, desde que a solução fisiológica seja trocada semanalmente.

Um cuidado importante não observado em alguns estudos foi quanto a remoção do cimento radicular, visto que um trabalho de Coldiron et al.³⁴ (1990) mostrou por meio de MEV que 70 movimentos de raspagem e alisamento radicular com instrumentos manuais não foram capazes de remover completamente o cimento, permanecendo fragmentos remanescentes em vários pontos da superfície radicular.

Considerando que, ao microscópio eletrônico de varredura, a dentina e o cimento são estruturas bastante semelhantes e pudesse ser um fator de confundimento na avaliação dos resultados de nosso estudo, realizamos a remoção (do cimento) com fresa cilíndrica diamantada em alta rotação associada a 50 movimentos de raspagem¹⁰⁴. Esse procedimento nos garantiu a remoção completa do cimento radicular e criação de “smear layer”.

A visualização dos espécimes por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) requer que os mesmos sejam cobertos por um metal condutor de elétrons, em nosso caso o ouro, sem que haja alteração da superfície radicular tratada. Os estudos realizados anteriormente utilizaram o ponto crítico com CO₂ líquido^{29,32,47,53,91,115,116,118,119,125}, o que segundo Perdigão et al.⁸⁷ (1995) não é um método adequado para visualização das fibras colágenas. De acordo com este autor e também com a concordância de Gusnard, Kirschner⁵¹ (1977), Nation⁸¹ (1983) e Bray et al.²¹ (1993), a desidratação com HMDS (hexametildisilazane) após desidratação em concentrações crescentes de álcool etílico é mais rápida e indicada para estudos de avaliação da superfície radicular nos quais busca-se visualização de fibras colágenas em MEV, visto que o HMDS preserva a microporosidade da superfície dentinária desmineralizada e a rede de fibras colágenas, impedindo o colapamento das mesmas. Em nosso estudo utilizamos o

HMDS para evidenciação das fibras colágenas, estando certos da preservação da sua integridade quando observadas em MEV.

Os resultados expressos na Tabela 2 mostram que o grupo controle (solução fisiológica) não mostrou eficácia na remoção da “smear layer” e também as concentrações de 0,5 e 1% apresentaram maior número de espécimes com presença e poucos livres de “smear layer”. Ao observarmos os Gráficos 1 e 2, constatamos uma tendência de aumento de espécimes livres de “smear layer” (escores 1, 2, 3 ou 4) com o aumento da concentração do ácido cítrico. Estes resultados já eram esperados e também encontrados nos trabalhos de Codelli et al.³² (1991), Sterrett et al.^{116,119} (1989), Polson et al.⁹¹ (1984), Wen et al.¹²⁵ (1992) e por Labahn et al.⁶⁶ (1992).

O trabalho de Sterret et al.¹²⁰ (1991) mostra por meio da avaliação de remoção de íons cálcio da dentina desmineralizada, que baixas concentrações de ácido cítrico não são capazes de promover uma desmineralização eficiente da superfície radicular. Este Resultado também observado em nosso estudo e apresentado nos Gráficos 2 e 4, o qual nos mostra que concentrações mais baixas de ácido cítrico (0.5%, 1% e 2%) apresentam número significativo de amostras com presença de “smear layer” (principalmente escores 6, 7 e 8, na concentração de 0.5% e escores 3 e 4, que aparecem em quantidade numericamente semelhante nas concentrações de 0.5, 1 e 2%). Provavelmente houve influência da forma de aplicação na obtenção dos diferentes escores.

Sterrett et al.¹¹⁸ (1995) estudou a influência do modo de aplicação na desmineralização dentinária. Os autores observaram que fricção vigorosa e fricção suave foram semelhantes entre si, sendo ambas mais eficientes que a aplicação passiva. Outros estudos^{116,118}, mostraram que a aplicação por fricção foi superior, proporcionando exposição de fibras colágenas. Nosso estudo, em concordância com Wen et al.¹²⁵ e Bergenholtz, Babay¹² (1998), mostrou uma tendência de que a aplicação por fricção vigorosa produza mais espécimes com hiperdesmineralização (Tabelas 2 e 3). No trabalho de Codelli et al.³², o tempo de aplicação foi fator determinante na produção de espécimes com hiperdesmineralização, estando estes presentes quando tratados por fricção por 5 minutos. O Gráfico 3 também nos mostra uma tendência de aumento desse escore com o aumento da concentração. Além disso, podemos observar, na Tabela 2, que a maioria dos espécimes com hiperdesmineralização (escore 5) foi produzida pela aplicação por fricção vigorosa, mostrando que a ação mecânica, associada ao aumento da concentração do ácido cítrico remove a “smear layer”, mas ao mesmo tempo causa a destruição por diluição química das fibras colágenas, levando a um resultado indesejado visto que estudos mostram que é necessária a manutenção da integridade das fibras colágenas para aproveitamento das suas propriedades^{22,23,101}. O tempo parece não ter influenciado na produção de escore 5, tanto que as diferenças entre 1, 2 ou 3 minutos não foram significativas (Tabela 3).

Observamos a presença do escore 5 (hiperdesmineralização) no grupo controle (Tabela 2). Visto que foi utilizada solução fisiológica neste grupo, este seria um resultado que não poderia ter ocorrido. No entanto, ressaltamos que o examinador estava cego no momento da leitura das fotomicrografias e que o Índice de Remoção de Smear Layer é subjetivo, com semelhanças entre os escores 5 e 6. A Tabela 2 também nos mostra que todos os espécimes que receberam escore 5, nesse grupo, foram tratados com fricção que pode ter modificado o aspecto da “smear layer”, e como vimos anteriormente esta forma de aplicação está relacionada com a produção de superfícies indesejáveis também para as outras concentrações.

O cálculo de proporções dos espécimes que receberam escores 1 ou 2 entre as diferentes concentrações foi diferente estatisticamente das demais apenas para a concentração de 25%. Mesmo a proporção sendo estatisticamente igual entre as concentrações de 15% e as demais inferiores, decidimos compará-la com a de 25% pelo fato de numericamente a concentração de 15% possuir mais espécimes com escore 1 ou 2 que as concentrações inferiores. Resultados semelhantes foram obtidos por Sterrett et al.¹²⁰ (1991) e Sterrett et al.¹¹⁷ (1993) que encontraram um pico de remoção de smear layer e desmineralização dentinária para concentrações entre 25 e 30%.

O Gráfico 5 baseia-se na comparação das proporções entre os escores 5 e escore 1 ou 2 dentro das concentrações de 15 e

25%, que foram as mais efetivas para escores 1 ou 2 segundo o Gráfico 1. Mesmo a Tabela 4 nos mostrando que a aplicação por fricção suave foi superior às demais, comparamo-la com a aplicação passiva e excluimos a aplicação por fricção que na Tabela 3 apresentou maior número de espécimes com escore 5 em relação às outras formas de aplicação.

Para a concentração de 15%, observamos que não houve diferença estatística quando comparadas as proporções dos espécimes com escores 1 ou 2 e escore 5 entre as formas de aplicação passiva e fricção suave, bem como praticamente não houve diferença numérica entre os espécimes para esta concentração (Gráfico 5).

Por outro lado, dentro da concentração de 25% houve diferença estatística na comparação de proporções entre as formas de aplicação passiva e fricção suave (Gráfico 5). E notamos também uma diferença numérica com maior prevalência de espécimes de escore 1 ou 2 para a concentração de 25% e menor número de espécimes de escore 5. Resultado bastante favorável para a biomodificação radicular, com maior número de espécimes com fibras colágenas expostas em relação as outras concentrações e formas de aplicação. Resultado esse, semelhante ao obtido por Wen et al.¹²⁵ (1992) que também observou um padrão favorável de desmineralização e exposição de fibras colágenas quando aplicou o ácido cítrico por fricção suave por 5 minutos.

A concentração de 25% foi numérica e estatisticamente superior às demais na remoção de “smear layer” e exposição de fibras

colágenas. Dentro dessa concentração, comparamos a aplicação passiva e por fricção suave, excluindo a por fricção vigorosa, como mencionado. Dessa forma, comparando as formas de aplicação que propiciaram melhores resultados (passiva e fricção suave), observamos que, a por fricção suave foi responsável por mais amostras com fibras colágenas expostas que a aplicação passiva com valores estatisticamente significantes (Gráfico 5).

A Tabela 4 nos mostra a comparação entre todas as amostras que receberam escores 1 ou 2, mostrando que a aplicação por fricção suave foi significativamente diferente que as demais formas de aplicação, reafirmando os resultados mostrados no Gráfico 5.

Ao observarmos as Tabelas 3 e 4 no que diz respeito ao tempo de aplicação, notamos que não há diferença estatística entre os 3 tempos utilizados no estudo quanto a produção de espécimes com escores 5 e escores 1 ou 2.

Na comparação dos diferentes tempos de aplicação dentro do Gráfico 6, não foi aplicado teste estatístico devido ao pequeno número de espécimes envolvidos (15 espécimes no total). No entanto notamos a superioridade numérica em relação a aplicação por 3 minutos, resultado que corrobora com os obtidos por Sterrett et al.¹¹⁷ (1993) e Ruggeri et al.¹⁰¹ (2007), que também observaram resultados favoráveis na preservação das características bioquímicas do colágeno tipo I com aplicação de ácido cítrico por fricção suave por 2 minutos.

Os autores, Sterrett, Murphy¹¹⁶ (1989) e Wen et al.¹²⁵ (1992), recomendaram a aplicação do ácido cítrico por 5 minutos, no entanto acreditamos que o contato por tempo tão elevado de uma substância de pH baixo e com grande citotoxicidade como o ácido cítrico pode ser prejudicial aos tecidos periodontais^{13,14,18,68}.

Portanto, parece-nos indicado que a aplicação deva ser entre 2 ou 3 minutos, não excedendo este tempo afim de evitar os efeitos deletérios aos tecidos periodontais.

Afim de melhor avaliar a influência clínica da utilização do ácido cítrico, achamos oportuna a realização de estudos controlados em humanos com intuito de avaliar a influência do ácido cítrico em procedimentos para recobrimento radicular com aplicação apenas na superfície radicular exposta ao meio bucal, antes do rebatimento do retalho, evitando contato do ácido com os tecidos periodontais.

CONCLUSÃO

Considerando as limitações metodológicas e os resultados obtidos, pode-se concluir que:

- Concentrações baixas de ácido cítrico (0.5%, 1% e 2%) e soro fisiológico não foram eficientes na remoção de “smear layer” e exposição de fibras colágenas;
- A forma de aplicação por fricção vigorosa foi responsável por maior número de espécimes com hiperdesmineralização da superfície dentinária;
- A concentração de 25% aplicada por fricção suave por 3 minutos foi a de maior eficácia na biomodificação radicular, produzindo numericamente maior quantidade de espécimes com fibras colágenas expostas.

REFERÊNCIAS*

1. Abi Rached AD. Remoção de “smear layer” de superfícies radiculares, utilizando-se diferentes concentrações, modos e tempos de aplicação de cloridrato de tetraciclina. Avaliação por meio de microscopia eletrônica de varredura [dissertação mestrado]. 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. Albair WB, Cobb CM, Killoy WJ. Connective tissue attachment to periodontally diseased roots after citric acid demineralization. J Periodontol. 1982; 53: 515-26.
5. Aleo JJ, DeRenzis FA, Farber PA, Varboncoeur AP. The presence and biological activity of cementum-bound endotoxin. J Periodontol. 1982; 53: 515-25.
6. Allen DI, 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

7. Babay N. Nondiseased dentinal root surface following citric acid or tetracycline hydrochloride conditioning: a scanning electron microscopic study on the effects of ultrasonic irrigation before and after root conditioning. *Quintessence Int.* 1997; 28: 93-7.
8. Babay N. The effect of tetracycline hydrochloride on the attachment of gingival fibroblasts. A scanning electron microscopic study on the effect of ultrasonic scaling before root conditioning. *Odontostomatol Trop.* 2002; 25: 13-7.
9. Baker DL, Stanley Pavlow SA, Wikesjö UM. Fibrin clot adhesion to dentin conditioned with protein constructs: an in vitro proof-of-principle study. *J Clin Periodontol.* 2005; 32: 561-6.
10. Baker PJ, Rotch HA, Trombelli L, Wikesjö UM. An in vitro screening model to evaluate root conditioning protocols for periodontal regenerative procedures. *J Periodontol.* 2000; 71: 1139-43.
11. Ben-Yehouda A. Progressive cervical root resorption related to tetracycline root conditioning. *J Periodontol.* 1997; 68: 432-5.
12. Bergenholtz 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: 171-9.
13. Blomlöf J, Lindskog S. Periodontal tissue-vitality after different etching modalities. *J Clin Periodontol.* 1995; 22: 464-8.

14. Blomlöf J, Lindskog S. Root surface texture and early cell and tissue colonization after different etching modalities. *Eur J Oral Sci.* 1995; 103: 17-24.
15. Blomlöf JPS, Blomlöf LB, Lindskog SF. Smear removal and collagen exposure after non-surgical root planning followed by etching with EDTA gel preparation. *J Periodontol.* 1996; 67: 841-5.
16. Blomlöf JPS, Blomlöf LB, Lindskog SF. Effect of different concentrations of EDTA on smear layer removal and collagen exposure in periodontitis-affected root surfaces. *J Clin Periodontol.* 1997; 24: 534-7.
17. Blomlöf JPS, Blomlöf LB, Lindskog SF. Smear layer formed by different root planning modalities and its removal by an ethylenediaminetetraacetic acid gel preparation. In *J Periodontics Restorative Dent.* 1997; 17: 242-9.
18. Blomlöf J, Jansson L, Blomlöf L, Lindskog S. Root surface etching at neutral pH promotes periodontal healing. *J Clin Periodontol.* 1996; 23: 50-5.
19. Blomlöf L, Jonsson B, Blomlöf 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. Blomlöf L, Bergman E, Forsgårdh A, Foss L, Larsson A, Sjöberg B, et al. A clinical study of root surface conditioning with an EDTA gel. I. Nonsurgical periodontal treatment. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2000; 20: 560-5.

21. 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: 489-95.
22. Breschi L, Perdigão J, Gobbi P, Mazzotti G, Falconi M, Lopes M. Immunocytochemical identification of type I collagen in acid-etch dentin. *J Biomed Mater Res*. 2003; 66: 764-9.
23. 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*. 2003; 67: 11-7.
24. Browder IW, Litwin MS. Use of absorbable collagen for hemostasis in general surgical patients. *Am Surg*. 1986; 52: 492-4.
25. Bulman JS, Osborn JF. Measuring diagnostic consistency. *Br Dent J*. 1989; 166: 377-81.
26. Caffesse RG, Holden MJ, Simao K, Nasjleti CE. The effect of citric acid and fibronectin application on healing following surgical treatment of naturally occurring periodontal disease in beagle dogs. *J Clin Periodontol*. 1985; 12: 578-90.
27. Caffesse RG, Nasjletti CE, Anderson GB, Lopatin DE, Smith BA, Morrison ED. Periodontal healing following guided tissue regeneration with citric acid and fibronectin application. *J Periodontol*. 1991; 62: 21-9.
28. Chaves E, Cox C, Morrison E, Caffesse R. The effect of citric acid application on periodontally involved root surfaces. I. 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. Christersson LA, Norderyd OM, Puchalsky CS. Topical application of tetracycline-HCl in human periodontitis. J Clin Periodontol. 1993; 20: 88-95.
31. Claffey N, Bogle G, Bjorvatn K, Selvig KA, Egelber J. Topical application of tetracycline in regenerative periodontal surgery in beagles. Acta Odontol Scand. 1987; 45: 141-6.
32. Codelli GR, Hiram RF, Davis JW. Burnished versus non-burnished application of citric acid to human diseased root surfaces: the effect of time and method of application. Quintessence Int. 1991; 22: 277-83.
33. Cogen RB, Garrison DC, Weatherford TW. Effect of various root surface treatments on the viability and attachment of human gingival fibroblasts. J Periodontol. 1983; 54: 277-82.
34. Coldiron NB, Yukna RA, Weir J, Caudill RF. A quantitative study of cementum removal with hand curettes. J Periodontol. 1990; 61: 293-9.
35. Cole R, Nilvéus R, Ainamo J, Bogle G, Crigger M, Egelberg J. Pilot clinical studies on the effect of topical citric acid application on healing after replaced periodontal flap surgery. J Periodontal Res. 1981; 16: 117-22.
36. Common J, McFall Jr WT. The effects of citric acid on attachment of laterally positioned flaps. J Periodontol. 1983; 54: 9-18.

37. 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 Periodontal Res.* 1978; 13: 538-49.
38. Daly CG, Seymour JB, Corbet EF. Histological assessment of periodontally involved cementum. *J Clin Periodontol.* 1982; 3: 266-74.
39. Dewan DM, Wrtter WD; Wheeler AS, James FM3RD, Floyd HM, Bogard TD, et al. Sodium citrate premedication in elective caesarean section patients. *Can Anaesth Soc J.* 1982; 29: 355-8.
40. Dyer BL, Caffesse RG, Nasjleti CE, Guided tissue regeneration with dentin biomodification. *J Periodontol.* 1993; 64: 1052-60.
41. Eick JD, Wilko RA, Anderson CH, Sorensen SE. Scanning electron microscopy of cut tooth surfaces and identification of debris by use of the electron microprobe. *J Dent Res.* 1970; 49: 1359-68.
42. Eide B, Lie T, Selvig KA. Surface coatings on dental cementum incident to periodontal disease. I. A scanning electron microscopic study. *J Clin Periodontol.* 1983; 10: 157-71.
43. Eide B, Lie T, Selvig KA. Surface coatings on dental cementum incident to periodontal. II. Scanning electron microscopic study. *J Clin Periodontol.* 1984; 11: 565-75.
44. 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.

45. 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: 133-40.
46. Gamal AY, Mailhot JM. The effects of EDTA gel conditioning exposure time on periodontitis – affected human root surface topography and PDL cell adhesion. *Int Acad Periodontol.* 2003; 5: 11-22.
47. Garret JS, Crigger M, Egelberg J. Effects of citric acid on diseased root surfaces. *J Periodontal Res.* 1978; 13: 155-63.
48. Gauss-Muller V, Kleinman HK, Martin GR, Schiffman E. Role of attachment factors and attractants in fibroblast chemotaxis. *J Lab Clin Med.* 1980; 96: 1071-80.
49. Giuliana G, Ammatuna P, Pizzo G, Capone F, D'Angelo M. Occurrence of invading bacteria in radicular dentin of periodontally diseased teeth: microbiological findings. *J Clin Periodontol.* 1997; 24: 478-85.
50. Golub LM, Ramamurthy N, McNamara TF, Gomes B, Wolff M, Casino A, et al. Tetracyclines inhibit tissue collagenase activity. A new mechanism in the treatment of periodontal disease. *J Periodontal Res.* 1984; 19: 651-5.
51. Gusnard 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: 51-7.

52. Handelsman M, Davarpanah M, Celletti R. Guided tissue regeneration with and without citric acid treatment in vertical osseous defects. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 1991; 11: 350-63.
53. Hanes JP, 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.
54. Hatfield CG, Baumhammers A. Citotoxic effects of periodontally involved surfaces of human teeth. *Arch Oral Biol*. 1971; 16: 465-5.
55. Hawkins C, Sterrett Jd, Russel C. Citric acid demineralization of cementum and dentin: the effect of the storage medium. *J Clin Periodontol*. 1997; 24: 264-71.
56. Héritier M. Effects of phosphoric acid on root dentin surface. A scanning and transmission electron microscopic study. *J Periodontal Res*. 1984; 19: 168-76.
57. Hudson-Goodman P, Girard N, Jones M.B. Wound repair and the potential use of growth factors. *Heart Lung*. 1990; 19: 379-84.
58. Isik AG, Tarim B, Hafez AA, Yalçın FS, Onan U, Cox CF. A comparative scanning electron microscopic study on the characteristics of demineralized dentin root surface using different tetracycline HCl concentrations and application times. *J Periodontol*. 2000; 71: 219-25.
59. Jeong SN, Han SB, Lee SW, Magnusson I. Effects of tetracycline - containing gel and a mixture of tetracycline and citric acid - containing gel on non-surgical periodontal therapy. *J Periodontol*. 1994; 65: 840-7.

60. Jones SJ, Lozdan J, Boyde A. Tooth surfaces treated in situ with periodontal instruments. Scanning electron microscopic studies. *Br Dent J.* 1972; 18: 57-64.
61. Karring T, Nyman S, Lindhe J, Siriat M. Potentials for root resorption during periodontal wound healing. *J Clin Periodontol.* 1984; 11: 41-52.
62. Kashani HG, Magner AW, Stahl SS. The effect of root planning and citric acid applications on flap healing in humans. A histologic evaluation. *J Periodontol.* 1984; 55: 679-83.
63. Kassab M. Cohen RE. The effect of root modification and biomodification on periodontal therapy. *Compend Cont Educ Dent.* 2003; 24: 31-44.
64. Kawaguchi H, Ogawa T, Kurihara H, Nanci A. Immunodetection of noncollagenous matrix proteins during periodontal tissue regeneration. *J Periodontal Res.* 2001; 26: 205-13.
65. Kersten BG, Chamberlain ADH, Khorsandi S, Wiksjö ME, Selvig KA, Nilvéus RE. Healing of the intrabony periodontal lesion following root conditioning with citric acid and wound closure including an Expanded PTFE membrane. *J Periodontol.* 1992; 63: 876-82.
66. Labahn R, Fahrenbach WH, Clark SM, Lie T, Adams DF. Root dentin morphology after different modes of citric acid and tetracycline hydrochloride conditioning. *J Periodontol.* 1992; 63: 303-9.

67. Lafferty TA, Gher 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: 689-93.
68. 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 gingival fibroblasts. *Aust Dent J.* 1999; 44: 123-30.
69. Larjava H, Salonen J, Häkkinen L, Närhi T. Effect of citric acid treatment on the migration of epithelium on root surfaces *in vitro*. *J Periodontol.* 1988; 59: 95-9.
70. Leite FRM. Efeito do condicionamento radicular com ácido cítrico, citrato de sódio, EDTA e tetraciclina na desão de elementos sangüíneos. Estudo por meio de microscopia eletrônica de varredura [dissertação mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2006.
71. Lie T, Leknes KN. Evaluation of the effect on root surfaces of air turbine scalers and ultrasonic instrumentation. *J Periodontol* 1985; 56: 522-31.
72. Lie T, Meyer K. Calculus removal and loss of tooth substance in response to different periodontal instruments. *J Clin Periodontol.* 1977; 4: 250-62.
73. Lindhe J, Karring T, Lang NP. Tratado de periodontologia clínica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1992.
74. Löe H, Theilade J, Jensen S. Experimental gingivitis in man. *J Periodontol.* 1965; 36: 177-87.

75. López NJ. Connective tissue regeneration to periodontally diseased roots planed and conditioned with citric acid and implanted into the oral mucosa. *J Periodontol.* 1984; 55: 381-90.
76. Lowenguth RA, Blieden TM. Periodontal regeneration: root surface demineralization. *Periodontology* 2000. 1993; 1: 54-68.
77. Lynn AK, Yannas IV, Bonfield W. Antigenicity and immunogenicity of collagen. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater.* 2004; 71: 343-54.
78. Madison JG, Hokett SD. The effects of different tetracyclines on the dentin root surface of instrumented, periodontally involved human teeth: a comparative scanning electron microscope study. *J Periodontol.* 1997; 68: 739-45.
79. Moore JA, Ashley FP, Waterman CA. The effect on healing of the application of citric acid during replaced flap surgery. *J Clin Periodontol.* 1987; 14: 130-5.
80. 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.
81. Nation JL. A new method using hexamethyldisilazane for preparation of soft insect tissues for scanning electron microscopy. *Stain Technol.* 1983; 58: 347-51.
82. Nilvéus R, Egelberg J. The effect of topical citric acid application on the healing of experimental furcation defects in dogs. III. The relative importance of coagulum support flap design and systemic antibiotics. *J Periodontal Res.* 1980; 15: 551-60.

83. Nilvéus R, Bogle G, Crigger M, Egelberg J, Selvig A. The effect of topical citric acid application on the healing of experimental furcation defects in dogs. II. Healing after repeated surgery. *J Periodontal Res.* 1980; 15: 544-50.
84. Nishioka T, Yokota M, Tsuda I, Tatsumi N. Flow cytometric analysis of platelet activation under calcium ion-chelating conditions. *Clin Lab Haematol.* 2002; 24: 115-9.
85. Nunn ME. Understanding the etiology of periodontitis: an overview of periodontal risk factors. *Periodontology 2000.* 2003; 32: 11-23.
86. Pashley DH. Smear-layer: physiological considerations. *Oper Dent.* 1984; 3: 13-29.
87. Perdigao 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: 1111-20.
88. Polson AM, Caton J. Factors influencing periodontal repair and regeneration. *J Periodontol.* 1982; 53: 617-25.
89. 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.
90. Polson AM, Proye MP. Fibrin linkage: a precursor for new attachment. *J Periodontol.* 1983; 54: 141-7.
91. 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

92. Postlethwaite AE, Seyer JM, Kang AH. Chemotactic attraction of human fibroblasts to type I, II and III collagens and collagen-derived peptides. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1978; 75: 871-5.
93. Proye MP, Polson AM. Effect of root surface alterations on periodontal healing. I. Surgical denudation. *J Clin Periodontol*. 1982; 9: 428-40.
94. Proye MP, Polson AM. Repair in different zones of the periodontium after tooth reimplantation. *J Periodontol*. 1982; 53: 379-90.
95. Register AA. Bone and cementum induction by dentin, demineralized *in situ*. *J Periodontol*. 1973; 44: 49-54.
96. Register AA, Burdick FA. Accelerated Reattachment with cementogenesis to dentin, demineralized, *in situ*. I. Optimum range. *J Periodontol*. 1975; 46: 646-55.
97. Register AA, Burdick FA. Accelerated Reattachment with cementogenesis to dentin, demineralized, *in situ*. II. Defect repair. *J Periodontol*. 1976; 47: 497-505.
98. Renvert S, Egelberg J. Healing after treatment of periodontal intraosseous defects. II Effect of citric acid conditioning of the root surface. *J Clin Periodontol*. 1981; 8: 459-73.
99. Ririe CM, Crigger M, Selvig KA. Healing of periodontal connective tissues following surgical wounding and application of citric acid in dogs. *J Periodontal Res*. 1980; 15: 314-27.

100. Rompen EH, Goffinet GH, Nusgens B. Human periodontal ligament fibroblast behavior on chemically conditioned dentine: an in vitro study. *J Periodontol*. 1999; 70: 1144-52.
101. Ruggeri Jr. A, 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: 1-8.
102. Sakon M, Monden M, Gotoh M, Kobayashi K, Kambayashi J, Mori T, et al. Use of microcrystalline collagen powder and fibrinogen tissue adhesive for hemostasis and prevention of rebleeding in patients with hepatocellular carcinoma associated with cirrhosis of the liver. *Surg Gynecol Obstet*. 1989; 168: 453-4.
103. Sammons PR, Wang HL, Chiego DJ, Castelli WA, Smith BA. Effect of root conditioning on periodontal wound healing with and without guided tissue regeneration: a pilot study II. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 1994; 14: 62-9.
104. 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 [tese livre-docência]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 1999.
105. Sampaio JEC, Abi Rached RSG, Pilatti GL, Theodoro LH, Batista LHC. Effectiveness of EDTA and EDTA-T brushing on the removal of root surface smear layer. *Pesqui Odontol Bras*. 2003; 17: 319-25.

106. Selvig KA. Biological changes at the tooth saliva interface in periodontal disease. *J Dent Res.* 1969; 48:846-55.
107. Selvig KA, Hals D. Periodotally diseased cementum studied by correlated microradiography, electron probe analysis and electrons microscopy. *J Periodontal Res.* 1977; 12: 419-29.
108. Selvig KA, Bogle GC, Sigurdsson TJ, Wikesjö UM. Does root surface conditioning with citric acid delay healing? *J Clin Periodontol.* 1996; 23: 119-27.
109. Shuman M. Hemorrhagic disorders: abnormalities of platelet and vascular function. In: Goldman L, Bennett JC. *Cecil textbook of medicine.* 20th ed. Philadelphia: Saunders; 2000. p. 23.
110. Sobel JD, Gallin JI. Polymorphonuclear leukocyte and monocyte chemoattractants produced by human fibroblasts. *J Clin Invest.* 1979; 63: 609-18.
111. 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 [tese doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2004.
112. Stabholz A, Kettinger J, Aprecio R, Zimmerman G, Baker PJ, Wikesjö UM. Antimicrobial properties of human dentin impregnated with tetracycline HCl or chlorhexidine. An in vitro study. *J Clin Periodontol.* 1993; 20: 557-62.
113. Stahl SS, Froum SJ. Human clinical and histologic repair responses following the use of citric acid in periodontal therapy. *J Periodontol.* 1977; 48: 261-6.

114. Steinberg AD, Willey R. Scanning electron microscopy observations of initial clot formation on treated root surfaces. *J Periodontol.* 1988; 59: 403-11.
115. 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.
116. Sterrett JD, Murphy HJ. Citric acid burnishing of dentinal root surfaces. A scanning electron microscopy report. *J Clin Periodontol.* 1989; 16: 98-104.
117. Sterrett JD, Bankey T, Murphy HJ. Dentin demineralization. The effects of citric acid concentration and application time. *J Clin Periodontol.* 1993; 20: 366-70.
118. Sterrett JD, Dhillon M, Murphy HJ. Citric acid demineralization of cementum and dentin: the effect of application pressure. *J Clin Periodontol.* 1995; 22: 434-41.
119. Sterrett JD, Hawkins CH, Thomas J. Citric acid burnishing of native radicular dentin: a scanning electron microscopic report. *Quintessence Int.* 1989; 20: 423-6.
120. Sterrett JD, Delaney B, Rizkalla A, Hawkins CH. Optimal citric acid concentration for dentinal demineralization. *Quintessence Int.* 1991; 22; 371-5.
121. Sterrett JD, Simmons J, Whitford G, Russell CM. Tetracycline demineralization of dentin: the effects of concentration and application time. *J Clin Periodontol.* 1997; 24: 457-63.

122. Stewart HT. Partial removal of cementum and decalcification of tooth in the treatment of pyorrhea alveolaris. *Dent Cosmos*. 1899; 41: 617-26.
123. Trombelli L, Scabbia A, Catura G. Nondiseased cementum and dentin root surface following tetracycline hydrochloride conditioning: SEM study of the effects of solution concentration and application time. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 1994; 14: 461-70.
124. Trombelli L, Scabbia A, Zangari F, Griselli A, Wikesjö UM, Calura G. Effect of tetracycline HCl on periodontally-affected human root surfaces. *J Periodontol*. 1995; 66: 685-91.
125. Wen RC, 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.
126. Wikesjö UME, Baker PJ, Christersson LA, Genco RJ, Lyall RM, Hic S, et al. A biochemical approach to periodontal regeneration: tetracycline treatment conditions dentin surfaces. *J Periodontal Res*. 1986; 21: 322-29.
127. Willey R, Steinberg AD. Scanning electron microscopic studies of root dentin surfaces treated with citric acid, elastase, hyaluronidase, pronase and collagenase. *J Periodontol*. 1984; 55: 592-6.
128. Yannas IV. Tissue regeneration by use of collagen-glycosaminoglycan copolymers. *Clin Mater*. 1992; 9: 179-87.

129. Yannas IV, Lee E, Orgill DP, Skrabut EM, Murphy GF. Synthesis and characterization of a model extracellular matrix that induces partial regeneration of adult mammalian skin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989; 86: 933-7.
130. Younger WJ. Some of the latest phases in implation and other operations. *Dent Cosmos*. 1893; 35: 102-8.
131. Zaman KU, Sugaya T, Hongo O, Kato H. A study of attached and oriented human periodontal ligament cells to periodontally diseased cementum and dentin after demineralizing with neutral and low pH etching solution. *J Periodontol*. 2000; 71: 1094-9.

ANEXOS

ANEXO 1

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

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA		
Comitê de Ética em Pesquisa		
Certificado		
Certificamos 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) JOSSÉ 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.		
Certify 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 JOSSÉ 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.		
Prof^ª Dr^ª Miriam Aparecida Onofre Coordenadora		

Anexo 2

OS DADOS UTILIZADOS PARA O CÁLCULO DO KAPPA PONDERADO FORAM OS 90 ESCORES (APROXIMADAMENTE 33.5% DO TOTAL DE 270) ATRIBUÍDOS AOS ESPÉCIMES DO GRUPO DE 3 MINUTOS. ESSE GRUPO FOI ESCOLHIDO PARA AVALIAR A REPRODUTIBILIDADE INTRA-EXAMINADOR PORQUE APRESENTOU ESPÉCIMES QUE RECEBERAM TODOS OS 8 ESCORES.

Tabela A1 - Tabela de contingência dos escores atribuídos às fotomicrografias

Primeira leitura										
		1	2	3	4	5	6	7	8	Soma
Segunda leitura	1	8								8,00
	2		2							2,00
	3			4						4,00
	4			1	9	2	2			14,00
	5				1	45				46,00
	6					1	9			10,00
	7						1	4		5,00
	8								1	1,00
Soma		8,00	2,00	5,00	10,00	48,00	12,00	4,00	1,00	90,00

ANEXO 3

Quadros das notas atribuídas às fotomicrografias segundo o Índice de Remoção de “Smear Layer”.

Quadro A1 – Notas atribuídas às fotomicrografias do grupo controle

(Grupo I) segundo o Índice de Remoção de Smear Layer

Aplicação Passiva				
Foto (1500x)	1ª leitura	2ª leitura	3ª leitura	Nota Foto
Tempo 1'				
291146	7	7	7	7
291149	7	7	7	7
291138	6	6	6	6
291123	7	7	7	7
291155	7	7	7	7
Tempo 2'				
291132	6	6	6	6
291160	7	7	7	7
000128	6	6	6	6
291188	7	7	7	7
291130	6	6	6	6
Tempo 3'				
000106	7	7	7	7
000156	7	7	7	7
201112	7	7	7	7
291154	6	6	6	6
000140	6	6	6	6
Fricção Suave				
Foto (1500x)	1ª leitura	2ª leitura	3ª leitura	Nota Foto
Tempo 1'				
000108	6	6	6	6
000112	7	7	7	7
291162	6	6	6	6
000126	6	6	6	6
000136	7	7	7	7
Tempo 2'				
000110	6	6	6	6
000154	6	6	6	6
000132	7	7	6	7
000142	6	6	6	6
000170	6	6	6	6
Tempo 3'				
000148	6	6	6	6
000158	6	6	6	6
291186	6	6	6	6
291168	6	6	6	6
000182	6	6	6	6

Fricção Vigorosa				
Foto (1500x)	1ª leitura	2ª leitura	3ª leitura	Nota Foto
Tempo 1'				
000104	5	5	5	5
000122	6	6	6	6
000120	5	5	5	5
000160	6	6	6	6
000144	5	5	5	5
Tempo 2'				
000116	5	5	5	5
000164	6	5	6	6
291176	6	5	6	6
000134	6	5	5	5
291140	6	6	6	6
Tempo 3'				
000138	4	4	4	4
000172	6	5	6	6
000150	4	5	4	4
291196	5	4	5	5
000102	5	5	5	5

Quadro A2 – Notas atribuídas às fotomicrografias do grupo ácido cítrico

0,5% (Grupo II) segundo o Índice de Remoção de Smear Layer

Aplicação Passiva				
Foto (1500x)	1ª leitura	2ª leitura	3ª leitura	Nota Foto
Tempo 1'				
250401	6	6	6	6
250403	8	8	8	8
250405	6	6	6	6
250407	4	4	4	4
250409	4	4	4	4
Tempo 2'				
250411	4	4	4	4
250413	4	4	4	4
250415	6	6	6	6
250417	6	6	6	6
250419	4	4	4	4
Tempo 3'				
250421	4	3	4	4
250423	6	6	6	6
250425	4	4	4	4
250427	4	4	4	4
250429	5	5	5	5
Fricção Suave				
Foto (1500x)	1ª leitura	2ª leitura	3ª leitura	Nota Foto
Tempo 1'				
250431	8	8	8	8
250433	6	6	6	6
250435	6	6	6	6
250437	6	6	6	6
250439	6	6	6	6
Tempo 2'				
250441	6	6	6	6
250443	5	5	5	5
250445	6	6	6	6
250447	5	5	5	5
250449	5	5	5	5
Tempo 3'				
250451	4	4	4	4
250453	4	4	4	4
250455	5	5	5	5
250457	5	5	5	5
250459	5	5	5	5

Fricção Vigorosa				
Foto (1500x)	1ª leitura	2ª leitura	3ª leitura	Nota Foto
Tempo 1'				
250461	5	5	5	5
250463	5	5	5	5
250465	3	5	3	3
250467	4	5	4	4
250469	5	5	5	5
Tempo 2'				
250471	5	5	5	5
250473	5	5	5	5
250475	4	4	4	4
250477	5	5	5	5
250479	4	4	4	4
Tempo 3'				
250481	8	8	8	8
250483	2	2	2	2
250485	5	5	5	5
250487	5	4	4	4
250489	6	6	6	6

Quadro A3 – Notas atribuídas às fotomicrografias do grupo ácido cítrico

1% (Grupo III) segundo o Índice de Remoção de Smear Layer

Aplicação Passiva				
Foto (1500x)	1ª leitura	2ª leitura	3ª leitura	Nota Foto
Tempo 1'				
061187	8	8	8	8
061189	7	7	7	7
061191	6	6	6	6
911173	6	6	6	6
911175	7	7	7	7
Tempo 2'				
061175	6	6	4	6
061177	4	4	4	4
061199	4	4	4	4
611103	4	4	4	4
611105	4	5	4	4
Tempo 3'				
061127	4	6	4	4
061129	4	4	4	4
061147	3	3	3	3
061149	3	3	3	3
061151	6	4	4	4
Fricção Suave				
Foto (1500x)	1ª leitura	2ª leitura	3ª leitura	Nota Foto
Tempo 1'				
061101	1	1	1	1
061103	5	5	5	5
061161	1	1	1	1
061163	3	3	3	3
061165	1	1	1	1
Tempo 2'				
061121	5	5	5	5
061123	5	5	5	5
061125	5	5	5	5
061167	5	5	5	5
061169	5	5	5	5
Tempo 3'				
061117	7	7	7	7
061119	5	5	5	5
061131	5	5	5	5
061133	5	5	5	5
061135	5	5	5	5

Fricção Vigorosa				
Foto (1500x)	1ª leitura	2ª leitura	3ª leitura	Nota Foto
Tempo 1'				
061105	7	7	7	7
061107	5	5	5	5
061109	5	5	5	5
061157	5	5	5	5
061159	5	5	5	5
Tempo 2'				
061111	5	5	5	5
061113	5	5	5	5
061115	5	5	5	5
061153	5	5	5	5
061155	5	5	5	5
Tempo 3'				
061137	5	5	5	5
061139	5	5	5	5
061141	5	5	5	5
061143	5	5	5	5
061145	5	5	5	5

Quadro A4 – Notas atribuídas às fotomicrografias do grupo ácido cítrico 2% (Grupo IV) segundo o Índice de Remoção de Smear Layer

Aplicação Passiva				
Foto (1500x)	1ª leitura	2ª leitura	3ª leitura	Nota Foto
Tempo 1'				
612119	4	4	4	4
612121	4	4	4	4
061281	6	6	6	6
061283	6	6	6	6
061285	2	2	2	2
Tempo 2'				
712171	4	4	4	4
712173	4	4	4	4
712175	4	4	4	4
712161	4	4	4	4
712163	4	4	4	4
Tempo 3'				
712137	4	4	4	4
712139	6	6	6	6
712141	4	4	4	4
712147	5	5	5	5
712149	4	4	4	4
Fricção Suave				
Foto (1500x)	1ª leitura	2ª leitura	3ª leitura	Nota Foto
Tempo 1'				
061271	5	5	5	5
061273	5	5	5	5
061275	4	4	4	4
061277	4	4	4	4
061279	3	3	3	3
Tempo 2'				
712177	5	5	5	5
712179	4	4	4	4
712181	4	4	4	4
061287	5	5	5	5
061289	4	4	4	4
Tempo 3'				
712151	5	5	5	5
712153	5	5	5	5
712155	5	5	5	5
712157	5	5	5	5
712159	5	5	5	5

Fricção Vigorosa				
Foto (1500x)	1ª leitura	2ª leitura	3ª leitura	Nota Foto
Tempo 1'				
712133	5	5	5	5
712135	5	5	5	5
061291	5	5	5	5
061293	5	5	5	5
061295	5	5	5	5
Tempo 2'				
061297	5	5	5	5
061299	5	5	5	5
612101	5	5	5	5
612103	5	5	5	5
612105	5	5	5	5
Tempo 3'				
612113	5	5	5	5
612115	5	5	5	5
612117	5	5	5	5
612127	5	5	5	5
612129	5	5	5	5

Quadro A5 – Notas atribuídas às fotomicrografias do grupo ácido cítrico

15% (Grupo V) segundo o Índice de Remoção de Smear Layer

Aplicação Passiva				
Foto (1500x)	1ª leitura	2ª leitura	3ª leitura	Nota Foto
Tempo 1'				
051201	5	5	5	5
051203	3	3	3	3
051205	5	5	5	5
051207	5	5	5	5
051209	5	5	5	5
Tempo 2'				
051211	1	1	1	1
051213	1	1	1	1
051215	5	5	5	5
051217	5	5	5	5
051219	5	5	5	5
Tempo 3'				
051221	1	1	1	1
051223	3	3	3	3
051225	5	5	5	5
051227	5	5	5	5
051229	5	5	5	5
Fricção Suave				
Foto (1500x)	1ª leitura	2ª leitura	3ª leitura	Nota Foto
Tempo 1'				
051241	5	5	5	5
051243	5	5	5	5
051245	5	5	5	5
051247	5	5	5	5
051249	5	5	5	5
Tempo 2'				
051251	5	5	5	5
051253	2	2	2	2
051255	5	5	5	5
051257	5	5	5	5
051259	5	5	5	5
Tempo 3'				
051261	5	5	5	5
051263	5	5	5	5
051265	1	1	1	1
051267	5	5	5	5
051269	5	5	5	5

Fricção Vigorosa				
Foto (1500x)	1ª leitura	2ª leitura	3ª leitura	Nota Foto
Tempo 1'				
051231	5	5	5	5
051233	5	5	5	5
051235	5	5	5	5
051237	5	5	5	5
051239	5	5	5	5
Tempo 2'				
612107	5	5	5	5
612109	5	5	5	5
612111	5	5	5	5
712143	5	5	5	5
712145	5	5	5	5
Tempo 3'				
712165	5	5	5	5
712167	5	5	5	5
712169	5	5	5	5
612123	5	5	5	5
612125	5	5	5	5

Quadro A6 – Notas atribuídas às fotomicrografias do grupo ácido cítrico

25% (Grupo VI) segundo o Índice de Remoção de Smear Layer

Aplicação Passiva				
Foto (1500x)	1ª leitura	2ª leitura	3ª leitura	Nota Foto
Tempo 1'				
130227	1	1	1	1
130229	5	5	5	5
130231	5	5	5	5
130272	5	5	5	5
130274	5	5	5	5
Tempo 2'				
130276	5	5	5	5
130278	5	5	5	5
130290	5	5	5	5
130292	5	5	5	5
130294	5	5	5	5
Tempo 3'				
130250	5	5	5	5
130252	5	5	5	5
130254	5	5	5	5
130256	3	3	3	3
130258	2	2	2	2
Fricção Suave				
Foto (1500x)	1ª leitura	2ª leitura	3ª leitura	Nota Foto
Tempo 1'				
130211	5	5	5	5
130213	1	1	1	1
130215	1	1	1	1
130217	5	5	5	5
130219	1	1	1	1
Tempo 2'				
130207	5	5	5	5
130209	1	1	1	1
130221	1	1	1	1
130223	5	5	5	5
130225	5	5	5	5
Tempo 3'				
130201	1	1	1	1
130203	1	1	1	1
130205	1	1	1	1
130260	1	1	1	1
130262	1	1	1	1

Fricção Vigorosa				
Foto (1500x)	1ª leitura	2ª leitura	3ª leitura	Nota Foto
Tempo 1'				
130238	5	5	5	5
130240	5	5	5	5
130242	5	5	5	5
130264	5	5	5	5
130266	5	5	5	5
Tempo 2'				
130280	5	5	5	5
130282	5	5	5	5
130284	5	5	5	5
130286	5	5	5	5
130288	5	5	5	5
Tempo 3'				
130244	5	5	5	5
130246	5	5	5	5
130248	1	1	1	1
130268	5	5	5	5
130270	5	5	5	5

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

Araraquara, 24 de março de 2008.

RODRIGO CAVASSIM