



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Ariel Zogbi Barbosa Mançaneres

**Efeito do laser diodo de alta potência na redução bacteriana em canais
radiculares infectados por *Enterococcus faecalis***

Araraquara

2018



UNESP - Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Ariel Zogbi Barbosa Mançanares

Efeito do laser diodo de alta potência na redução bacteriana em canais radiculares infectados por *Enterococcus faecalis*

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia, Araraquara para obtenção do título de Mestre em Odontologia, na Área de Endodontia

Orientador: Prof. Dr. Fabio Luiz Camargo Villela Berbert

Co-orientador: Prof^a Dr^a Juliane Maria Guerreiro Tanomaru

Araraquara

2018

Maçanares, Ariel Zogbi Barbosa

Efeito do laser diodo de alta potência na redução bacteriana em canais radiculares infectados por *Enterococcus faecalis* / Ariel Zogbi Barbosa Maçanares. -- Araraquara: [s.n.], 2018 41 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientador: Prof. Dr. Fabio Luiz Camargo Villela Berbert

Coorientadora: Profa. Dra. Juliane Maria Guerreiro

Tanomaru

1. Lasers semicondutores 2. Endodontia 3. *Enterococcus faecalis*. I. Título

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marley C. Chiusoli Montagnoli, CRB-8/5646

Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

Ariel Zogbi Barbosa Mançanares

Efeito do laser diodo de alta potência na redução bacteriana em canais radiculares infectados por *Enterococcus faecalis*

Comissão julgadora

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Endodontia

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Fabio Luiz Camargo Villela Berbert

2° Examinador: Profa. Dra. Flaviana Bombarda de Andrade

3° Examinador: Prof. Dr. Mário Tanomaru Filho

Araraquara, 29 de Março de 2018

DADOS CURRICULARES

Ariel Zogbi Barbosa Mançanares

NASCIMENTO: 01/07/1993 – São João da Boa Vista - SP

FILIAÇÃO: Maria Luiza Zogbi Barbosa

Antônio Roberto Araújo Mançanares

2011-2015: Graduação em Odontologia na Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – FORP/USP

2016-2018: Pós-graduação em Odontologia – Área de Endodontia, nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr/UNESP

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, **Antônio Roberto Araújo Mançanares e Maria Luiza Zogbi Barbosa** pelo apoio durante esses dois anos, pelos conselhos e força nos momentos difíceis. Sem vocês eu não estaria aqui hoje.

À **Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP)**, na pessoa de seu magnífico Reitor Prof. Dr. Sandro Roberto Valentini e Vice-Reitor Prof. Dr. Sérgio Roberto Nobre.

À **Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP**, na pessoa da sua Diretora Profa. Elaine Maria Sgavioli Massucato e Vice-diretor Prof. Dr. Edson Alves Campos.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Fábio Luiz Camargo Villela Berbert**, pela paciência e apoio durante o desenvolvimento do curso. Agradeço pela oportunidade de trabalharmos juntos e deixo aqui meu respeito e gratidão.

À minha co-orientadora, **Profa. Dra. Juliane Maria Guerreiro Tanomaru**, pelo entusiasmo e orientação durante todos os procedimentos experimentais, aprendi muito trabalhando ao seu lado.

Aos professores do departamento, **Mário Tanomaru Filho, Idomeo Bonetti Filho e Milton Carlos Kuga** por sempre estarem dispostos a ajudar. Tenho um respeito imenso por todos.

Aos **funcionários da faculdade**, em especial, José Alexandre, que sempre esteve disponível para ajudar com prontidão e paciência.

Aos **meus colegas de turma e doutorandos** que sempre estiveram dispostos a auxiliar no que fosse preciso. Aprendi muito com todos. Gisselle, sempre me ajudando em todas as etapas experimentais até a fase de revisão final. Hernán, meu anjo da guarda que nunca decepcionou. Victor, pela parceria. Jáder, pelo bom humor. Tiago, que já considero um professor desde o primeiro dia, sempre me ajudando sem esperar nada em troca.

Aos **meus amigos e vizinhos**, Gabriel e Nathália, pelos choros seguidos de risos que fizeram minhas noites mais leves para continuar os trabalhos. Por tudo que não cabe no lattes.

Ao meu **namorado**, Artur, pela força e apoio e por sempre me fazer acreditar em eu mesma.

À **CAPES** pela concessão da bolsa de estudos

À todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para realização deste trabalho, minha sincera gratidão.

“De tudo, ficaram três coisas: a certeza de que ele estava sempre começando, a certeza de que era preciso continuar e a certeza de que seria interrompido antes de terminar. Fazer da interrupção um caminho novo. Fazer da queda um passo de dança, do medo uma escada, do sono uma ponte, da procura um encontro.”

Fernando Sabino¹

Mançanares AZB. Efeito do laser diodo de alta potência na redução bacteriana em canais radiculares infectados por *Enterococcus faecalis* [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2018.

RESUMO

O sucesso do tratamento endodôntico depende da eliminação de microrganismos do sistema de canais radiculares. As soluções irrigadoras e métodos mecânicos são incapazes de eliminar completamente as bactérias, que penetram profundamente nos túbulos dentinários e sistema de canais radiculares. Novos métodos de descontaminação intracanal, como o laser, têm sido estudados. Este estudo *ex vivo* foi realizado para avaliar o efeito antibacteriano de um laser diodo de alta potência, a irrigação convencional e combinação destas técnicas em dentes contaminados com biofilme de *Enterococcus faecalis*. Sessenta e cinco dentes unirradiculados com canal único foram selecionados, suas coroas foram removidas e as raízes padronizadas em 15mm e foram preparados com limas manuais e Reciproc R50. Posteriormente foram preparados para o estudo microbiológico. Seus forames apicais foram selados com resina fotopolimerizável e a superfícies externa radicular foi impermeabilizada com adesivo epoxi e os espécimes foram fixados em placas de 24-poços e esterilizados com óxido de etileno. Cinquenta e cinco foram contaminados com *E. faecalis*. Após 21 dias de incubação, os espécimes foram divididos em três grupos experimentais (n = 15): NaOCl, Solução salina + laser (SS+laser), e NaOCl + laser; e dois grupos controle (n = 10): Controle positivo (C+) e controle negativo (C-). No grupo NaOCl os espécimes foram irrigados com 5 mL de hipoclorito de sódio-NaOCl a 2,5%; no grupo SS+laser, foram irrigados com 5 mL de solução salina e posteriormente irradiados com laser diodo de alta potência 808 nm com 1,5 W em três aplicações de 5 x 5 s; no grupo NaOCl + laser, foram irrigados com 5 mL de NaOCl a 2,5% e posteriormente irradiados com laser da mesma maneira que no grupo anterior. Foram realizadas três coletas microbiológicas (C1- 21 dias após contaminação, C2- imediatamente pós-tratamento e C3- após 7 dias do tratamento). Após diluição decimal seriada e plaqueamento, foi realizada a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC mL⁻¹). Na C1, todos os grupos experimentais apresentaram contaminação bacteriana; Na C2, os grupos NaOCl e NaOCl + laser não apresentaram crescimento bacteriano, diferente do grupo SS + laser que apresentou crescimento bacteriano, porém houve uma redução significativa quando comparado ao grupo C+; Na C3, após sete dias do tratamento, todos os grupos apresentaram crescimento bacteriano. NaOCl e NaOCl + laser foram mais eficazes na redução bacteriana em comparação ao grupo de SS + laser (p<0,05) e estes não apresentaram diferença estatística entre si (p>0,05). Nos parâmetros estudados, conclui-se que o laser diodo de alta potência não demonstra efeito significativo em relação ao NaOCl na redução bacteriana intracanal. Novos protocolos de irradiação com laser devem ser estudados frente ao *E. faecalis*.

Palavras chave: Lasers semicondutores. Endodontia. *Enterococcus faecalis*.

Mançanares AZB. The effect of high-power diode laser for intracanal bacterial reduction of *Enterococcus faecalis* [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2018.

ABSTRACT

The success of the endodontic treatment depends on the elimination of microorganisms from the root canal system. The irrigant solutions and mechanical methods are incapable of eliminating bacteria, which penetrate deeply into the dentinal tubules and root canal systems. New methods of intracanal decontamination, like lasers, have been studied. This *ex vivo* study was done to evaluate the antibacterial effect of a high-power diode laser, conventional irrigation and the combination of these techniques in teeth contaminated with *Enterococcus faecalis* biofilm. Sixty-five uniradicular teeth with single canal were selected, their crowns were removed, and roots were standardized with 15 mm and were prepared with manual files and Reciproc R50. Afterwards, they were prepared for microbiological study. Their apical foramen was sealed with light cured resin and their root external surfaces were sealed with Epoxi adhesive and the specimens were attached to 24-well microplates and sterilized with ethylene oxide. Fifty-five specimens were contaminated with *E. faecalis*. After 21 days of incubation, the specimens were divided into three experimental groups (n = 15): NaOCl, Saline + laser (SS+laser), and NaOCl + laser; and two control groups (n = 10): Positive control (C+) and negative control (C-). In the NaOCl group, the specimens were irrigated with 5 mL of 2,5% sodium hypochlorite – NaOCl; in the SS+laser group, they were irrigated with 5 mL of saline and then irradiated with high-power diode laser with 808 nm and 1,5W, in three applications of 5 x 5 s; In the NaOCl + laser group, they were irrigated with 5 mL of 2,5% NaOCl and then irradiated with laser in the same protocol as the previous group. Three microbiological samples were collected (C1- 21 days after inoculation, C2- immediately after treatment and C3- after 7 days of treatment). After decimal dilution and plating, counting of colony forming units (CFU mL⁻¹) was done. In the C1, all experimental groups showed bacterial contamination; in the C2, the NaOCl and NaOCl + laser didn't show bacterial growth, differing from the SS + laser group, that showed bacterial growth, but also showed significant bacterial reduction when compared to the C+ group; in the C3, seven days after treatment, all groups showed bacterial growth. NaOCl and NaOCl + laser were more efficient in bacterial reduction when compared to the SS + laser group (p<0,05) and they didn't show statistical difference between them (p>0,05). In the studied parameters, it was concluded that the high-power diode laser didn't show significant effect when compared to NaOCl in intracanal bacterial reduction. New laser irradiation protocols should be studied against *E. faecalis*.

Keywords: Lasers. Endodontics. *Enterococcus faecalis*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 PROPOSIÇÃO	17
3 PUBLICAÇÃO	18
4 CONCLUSÃO	30
REFERÊNCIAS	31
APÊNDICE.....	35
ANEXO	39

1 INTRODUÇÃO

O sucesso do tratamento endodôntico, em casos de necrose pulpar, dependem da eliminação de microorganismos do sistema de canais radiculares, evitando a prevalência de bactérias viáveis causadoras de inflamação periapical persistente, para que possa ser realizada a sua obturação².

Para a remoção da infecção são utilizados métodos físicos e químicos, porém estes são incapazes de livrar completamente o sistema de canais radiculares das bactérias^{3,4}, já que estas têm a capacidade de penetrar profundamente nos túbulos dentinários, em uma profundidade de até 1100 μm ⁵. Dificultando também a ação de soluções irrigadoras, como EDTA e NaOCl, que agem por contato direto e são incapazes de penetrar profundamente nos túbulos dentinários, assim como demonstrou Berutti et al.⁶ em estudo que testou a ação das soluções irrigadoras NaOCl a 5% seguida por EDTA a 10%, obtendo o resultado de que estas alcançaram uma profundidade máxima de 300 μm nos túbulos dentinários, que tem como consequência uma contaminação residual no sistema de canais radiculares pós tratamento, devido à capacidade de profunda penetração das bactérias.

Esta contaminação residual no sistema de canais radiculares é um dos principais motivos do insucesso do tratamento endodôntico⁷. Com o advento da microtomografia computadorizada, hoje conhecemos melhor a complexidade anatômica do sistema de canais radiculares^{8,9}, elevando a ciência de que mesmo quando o preparo biomecânico é realizado com os métodos convencionais nos mais elevados padrões técnicos, ainda é impraticável a instrumentação e mesmo a limpeza mesmo que química de algumas áreas, tornando a completa remoção bacteriana praticamente impossível¹⁰, salientando a importância do uso de métodos complementares de desinfecção¹¹.

Além da dificuldade de desinfecção do complexo de túbulos dentinários, a *Enterococcus faecalis*, bactéria Gram-positiva e anaeróbia facultativa¹², é frequentemente encontrada nos casos de insucesso do tratamento endodôntico¹³. Em estudo de Siqueira e Rôças¹⁴ essa espécie de bactéria resistente foi encontrada em 77% dos casos de dentes com lesão periapical persistente ao tratamento e tal persistência ocorre devido à resistência dessa bactéria ao pH alcalino^{15,16}, determinado por pastas à base de hidróxido de cálcio, comumente utilizadas como medicação intracanal na fase desinfecção¹⁷, além desse microorganismo ser capaz de

formar biofilme¹⁸⁻²¹ e apresentar diversos fatores de virulência como produção de substâncias agregadoras, enzimas líticas, adesinas de superfície, entre outros, e proliferar profundamente nos túbulos dentinários²².

Atualmente, têm sido estudadas novas maneiras de combater a infecção no sistema de canais radiculares, como a utilização de lasers. No entanto foi demonstrado que tanto o laser de baixa potência como o LED têm sido insuficientes para a redução bacteriana almejada para o sucesso endodôntico^{23,24}. Souza et al.²⁴ realizou um estudo avaliando a terapia fotodinâmica como complementação ao método convencional de instrumentação e irrigação do sistema de canais radiculares, não obtendo mudança significativa na desinfecção do sistema de canais radiculares e sugerindo a busca de um melhor protocolo. Em 2013, Frota²³ realizou um estudo verificando a eliminação da *E. faecalis* intracanal e do sistema de canais radiculares com a utilização do LED, em diferentes tempos de aplicação, associado à cúrcuma como agente fotosensibilizador, e encontraram apenas 32% de eliminação bacteriana com 10 minutos de aplicação e a recontaminação do canal por parte de microrganismos do sistema de canais radiculares foi verificada após sete dias. Daí a importância deste período de avaliação pós-operatória, pois mesmo que os microrganismos presentes na luz do canal sejam eliminados, pode haver persistência destes nos túbulos, causando uma recolonização. Os resultados sugeriram que a utilização de lasers é um caminho para mais estudos, já que, até o momento, tanto o LED quanto o laser de baixa potência têm se mostrado insuficientes para a obtenção de total descontaminação intracanal e de todo o sistema de canais radiculares contaminados com *E. faecalis*.

A necessidade do emprego de maiores potências tem sido fonte de estudo para a descontaminação do sistema de canais radiculares²⁵. O laser Diodo é um laser de alta potência capaz de ser transmitido através de fibras ópticas finas e flexíveis, que podem ser inseridas nos canais radiculares e assim, possibilitando melhor propagação e penetração da luz pelos túbulos dentinários, oferecendo assim melhor efeito antibacteriano, tornando-se uma boa opção para aplicação intracanal, visando a descontaminação²⁶.

Um estudo de Gutknecht et al.²⁶ em discos de dentina bovina resultou em um alcance de 1000 µm de profundidade nos túbulos dentinários com um laser (Biolase, Can Clemente, CA) que emite dois comprimentos de onda simultaneamente (laser Er,Cr:YSGG de 2780nm e laser diodo de 940nm). Neste estudo, blocos de dentina

de diferentes espessuras foram irradiados do lado oposto ao da inoculação com *E. faecalis* para avaliar a influência da espessura dentinária na eficiência bactericida deste laser. Além disso, de modo a simular a irradiação intracanal, os blocos de dentina foram irradiados com uma angulação de incidência de 5 graus entre a ponta da fibra óptica e a dentina.

Borges et al.²⁷ estudaram a descontaminação de blocos de dentina humana infectados com *E. faecalis* por lasers diodo de diferentes comprimentos de onda (808 nm e 970 nm) em modo contínuo de aplicação totalizando 2 W de potência aplicados em cada espécime, associados ou não com a simulação da irrigação prévia com NaOCl a 2,5% ou clorexidina a 2%, mantendo os blocos de dentina imersos nas soluções irrigadoras durante 5 minutos, concluindo que em todos os protocolos testados houve redução do contingente bacteriano, no entanto a associação com as soluções não melhorou significativamente a redução bacteriana.

Em um estudo realizado por Beer et al.²⁸ comparando dois lasers diodo (um de 810 nm de comprimento de onda e outro de 940 nm) na sua capacidade bactericida nos canais radiculares, foi descrita uma redução bacteriana de *E. faecalis* de 98.8% com laser diodo de 810 nm e de 99.66% com o de 940 nm, em dentes que não tiveram suas coroas removidas, de modo a simular a situação clínica, incluindo a cavidade de acesso no protocolo de irradiação.

Já em um estudo realizado por Sohrabi et al.²⁹, foi comparada a atividade antibacteriana sobre *E. faecalis* da irrigação convencional com hipoclorito de sódio a 5.25% e da irradiação com laser diodo 980 nm, com 2 W em modo contínuo, resultando em 99.87% de redução do contingente bacteriano com a solução irrigadora, sem aplicação de laser, e 96.56% de redução quando o canal foi somente irradiado com o laser de alta potência, propondo que este laser seja considerado como manobra complementar na desinfecção dos canais.

De Souza et al.³⁰ associou instrumentação com limas rotatórias, utilizando hipoclorito de sódio a 0.5% de solução irrigadora e irrigação final com EDTA-T a 17%, realizando em seguida a irradiação com laser diodo de alta potência 830 nm. Foram coletadas amostras de dentina circumpulpar e dentina mais profunda. Esta associação alcançou 100% de desinfecção, sobre *E. faecalis*.

Mehrvarzfar et al.³¹ também obteve uma eliminação completa dessa espécie de bactérias quando associou a irrigação com solução MTAD seguida pela secagem do canal com pontas de papel absorvente estéreis e subsequente aplicação de laser

diodo de 810nm com 2W de potência. No entanto a metodologia empregada nestes estudos, avaliou a redução bacteriana apenas 24 h após o tratamento.

Sabe-se que a ativação desse laser converte a energia da luz em energia calórica, causando um aumento de temperatura na superfície externa das raízes. Estudos demonstram que uma temperatura entre 47°C e 50°C, ou seja, aumento em 10°C da temperatura corpórea durante 1 minuto poderá causar necrose óssea, devido ao grau reduzido de vascularização do tecido ósseo³².

O grau dos efeitos causados pelo laser é influenciado pelo comprimento de onda, potência, modo de irradiação, tempo de exposição e tipo de tecido alvo³³. Devido às inúmeras combinações entre estes fatores encontradas na literatura para aplicação dos lasers de alta potência, torna-se necessária a busca por protocolos seguros para a utilização de um determinado tipo de laser, de acordo com as características de irradiação que este possa oferecer. Estudos apontam que a irradiação com laser em modo contínuo gera mais calor quando comparado com o modo pulsado^{34,35}.

Moritz et al.³³ estudou a adequação de um laser diodo de comprimento de onda de 810 nm e 4 W de potência para desinfecção dos canais e demonstrou que a geração de calor é proporcional à duração da irradiação com laser, sendo que quando a fibra óptica foi mantida em uma posição no terço apical por 1, 2 e 3 s, os aumentos de temperatura registrados foram de 6, 12 e 18°C, portanto a fibra deve ser mantida em movimento constante dentro do canal radicular.

Gutknecht et al.³⁴ estudou um protocolo seguro para utilização intracanal de um laser diodo de 810 nm, encontrando que para este aparelho de laser as configurações de 3 e 4 W em modo pulsado, 3 W em modo contínuo, e 4 W em modo contínuo se mostraram seguras sendo que para as três primeiras configurações, deveria ser realizado 5 s de irradiação e 5 s de período de descanso, e para a última configuração seria recomendado um período de descanso de 10 s entre irradiações. O autor conclui, ainda, que para qualquer irradiação intracanal com laser diodo deve ser considerado um período de descanso de 5s entre as irradiações, para prevenir que o aumento de temperatura exceda os limites seguros aceitáveis.

Alfredo et al.³⁵ avaliou a variação de temperatura radicular externa nos terços cervical, médio e apical causadas pela irradiação com um laser diodo de 980 nm de comprimento de onda em diferentes parâmetros, concluindo que em todos os modos

operatórios, a potência de 1,5 W foi considerada segura para utilização no tratamento endodôntico, assim como a potência de 3 W em modo pulsado.

No entanto, cada estudo descreve parâmetros específicos para um determinado aparelho de laser em questão que muitas vezes não se trata do mesmo aparelho que será utilizado por outro autor, variando principalmente a potência e o comprimento de onda. Portanto, torna-se extremamente importante o conhecimento sobre o aparelho que se pretende utilizar, para garantir um protocolo seguro de aplicação clínica, pois a busca de uma completa desinfecção do sistema de canais radiculares deve ocorrer para que o sucesso do tratamento endodôntico seja alcançado, porém sem causar agressão tecidual, de modo que seja garantida a saúde às estruturas teciduais adjacentes.

Assim, embora consideremos como ponto de partida parâmetros a literatura quanto à aplicação do laser de alta potência, orientações importantes como as instruções do fabricante associadas à realização de estudos piloto são a grande chave para se alcançar um protocolo seguro para a utilização de um laser diodo de alta potência com a finalidade de redução bacteriana.

Outro fator a ser considerado, seria a possível alteração estrutural da superfície dentinária determinada pela irradiação laser. Jhingan et al.³⁶ estudou o efeito do laser diodo 940 nm na superfície dentinária intrarradicular e abertura dos túbulos após o preparo biomecânico e relatou a fusão da superfície dentinária intracanal, causando parcial à completa obliteração das aberturas tubulares, resultado que esteve de acordo com estudo prévio de Alfredo et al.³⁷. Segundo os autores, estas áreas de fusão dentinária podem alterar a permeabilidade da superfície, podendo interferir na adesão de cimentos endodônticos. Entretanto, esta mesma obliteração dos túbulos dentinários pode oferecer grande efeito benéfico por dificultar a penetração de microrganismos reduzindo significativamente a chance de reinfecção local, podendo repercutir positivamente na taxa de sucesso do tratamento endodôntico.

2 PROPOSIÇÃO

Este estudo *ex vivo* teve como objetivo avaliar o efeito antibacteriano de um laser diodo de alta potência e 808 nm, a irrigação convencional com NaOCl a 2,5% e combinação destas técnicas em dentes contaminados com *Enterococcus faecalis*.

A hipótese nula é de que na coleta imediatamente após o tratamento não haverá diferença na redução bacteriana entre as técnicas estudadas e o grupo controle sem tratamento.

3 PUBLICAÇÃO*

Atividade antibacteriana do laser diodo de alta potência em dentes humanos infectados com *Enterococcus faecalis*

RESUMO

Este estudo *ex vivo* foi realizado para avaliar o efeito antibacteriano de um laser diodo de alta potência, a irrigação convencional e combinação destas técnicas em dentes contaminados com *Enterococcus faecalis*. Sessenta e cinco dentes com canal único foram preparados e cinquenta e cinco foram contaminados com *E. faecalis*. Após 21 dias de incubação, os espécimes foram divididos em três grupos experimentais (n = 15): NaOCl, Solução salina + laser (SS+laser), e NaOCl+laser; e dois grupos controle (n = 10): Controle positivo (C+) e controle negativo (C-). No grupo NaOCl os espécimes foram irrigados com NaOCl a 2,5%; no SS+laser, foram irrigados com solução salina e posteriormente irradiados com laser; no NaOCl+laser, foram irrigados com NaOCl a 2,5% e posteriormente irradiados com laser. Foram realizadas três coletas microbiológicas (C1- 21 dias após contaminação, C2- imediatamente pós-tratamento e C3- após 7 dias do tratamento) e plaqueamento para determinar a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC mL⁻¹). Na C2, os grupos NaOCl e NaOCl+laser não apresentaram crescimento bacteriano, diferente do grupo SS+laser (p<0,05) que apresentou crescimento bacteriano. Na C3, todos os grupos apresentaram crescimento bacteriano. Os grupos de NaOCl e NaOCl+laser foram significativamente mais eficazes na redução bacteriana em comparação ao de SS+laser (p<0,05) e estes não apresentaram diferença estatística entre si (p>0,05). Nos parâmetros estudados, o laser diodo de alta potência não demonstra efeito significativo em relação ao NaOCl na redução bacteriana intracanal. Novos protocolos de irradiação com laser e associação com soluções irrigadoras e medicamentos devem ser estudados.

Palavras chave: Lasers diodo; endodontia; redução bacteriana; *Enterococcus faecalis*

* Artigo nas normas do periódico *Lasers in Medical Science*

Introdução

O sucesso do tratamento endodôntico, em casos de necrose pulpar, dependem da eliminação de microorganismos do sistema de canais radiculares, evitando a prevalência de bactérias viáveis causadoras de inflamação periapical persistente, para que possa ser realizada a sua obturação de forma segura [1].

Os métodos químico-mecânicos são incapazes de eliminar completamente o sistema de canais radiculares das bactérias [2, 3] já que estas têm a capacidade de penetrar profundamente nos túbulos dentinários, em uma profundidade de até 1100 μm [4], enquanto as soluções irrigadoras, que agem por contato direto, alcançam uma profundidade máxima nos túbulos dentinários de 300 μm [5].

Esta contaminação residual no sistema de canais radiculares é um dos principais motivos do insucesso do tratamento endodôntico [6]. Com o advento da microtomografia computadorizada, é conhecida a complexidade anatômica do sistema de canais radiculares [7, 8], elevando a ciência de que mesmo quando o preparo biomecânico é realizado com os métodos convencionais nos mais elevados padrões técnicos, ainda é impraticável a instrumentação de algumas áreas, tornando a completa remoção bacteriana praticamente impossível [9], salientando a importância do uso de métodos complementares de desinfecção [10].

Além da dificuldade de desinfecção do complexo de túbulos dentinários, a *Enterococcus faecalis*, bactéria Gram-positiva e anaeróbia facultativa [11], é frequentemente encontrada nos casos de insucesso do tratamento endodôntico [12]. Tal persistência ocorre devido à resistência dessa bactéria ao pH alcalino [13, 14], determinado por pastas à base de hidróxido de cálcio, comumente utilizadas como medicação intracanal [15] e além desse microrganismo ser capaz de formar biofilme [16–19] e apresentar diversos fatores de virulência como produção de substâncias agregadoras, enzimas líticas, adesinas de superfície, entre outros, e proliferar profundamente nos túbulos dentinários [20].

Atualmente, têm sido estudadas novas maneiras de combater a infecção no sistema de canais radiculares, como a utilização de lasers. A necessidade do emprego de maiores potências tem sido fonte de estudo para a descontaminação do sistema de canais radiculares [21]. O laser Diodo é um laser de alta potência capaz de ser transmitido através de fibras ópticas finas e flexíveis, que podem ser inseridas nos canais radiculares e assim, possibilitando melhor propagação e penetração da luz pelos túbulos dentinários, oferecendo assim melhor efeito antibacteriano, tornando-se

uma boa opção para aplicação intracanal, visando a descontaminação. Em estudo empregando discos de dentina bovina, um alcance de 1000 µm de profundidade nos túbulos dentinários foi determinado com esta modalidade de laser [22].

Foi descrita uma redução bacteriana de *E. faecalis* de 98.8% com um laser diodo de 810 nm e de 99.66% com um de 940 nm, em dentes que não tiveram suas coroas removidas de forma a simular a situação clínica, quando foi incluída a cavidade de acesso no protocolo de irradiação [23]. Outro estudo comparou a atividade antibacteriana sobre *E. faecalis* da irrigação convencional com hipoclorito de sódio a 5.25% e da irradiação com laser diodo 980nm, com 2W em modo contínuo, resultando em 99.87% de redução do contingente bacteriano com a solução irrigadora e 96.56% de redução quando o canal foi apenas irradiado com o laser de alta potência, sendo inferior à irrigação com NaOCl a 5.25%, propondo que este laser seja considerado como manobra complementar na desinfecção dos canais [24].

Ao associar substâncias, estudos descreveram eliminação completa dessa bactéria, um estudo ao combinar instrumentação com limas rotatórias, hipoclorito de sódio a 0.5% e EDTA-T a 17%, realizando em seguida a irradiação com laser diodo de alta potência 830 nm [25] e outro ao associar a irrigação com solução MTAD e subsequente aplicação de laser diodo de 810 nm com 2 W de potência [26].

Este estudo tem como objetivo avaliar, *in vitro*, a redução bacteriana de *E. faecalis* utilizando laser diodo de alta potência e 808 nm e associado à irrigação com NaOCl. A hipótese nula é de que não haverá diferença na redução bacteriana entre as técnicas estudadas e o grupo controle sem tratamento.

Material e métodos*

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP (Anexo A). Foram selecionados 65 dentes unirradiculados com único canal e formação radicular completa, sem tratamento endodôntico prévio, reabsorções internas ou externas ou lesões de cárie radicular, com auxílio de radiografias digitais no sentido proximal. As coroas foram removidas usando disco diamantado dupla-face (KG Sorensen, São Paulo, Brasil), as raízes foram padronizadas em 15 mm.

* Metodologia detalhada descrita no Apêndice A

O comprimento real de trabalho (CRT) foi estabelecido à 1 mm aquém do forame apical, utilizando limas manuais tipo K #10, instrumentados até lima tipo K #35 e, em seguida, padronizados com o sistema Reciproc (R 50 – VDW CO. München, Alemanha). Durante a instrumentação, foi realizada a irrigação, aspiração e inundação com hipoclorito de sódio a 2.5% (NaviTip® - 29 G, Ultradent, South Jordan, UT, EUA). Posteriormente, o canal foi inundado com EDTA a 17% (Biodinâmica, Ibiporã, PR, Brasil) agitado por 3 minutos, e irrigado com 5 mL de soro fisiológico estéril (Solução de cloreto de sódio a 0.9%).

O preparo dos espécimes foi realizado segundo Guerreiro-Tanomaru et al [27]. Foi realizado o vedamento da região apical de cada raiz com resina composta fotopolimerizável Z100 – Restaurador Universal (3M ESPE, EUA) e a superfície radicular externa foi impermeabilizada com duas camadas de adesivo epóxi (Araldite, Brascola Ltda, Taboão da Serra, SP, Brasil), exceto na região cervical radicular. Os espécimes foram distribuídos aleatoriamente em microplacas de cultura celular de 24-poços (Corning Incorporated, Corning, NY, EUA), fixados nos poços com resina acrílica quimicamente ativada (Clássico Artigos Odontológicos, SP, Brasil) e submetidas à esterilização em óxido de etileno (ACECIL, Campinas, SP, Brasil).

Os procedimentos microbiológicos foram realizados em câmara de fluxo laminar (VecoFlow Ltda., Campinas, SP, Brasil) [27]. Cepa padrão de *E. faecalis* (ATCC 29212) foi reativada em Tryptic Soy Broth – TSb (Difco, Detroit, MI, EUA) por 48 horas. Foi preparada uma suspensão bacteriana na proporção 1:1, com concentração equivalente a 10^8 UFC mL⁻¹. O ajuste da densidade óptica da suspensão foi realizado em espectrofotômetro (Modelo 600 Plus, Femto, São Paulo, SP, Brasil) com comprimento de onda de 600 nm.

Os espécimes foram inoculados com a suspensão bacteriana e o meio de cultura foi repostado nos espécimes a cada 48 h durante 21 dias para formação do biofilme. Os espécimes foram incubados em estufa a 37°C em microaerofilia.

Os espécimes foram divididos em 3 grupos experimentais (n = 15) e 2 controles (n = 10): Controle Negativo (C-) - espécimes receberam apenas meio de cultura estéril; Controle Positivo (C+) - os espécimes receberam apenas a contaminação com suspensão de *E. faecalis* e não sofreram nenhum processo de descontaminação; NaOCl – A irrigação e aspiração deu-se com a agulha de irrigação inserida a 1mm do CRT com 5 mL de NaOCl a 2.5%; Solução salina + Laser (SS + laser) – este grupo foi baseado nos parâmetros pré-determinados para o aparelho de laser em questão na

função “Descontaminação intracanal” e estudo piloto em que foi avaliada a temperatura radicular externa alcançada com este parâmetro, o determinando como seguro para aplicação clínica. - Irrigação com 5 mL de solução salina (cloreto de sódio a 0,85%), aspiração e irradiação com laser diodo (Thera Lase Surgery, DMC, Brasil) de 808 nm em potência de 1.5 W no modo pulsado com 20 pps, A fibra óptica de 400 µm foi introduzida no CRT e foram realizadas três ativações com duração de 5 s e descanso de 5 s entre ativações. Na primeira ativação, foi realizado movimento helicoidal sentido horário fazendo todo o trajeto do canal ápice-coroa, na segunda, o mesmo movimento no sentido anti-horário e a terceira novamente no sentido horário; e NaOCl + Laser – os canais radiculares foram irrigados com 5 mL de Solução de NaOCl durante 60 s, aspirados e irradiados com laser diodo da mesma maneira que no grupo anterior.

Em todos os grupos foram realizadas três coletas microbiológicas: Coleta inicial (C1) foi realizada após 21 dias de contaminação; Coleta pós-tratamento (C2) imediatamente após o tratamento dos espécimes; e Coleta final (C3), 7 dias após C2. Cada coleta foi realizada utilizando dois cones de papel absorvente estéril #50 (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Suíça) em sequência, com 1 min de permanência de cada cone dentro dos canais. Os cones utilizados foram transferidos para tubos com solução salina estéril e agitados (Vortex AP 56, Phoenix, Araraquara, SP, Brasil) durante 1 min, sendo, posteriormente, realizadas diluições decimais seriadas e semeadas em triplicata em placas de Petri com meio tripticase soy agar (Tsa) (Difco, Detroit, MI, EUA). As placas foram incubadas a 37°C durante 48 horas. Após C2, os canais radiculares foram preenchidos com solução salina estéril e mantidos em estufa a 37°C durante 7 dias.

Os dados obtidos da contagem bacteriana (UFC mL⁻¹) foram submetidos à transformação logarítmica de base 10 e analisados por meio do programa GraphPad Prisme 3.0 (San Diego, CA, EUA). Foram aplicados os testes estatísticos de ANOVA e Tukey com nível de significância de 5%.

Resultados

A contaminação dos espécimes com *E. faecalis* foi confirmada na coleta inicial, realizada após 21 dias de incubação, na qual todos os grupos apresentaram contagem de UFC mL⁻¹ log₁₀ similares, registrada na Tabela 1. A viabilidade bacteriana no grupo C+ foi confirmada ao longo de todo o período experimental, demonstrada através das

C1, C2 e C3 ($p > 0,05$). O grupo C- não apresentou contaminação durante o período experimental. Na C2, houve diferença estatística significativa entre o C+ e os demais grupos ($p < 0,05$), assim como o grupo de SS+laser apresentou diferença com os demais grupos ($p < 0,05$), enquanto não houve diferença estatística significativa entre os grupos de NaOCl e NaOCl + laser ($p > 0,05$). Na C3, o grupo SS + laser foi similar ao C+ ($p > 0,05$), enquanto os grupos de NaOCl e NaOCl + laser diferiram do C+ ($p < 0,05$), mas foram similares entre si e ao grupo SS + laser ($p > 0,05$).

Tabela 1 Comparação entre grupos nas coletas inicial, pós-tratamento e final (média e desvio padrão de \log_{10} UFC mL^{-1})

Grupos	C1- Inicial	C2- Pós tratamento	C3- Final
NaOCl	7,061(± 0.459) ^A	0.0(± 0.0) ^C	4.625(± 2.486) ^B
SS+laser	6.994(± 0.588) ^A	4.079(± 0.680) ^B	5.829(± 0.571) ^{AB}
NaOCl+laser	7.370(± 0.424) ^A	0.0(± 0.0) ^C	4.231(± 2.738) ^B
Sem tratamento (C+)	7.370(± 0.316) ^A	6.777(± 0.096) ^A	6.812(± 0.066) ^A

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística significativa entre os grupos ($P < 0,05$). NaOCl, hipoclorito de sódio; SS, solução salina; laser, laser diodo 808 nm com 1,5 W; C+, controle positivo.

Discussão

A hipótese nula foi totalmente confirmada na coleta pós-tratamento e confirmada quando comparados os grupos NaOCl e NaOCl + laser e foi negada em relação ao grupo SS + laser na coleta final após sete dias.

O sucesso do tratamento endodôntico está relacionado com a eliminação de microrganismos do sistema de canais radiculares [1]. A *E. faecalis* tem a capacidade de penetrar nos túbulos dentinários após 21 dias de incubação e formar biofilme [16–19], portanto a metodologia utilizada simulou uma contaminação clínica dessa bactéria resistente, comumente encontrada em casos de insucesso do tratamento endodôntico [12, 28]. Sabe-se, ainda, que soluções irrigantes não são capazes de erradicar permanentemente esse microrganismo do sistema de canais radiculares [29], e este se apresenta também resistente à medicamentos utilizados como medicação intracanal devido à sua resistência ao pH alcalino [13–15].

Estudos prévios relataram completa desinfecção de *E. faecalis*, associando limas rotatórias, NaOCl a 0.5%, EDTA-T a 17% e irradiação com laser diodo de alta potência 830 nm com 3 W [25] e associando irrigação com MTAD e irradiação com laser diodo de alta potência 810 nm com 2 W [26]. No entanto, em ambos estudos, as coletas finais foram realizadas 24 h após o tratamento. No presente estudo, na coleta imediata após o tratamento, tanto o grupo que foi irrigado com NaOCl a 2.5%, quanto o grupo de associação de NaOCl a 2.5% e irradiação com laser diodo 808nm com 1.5W também apresentaram completa desinfecção.

Há ciência de que após o tratamento, os microrganismos presentes na luz do canal são eliminados, mas devido à possível persistência destes nos túbulos dentinários, pode acontecer uma recolonização do sistema de canais radiculares [28]. Esta ocorrência pode explicar a razão pela qual na coleta final, realizada 7 dias após o tratamento, houve um crescimento de *E. faecalis* em todos os grupos experimentais. Este achado está em concordância com estudos prévios, que desenvolveram uma metodologia em que os canais foram contaminados e os espécimes incubados em microaerofilia por 21 dias para que houvesse formação de biofilme de *E. faecalis* e as coletas foram realizadas assim como foi seguido no presente estudo, sendo coleta inicial após 21 dias, imediatamente pós-tratamento e sete dias pós-tratamento e a análise microbiológica foi realizada através da contagem de UFCs, obtida pela diluição decimal seriada e sementeação em placas de Petri. Nestes estudos foram testadas soluções irrigadoras, e em todos os casos houve crescimento bacteriano entre a segunda coleta, imediatamente pós-tratamento, e a coleta final, 7 dias pós-tratamento [29, 30].

O objetivo deste estudo era avaliar a capacidade de redução bacteriana de *E. faecalis* de um laser diodo de alta potência 808 nm e sua associação com NaOCl a 2.5%, comparando com a irrigação convencional utilizando NaOCl na mesma concentração. Na coleta imediata pós-tratamento, todos os grupos apresentaram uma redução efetiva de *E. faecalis*, sendo que os grupos NaOCl e NaOCl + laser apresentaram valores de 0,0 UFC mL⁻¹. Embora o grupo irrigado com solução salina e irradiado com laser tenha obtido valores significantes de redução bacteriana em relação com grupo controle positivo, também houve diferença significativa entre este grupo e os grupos NaOCl e NaOCl+laser, que apresentaram maior capacidade de eliminar bactérias.

Devido ao período de incubação mais longo, de 7 dias após o tratamento, as bactérias viáveis que sobreviveram nos túbulos dentinários puderam crescer novamente. Na coleta final o grupo de SS+laser não apresentou redução significativa quando comparado ao grupo controle positivo, já os grupos de NaOCl e NaOCl+laser apresentaram esta redução em relação ao grupo C+, mas se mostraram similares entre si e entre o grupo de SS+laser, embora numericamente o grupo de combinação entre NaOCl e laser tenha sugerido valores mais baixos de UFC mL⁻¹, sem diferença estatística. Estes resultados sugerem que o laser diodo de alta potência é melhor empregado quando combinado à outros métodos de desinfecção dos canais, estando de acordo com estudos prévios [24–26], além de que outros protocolos de irradiação também podem ser desenvolvidos de modo a aumentar a capacidade de redução bacteriana deste laser.

Previamente ao teste antimicrobiano, foi realizado um piloto com o objetivo de alcançar um protocolo seguro de irradiação com esse aparelho de laser em questão, devido à conversão de energia da luz em energia calórica, que pode elevar a temperatura radicular externa causando danos ao periodonto e osso alveolar [31]. A temperatura máxima atingida com esses parâmetros e protocolo de irradiação aqui estudados foi de 9,5°C e o maior tempo de permanência na temperatura máxima foi de 15 s. Assim, este protocolo, apesar de bastante aquém do limite de segurança, que seria a elevação em 10°C durante 1 min, alcançou determinada redução bacteriana intracanal na primeira coleta após o tratamento. Os resultados deste estudo mostram que a irradiação com laser foi mais eficaz quando combinado com irrigação utilizando NaOCl a 2.5%. No entanto, não houve diferença estatística quando comparado ao grupo em que foi realizada apenas a irrigação convencional. Portanto, é sugerido que outros protocolos, com maior energia dissipada, mas ainda dentro do limite seguro de aplicação, sejam desenvolvidos, de modo a apresentar uma maior eficácia de redução bacteriana, além de outras possíveis associações com soluções e medicamentos, de modo a obter um maior sucesso clínico.

Conclusões

Nos parâmetros estudados, o laser diodo de alta potência não demonstrou efeito significativo sobre *E. faecalis* em relação ao NaOCl na redução bacteriana intracanal. Novos protocolos de irradiação com laser e associação com soluções irrigadoras e medicamentos devem ser estudados frente ao *E. faecalis*.

REFERÊNCIAS

1. Sjögren U, Figdor D, Persson S, Sundqvist G (1997) Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 30:297–306
2. Dalton BC, Ørstavik D, Phillips C, et al (1998) Bacterial reduction with nickel-titanium rotary instrumentation. *J Endod* 24:763–767 . doi: 10.1016/S0099-2399(98)80170-2
3. Neves MAS, Provenzano JC, Rôças IN, Siqueira JF (2016) Clinical Antibacterial Effectiveness of Root Canal Preparation with Reciprocating Single-instrument or Continuously Rotating Multi-instrument Systems. *J Endod* 42:25–29 . doi: 10.1016/j.joen.2015.09.019
4. Kouchi Y, Ninomiya J, Yasuda H, et al (1980) Location of *Streptococcus mutans* in the Dentinal Tubules of Open Infected Root Canals. *J Dent Res* 59:2038–2046 . doi: 10.1177/00220345800590120301
5. Berutti E, Marini R, Angeretti A (1997) Penetration ability of different irrigants into dentinal tubules. *J Endod* 23:725–727 . doi: 10.1016/S0099-2399(97)80342-1
6. Hancock HH, Sigurdsson A, Trope M, Moiseiwitsch J (2001) Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North American population. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology* 91:579–586 . doi: 10.1067/moe.2001.113587
7. Harris SP, Bowles WR, Fok A, McClanahan SB (2013) An Anatomic Investigation of the Mandibular First Molar Using Micro-Computed Tomography. *J Endod* 39:1374–1378 . doi: 10.1016/j.joen.2013.06.034
8. Wolf TG, Paqué F, Zeller M, et al (2016) Root Canal Morphology and Configuration of 118 Mandibular First Molars by Means of Micro-Computed Tomography: An Ex Vivo Study. *J Endod* 42:610–614 . doi: 10.1016/j.joen.2016.01.004
9. Siqueira JF, Araújo MCP, Garcia PF, et al (1997) Histological evaluation of the effectiveness of five instrumentation techniques for cleaning the apical third of root canals. *J Endod* 23:499–502 . doi: 10.1016/S0099-2399(97)80309-3
10. Kim Y, Chang S-W, Lee J-K, et al (2013) A micro-computed tomography study of canal configuration of multiple-canal mesio Buccal root of maxillary first

- molar. Clin Oral Investig 17:1541–1546 . doi: 10.1007/s00784-012-0852-8
11. Zhang C, Du J, Peng Z (2015) Correlation between *Enterococcus faecalis* and Persistent Intraradicular Infection Compared with Primary Intraradicular Infection: A Systematic Review. J Endod 41:1207–1213 . doi: 10.1016/j.joen.2015.04.008
 12. Pinheiro ET, Gomes BPFA, Ferraz CCR, et al (2003) Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. Int Endod J 36:1–11
 13. Weckwerth PH, Zapata RO, Vivian RR, et al (2013) In Vitro Alkaline pH Resistance of *Enterococcus faecalis*. Braz Dent J 24:474–476 . doi: 10.1590/0103-6440201301731
 14. Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D (2002) Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. Int Endod J 35:221–8
 15. Kim D, Kim E (2014) Antimicrobial effect of calcium hydroxide as an intracanal medicament in root canal treatment: a literature review - Part I. In vitro studies. Restor Dent Endod 39:241–52 . doi: 10.5395/rde.2014.39.4.241
 16. Almeida JFA, Gomes BPFA, Ferraz CCR, et al (2007) Filling of artificial lateral canals and microleakage and flow of five endodontic sealers. Int Endod J 40:692–699 . doi: 10.1111/j.1365-2591.2007.01268.x
 17. Chivatxaranukul P, Dashper SG, Messer HH (2008) Dentinal tubule invasion and adherence by *Enterococcus faecalis*. Int Endod J 41:873–882 . doi: 10.1111/j.1365-2591.2008.01445.x
 18. Dametto FR, Ferraz CCR, de Almeida Gomes BPF, et al (2005) In vitro assessment of the immediate and prolonged antimicrobial action of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant against *Enterococcus faecalis*. Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology 99:768–772 . doi: 10.1016/j.tripleo.2004.08.026
 19. Delgado RJR, Gasparoto TH, Sipert CR, et al (2010) Antimicrobial Effects of Calcium Hydroxide and Chlorhexidine on *Enterococcus faecalis*. J Endod 36:1389–1393 . doi: 10.1016/j.joen.2010.04.013
 20. Kayaoglu G, Ørstavik D (2004) Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. Crit Rev Oral Biol Med 15:308–20
 21. Saydjari Y, Kuypers T, Gutknecht N (2016) Laser Application in Dentistry: Irradiation Effects of Nd:YAG 1064 nm and Diode 810 nm and 980 nm in Infected Root Canals-A Literature Overview. Biomed Res Int 2016:8421656 .

- doi: 10.1155/2016/8421656
22. Gutknecht N, Al-Karadaghi TS, Al-Maliky MA, et al (2016) The Bactericidal Effect of 2780 and 940 nm Laser Irradiation on *Enterococcus faecalis* in Bovine Root Dentin Slices of Different Thicknesses. *Photomed Laser Surg* 34:11–16 . doi: 10.1089/pho.2015.3960
 23. Beer F, Buchmair A, Wernisch J, et al (2012) Comparison of two diode lasers on bactericidity in root canals—an in vitro study. *Lasers Med Sci* 27:361–364 . doi: 10.1007/s10103-011-0884-3
 24. Sohrabi K, Sooratgar A, Zolfagharnasab K, et al (2016) Antibacterial Activity of Diode Laser and Sodium Hypochlorite in *Enterococcus Faecalis*-Contaminated Root Canals. *Iran Endod J* 11:8–12 . doi: 10.7508/iej.2016.01.002
 25. de Souza EB, Cai S, Simionato MRL, Lage-Marques JL (2008) High-power diode laser in the disinfection in depth of the root canal dentin. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology* 106:e68–e72 . doi: 10.1016/j.tripleo.2008.02.032
 26. Mehrvarzfar P, Saghiri MA, Asatourian A, et al (2011) Additive effect of a diode laser on the antibacterial activity of 2.5% NaOCl, 2% CHX and MTAD against *Enterococcus faecalis* contaminating root canals: an in vitro study. *J Oral Sci* 53:355–60
 27. Guerreiro-Tanomaru JM, Chávez-Andrade GM, Faria-Júnior NB de, et al (2015) Effect of Passive Ultrasonic Irrigation on *Enterococcus faecalis* from Root Canals: An Ex Vivo Study. *Braz Dent J* 26:342–346 . doi: 10.1590/0103-6440201300022
 28. SIQUEIRAJR J, ROCAS I, SANTOS S, et al (2002) Efficacy of Instrumentation Techniques and Irrigation Regimens in Reducing the Bacterial Population within Root Canals. *J Endod* 28:181–184 . doi: 10.1097/00004770-200203000-00009
 29. Dornelles-Morgental R, Guerreiro-Tanomaru JM, de Faria-Júnior NB, et al (2011) Antibacterial efficacy of endodontic irrigating solutions and their combinations in root canals contaminated with *Enterococcus faecalis*. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology* 112:396–400 . doi: 10.1016/j.tripleo.2011.02.004
 30. Aranda-Garcia AR, Guerreiro-Tanomaru JM, Faria-Júnior NB, et al (2012) Antibacterial effectiveness of several irrigating solutions and the Endox Plus

- system - an *ex vivo* study. *Int Endod J* 45:1091–1096 . doi: 10.1111/j.1365-2591.2012.02069.x
31. Eriksson AR, Albrektsson T (1983) Temperature threshold levels for heat-induced bone tissue injury: a vital-microscopic study in the rabbit. *J Prosthet Dent* 50:101–7

4 CONCLUSÃO

O laser diodo de alta potência utilizado neste estudo, com o determinado protocolo, se mostrou mais eficaz quando combinado à irrigação convencional com NaOCl, não apresentando diferença estatística de quando foi realizada apenas a irrigação convencional. É sugerido que sejam desenvolvidos novos protocolos de irradiação, de modo a aumentar a eficácia do laser na redução bacteriana intracanal de *E. faecalis*.

REFERÊNCIAS*

1. Sabino F. O encontro marcado. 79. ed. Rio de Janeiro: Record; 2005.
2. Sjögren U, Figdor D, Persson S, Sundqvist G. Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Int Endod J.* 1997; 30(5):297–306.
3. Dalton BC, Ørstavik D, Phillips C, Pettiette M, Trope M. Bacterial reduction with nickel-titanium rotary instrumentation. *J Endod.* 1998; 24(11):763–7.
4. Neves MAS, Provenzano JC, Rôças IN, Siqueira JF. Clinical antibacterial effectiveness of root canal preparation with reciprocating single-instrument or continuously rotating multi-instrument systems. *J Endod.* 2016; 42(1):25–9.
5. Kouchi Y, Ninomiya J, Yasuda H, Fukui K, Moriyama T, Okamoto H. Location of *Streptococcus mutans* in the dentinal tubules of open infected root canals. *J Dent Res.* 1980; 59(12):2038–46.
6. Berutti E, Marini R, Angeretti A. Penetration ability of different irrigants into dentinal tubules. *J Endod.* 1997; 23(12):725–7.
7. Hancock HH, Sigurdsson A, Trope M, Moiseiwitsch J. Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North American population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001; 91(5):579–86.
8. Harris SP, Bowles WR, Fok A, McClanahan SB. An anatomic investigation of the mandibular first molar using micro-computed tomography. *J Endod.* 2013; 39(11):1374–8.
9. Wolf TG, Paqué F, Zeller M, Willershausen B, Briseño-Marroquín B. Root canal morphology and configuration of 118 mandibular first molars by means of micro-computed tomography: an ex vivo study. *J Endod.* 2016; 42(4):610–4.
10. Siqueira JF, Araújo MCP, Garcia PF, Fraga RC, Dantas CJS. Histological evaluation of the effectiveness of five instrumentation techniques for cleaning the apical third of root canals. *J Endod.* 1997; 23(8):499–502.
11. Kim Y, Chang S-W, Lee J-K, Chen I-P, Kaufman B, Jiang J, et al. A micro-computed tomography study of canal configuration of multiple-canal mesio-buccal root of maxillary first molar. *Clin Oral Investig.* 2013; 17(6):1541–6.
12. Zhang C, Du J, Peng Z. Correlation between *Enterococcus faecalis* and persistent intraradicular infection compared with primary intraradicular infection: a systematic review. *J Endod.* 2015; 41(8):1207–13.

*De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAR, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacaoatualizado.pdf>

13. Pinheiro ET, Gomes BPFA, Ferraz CCR, Sousa ELR, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J.* 2003; 36(1):1–11.
14. Siqueira JF, Rôças IN. Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004; 97(1):85–94.
15. Weckwerth PH, Zapata RO, Vivian RR, Tanomaru Filho M, Maliza AGA, Duarte MAH. In vitro alkaline pH resistance of *Enterococcus faecalis*. *Braz Dent J.* 2013; 24(5):474–6.
16. Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *Int Endod J.* 2002; 35(3):221–8.
17. Kim D, Kim E. Antimicrobial effect of calcium hydroxide as an intracanal medicament in root canal treatment: a literature review - Part I. In vitro studies. *Restor Dent Endod.* 2014; 39(4):241–52.
18. Almeida JFA, Gomes BPFA, Ferraz CCR, Souza-Filho FJ, Zaia AA. Filling of artificial lateral canals and microleakage and flow of five endodontic sealers. *Int Endod J.* 2007; 40(9):692–9.
19. Chivatxaranukul P, Dashper SG, Messer HH. Dentinal tubule invasion and adherence by *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J.* 2008; 41(10):873–82.
20. Dametto FR, Ferraz CCR, de Almeida Gomes BPF, Zaia AA, Teixeira FB, de Souza-Filho FJ. In vitro assessment of the immediate and prolonged antimicrobial action of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant against *Enterococcus faecalis*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005; 99(6):768–72.
21. Delgado RJR, Gasparoto TH, Sipert CR, Pinheiro CR, Moraes IG, Garcia RB, et al. Antimicrobial effects of calcium hydroxide and chlorhexidine on *Enterococcus faecalis*. *J Endod.* 2010; 36(8):1389–93.
22. Kayaoglu G, Ørstavik D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2004; 15(5):308–20.
23. Frota MF da. Terapia fotodinâmica em dentes contaminados com *Enterococcus faecalis* utilizando a curcumina como fotossensibilizador [Dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2013.
24. Souza LC, Brito PRR, Machado de Oliveira JC, Alves FRF, Moreira E JL, Sampaio-Filho HR, et al. Photodynamic therapy with two different photosensitizers as a supplement to instrumentation/irrigation procedures in promoting intracanal reduction of *Enterococcus faecalis*. *J Endod.* 2010; 36(2):292–6.

25. Saydjari Y, Kuypers T, Gutknecht N. Laser application in dentistry: irradiation effects of nd:yag 1064 nm and diode 810 nm and 980 nm in infected root canals—a literature overview. *Biomed Res Int.* 2016; 2016:8421656.
26. Gutknecht N, Al-Karadaghi TS, Al-Maliky MA, Conrads G, Franzen R. The bactericidal effect of 2780 and 940 nm laser irradiation on *Enterococcus faecalis* in bovine root dentin slices of different thicknesses. *Photomed Laser Surg.* 2016; 34(1):11–6.
27. Borges CC, Estrela C, Lopes FC, Palma-Dibb RG, Pecora JD, De Araújo Estrela CR, et al. Effect of different diode laser wavelengths on root dentin decontamination infected with *Enterococcus faecalis*. *J Photochem Photobiol B Biol.* 2017; 176:1–8.
28. Beer F, Buchmair A, Wernisch J, Georgopoulos A, Moritz A. Comparison of two diode lasers on bactericidity in root canals—an in vitro study. *Lasers Med Sci.* 2012; 27(2):361–4.
29. Sohrabi K, Sooratgar A, Zolfagharnasab K, Kharazifard MJ, Afkhami F. Antibacterial activity of diode laser and sodium hypochlorite in *Enterococcus Faecalis*-contaminated root canals. *Iran Endod J.* 2016; 11(1):8–12.
30. de Souza EB, Cai S, Simionato MRL, Lage-Marques JL. High-power diode laser in the disinfection in depth of the root canal dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008; 106(1):e68–72.
31. Mehrvarzfar P, Saghiri MA, Asatourian A, Fekrazad R, Karamifar K, Eslami G, et al. Additive effect of a diode laser on the antibacterial activity of 2.5% NaOCl, 2% CHX and MTAD against *Enterococcus faecalis* contaminating root canals: an in vitro study. *J Oral Sci.* 2011; 53(3):355–60.
32. Eriksson AR, Albrektsson T. Temperature threshold levels for heat-induced bone tissue injury: a vital-microscopic study in the rabbit. *J Prosthet Dent.* 1983; 50(1):101–7.
33. Moritz A, Gutknecht N, Goharkhay K, Schoop U, Wernisch J, Sperr W. In vitro irradiation of infected root canals with a diode laser: results of microbiologic, infrared spectrometric, and stain penetration examinations. *Quintessence Int.* 1997; 28(3):205–9.
34. Gutknecht N, Franzen R, Meister J, Vanweersch L, Mir M. Temperature evolution on human teeth root surface after diode laser assisted endodontic treatment. *Lasers Med Sci.* 2005; 20(2):99–103.
35. Alfredo E, Marchesan MA, Sousa-Neto MD, Brugnera-Júnior A, Silva-Sousa YTC. Temperature variation at the external root surface during 980-nm diode laser irradiation in the root canal. *J Dent.* 2008; 36(7):529–34.
36. Jhingan P, Sandhu M, Jindal G, Goel D, Sachdev V. An in-vitro evaluation of the effect of 980 nm diode laser irradiation on intra-canal dentin surface and dentinal tubule openings after biomechanical preparation: scanning electron microscopic study. *Indian J Dent.* 2015; 6(2):85.

37. Alfredo E, Souza-Gabriel AE, Silva SRC, Sousa-Neto MD, Brugnera-Junior A, Silva-Sousa YTC. Morphological alterations of radicular dentine pretreated with different irrigating solutions and irradiated with 980-nm diode laser. *Microsc Res Tech.* 2009; 72(1):22–7.
38. Guerreiro-Tanomaru JM, Chávez-Andrade GM, Faria-Júnior NB de, Watanabe E, Tanomaru-Filho M. Effect of passive ultrasonic irrigation on *Enterococcus faecalis* from root canals: an ex vivo study. *Braz Dent J.* 2015; 26(4):342–6.
39. Harrison AJ, Chivatxaranukul P, Parashos P, Messer HH. The effect of ultrasonically activated irrigation on reduction of *Enterococcus faecalis* in experimentally infected root canals. *Int Endod J.* 2010; 43(11):968–77.
40. Siqueira-Jr J, Rocas I, Santos S, Lima K, Magalhaes F, Deuzeda M. Efficacy of instrumentation techniques and irrigation regimens in reducing the bacterial population within root canals. *J Endod.* 2002; 28(3):181–4.
41. Dornelles-Morgental R, Guerreiro-Tanomaru JM, de Faria-Júnior NB, Hungaro-Duarte MA, Kuga MC, Tanomaru-Filho M. Antibacterial efficacy of endodontic irrigating solutions and their combinations in root canals contaminated with *Enterococcus faecalis*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2011; 112(3):396–400.
42. Aranda-Garcia AR, Guerreiro-Tanomaru JM, Faria-Júnior NB, Chavez-Andrade GM, Leonardo RT, Tanomaru-Filho M, et al. Antibacterial effectiveness of several irrigating solutions and the endox plus system - an ex vivo study. *Int Endod J.* 2012; 45(12):1091–6.
43. Chávez Andrade GM. Atividade antimicrobiana, antibiofilme e citotóxica de soluções de nanopartículas de prata e Farnesol para desinfecção de canais radiculares [Tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2016.

APÊNDICE A – METODOLOGIA DETALHADA

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP (ANEXO A). Foram selecionados 65 dentes unirradiculados com único canal que apresentavam formação radicular completa, sem tratamento endodôntico prévio, reabsorções internas ou externas ou lesões de cárie radicular, com auxílio de radiografias digitais no sentido proximal. As coroas foram removidas por meio de disco diamantado dupla-face (KG Sorensen, São Paulo, Brasil), as raízes foram padronizadas em 15 mm.

As raízes foram posicionadas em uma morsa para serem instrumentadas (Figura A1.A). O comprimento real de trabalho (CRT) foi estabelecido pela exploração do canal radicular com uma lima tipo K #10 (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Suíça) até que esta fosse visualizada no forame apical e, então, recuando 1 mm. Os canais radiculares foram então instrumentados com limas manuais tipo K até o instrumento #35 e, em seguida, padronizados com o sistema Reciproc (Reciproc R 50 –VDW CO. München, Alemanha) (Figuras A1.B e C). Durante toda a instrumentação, foi realizada a irrigação, aspiração e inundação com hipoclorito de sódio a 2,5% por meio de pontas NaviTip® com diâmetro de 29ga (Ultradent, South Jordan, UT, EUA). Terminada a instrumentação, o canal foi inundado com EDTA a 17% (Biodinâmica, Ibioporã, PR, Brasil) agitado por 3 minutos, sendo por fim irrigado com 5 mL de soro fisiológico.

Figura A1 – Preparo dos espécimes



(A) Espécimes posicionados para a instrumentação; (B) Instrumento R50; (C) Motor Reciproc ajustado em “reciproc all”(C)

Fonte: Arquivo pessoal do autor

Posteriormente, foi realizado o vedamento da região apical de cada raiz (Figura A2.D) com resina composta fotopolimerizável Z100 – Restaurador Universal

(3M ESPE, EUA) e a superfície radicular externa foi impermeabilizada com duas camadas de adesivo epóxi (Araldite, Brascola Ltda, Taboão da Serra, SP, Brasil), exceto na região cervical radicular (Figuras A2.E e F). Os espécimes foram distribuídos aleatoriamente em cinco microplacas de cultura celular de 24-poços (Corning Incorporated, Corning, NY, EUA), três microplacas receberam 15 dentes e duas receberam 10 (Figura A2.G), fixados nos poços com resina acrílica quimicamente ativada (Clássico Artigos Odontológicos, SP, Brasil). As microplacas com os espécimes foram embaladas e submetidas à esterilização em óxido de etileno (ACECIL, Campinas, SP, Brasil).

Figura A2 – Preparo dos espécimes para estudo microbiológico



(A) Resina composta fotopolimerizável utilizada para selar o forame apical; (B) Adesivo epóxi; (C) Espécimes posicionados para secagem; (D) Espécimes fixados em microplacas.

Fonte: Chávez Andrade ⁴³, p. 81

Cultura e contaminação com E. faecalis:

Os procedimentos microbiológicos foram realizados em câmara de fluxo laminar (VecoFlow Ltda., Campinas, SP, Brasil). Culturas puras de *E. faecalis* foram reativadas em Tryptic Soy Broth – TSb (Difco, Detroit, MI, EUA) por 48 horas. As bactérias foram inoculadas em placas de Tryptic Soy Agar – TSa (Difco, Detroit, MI, EUA) e incubadas a 37°C por 48 horas. Foi preparada uma suspensão bacteriana, em

solução fisiológica estéril (Solução de cloreto de sódio a 0.9%), com concentração equivalente a 10^8 UFC mL⁻¹. O ajuste da densidade óptica da suspensão foi realizado em espectrofotômetro (Modelo 600 Plus, Femto, São Paulo, SP, Brasil) com comprimento de onda de 600 nm.

Os espécimes, fixados nas microplacas e esterilizados, foram inoculados pela aplicação da suspensão bacteriana pura de *E. faecalis* (ATCC 29212) em meio de cultura TSb (Difco, Detroit, MI, EUA), na proporção de 1:1, até preencher completamente o canal radicular utilizando pipeta com 20µl. O meio de cultura foi repostado nos espécimes a cada 48 horas durante 21 dias para formação do biofilme. Todas as microplacas foram mantidas em estufa a 37°C em microaerofilia.

Divisão dos grupos experimentais:

Os 65 dentes foram divididos em 2 grupos controle e 3 grupos experimentais:

- Controle Negativo (n = 10) - espécimes receberam apenas meio de cultura estéril.

- Controle Positivo (n = 10) - os espécimes receberam apenas a contaminação com suspensão de *E. faecalis* e não sofreram nenhum processo de descontaminação.

- NaOCl (n = 15) - Descontaminação convencional - os canais foram irrigados com 5mL de NaOCl 2,5% por 60 s com uma seringa de 5 mL e agulha 30-G.

- Solução Salina + laser (n = 15) – Descontaminação por laser de alta potência - os canais foram irrigados com 5 mL de solução salina (cloreto de sódio a 0,85%) durante 60 s com uma seringa de 5 mL e agulha 30-G, aspirados e irradiados com laser diodo (Thera Lase Surgery, DMC, Brasil) de 808 nm em potência de 1,5 W no modo pulsado com 20 pulsos por segundo (pps). A fibra óptica de 400 µm foi introduzida no comprimento de trabalho e foram realizadas três ativações com duração de 5 s e descanso de 5 s entre ativações. Na primeira ativação, foi realizado movimento helicoidal sentido horário fazendo todo o trajeto do canal ápice-coroa, na segunda, o mesmo movimento no sentido anti-horário e a terceira novamente no sentido horário

- NaOCl + laser (n = 15) – Descontaminação convencional em associação com laser de alta potência - os canais foram irrigados com 5 mL de Solução de NaOCl durante 60 s com uma seringa de 5 mL e agulha 30-G, aspirados e irradiados com laser diodo da mesma maneira que no grupo anterior.

Coletas e análise microbiológica:

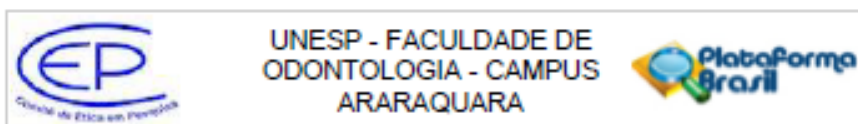
Em todos os grupos foram realizadas três coletas microbiológicas: Coleta inicial (C1) foi realizada após 21 dias de contaminação; Coleta pós-tratamento (C2) imediatamente após o tratamento dos espécimes; e Coleta final (C3), 7 dias após C2. As coletas foram realizadas utilizando dois cones de papel absorvente estéril #50 (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Suíça) em sequência..

Cada coleta foi realizada utilizando dois cones de papel absorvente estéril #50 (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Suíça) após os canais radiculares terem sido previamente preenchidos com solução salina estéril. Este procedimento foi realizado três vezes. Os cones utilizados foram transferidos para tubos com solução salina estéril e agitados (Vortex AP 56, Phoenix, Araraquara, SP, Brasil) durante 1 minuto, sendo, posteriormente, realizadas diluições decimais seriadas e semeadas em triplicata em placas de petri com meio TSA (Difco, Detroit, MI, EUA). As placas foram incubadas a 37°C durante 48 horas.

Após a segunda coleta, os canais radiculares foram preenchidos com solução salina estéril e mantidos em estufa a 37°C durante 7 dias. Os resultados foram obtidos por meio da contagem de unidades formadoras de colônia por mL (UFCs/mL).

Os dados obtidos da contagem das unidades formadoras de colônias foram submetidos à transformação logarítmica de base 10 e analisados por meio do programa GraphPad Prism 3.0 (San Diego, CA, EUA). Na comparação entre os grupos experimentais, foram aplicados o teste de ANOVA e o teste de comparações múltiplas de Tukey com significância de 5%.

ANEXO A – Certificado do comitê de ética em pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Atividade antibacteriana do laser diodo de alta potência em dentes humanos infectados com *Enterococcus faecalis*

Pesquisador: Fábio Luiz Camargo Villela Berbert

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 76563317.4.0000.5416

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

Patrocinador Principal: MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.385.606

Apresentação do Projeto:

Neste projeto o pesquisador pretende utilizar 65 dentes uniradiculares para avaliar a capacidade de descontaminação do canal radicular pelo laser diodo de alta potencia no modo pulsado, de forma a encontrar um protocolo de desinfecção por laser que não seja prejudicial aos tecidos.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo deste estudo é avaliar o laser diodo de alta potência (808nm) na sua atividade antibacteriana sobre *Enterococcus Faecalis*.

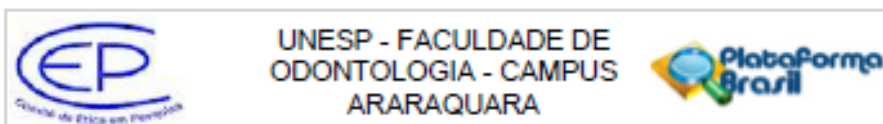
Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Os riscos envolvem os pesquisadores que serão submetidos à radiação uma vez que durante a seleção dos dentes será necessário realizar tomadas radiográficas para padronizar os espécimes, dessa maneira, será utilizado um sistema radiografico digital (menor tempo de exposição) com utilização de uma caixa de chumbo que evitará a propagação da radiação e protegerá o operador. Nos laboratórios, os profissionais envolvidos farão

uso de EPIs indicados quanto ao Mapa de Risco de cada ambiente.

Benefícios: Os benefícios obtidos estão relacionados às observações com relação à atividade antibacteriana deste laser sobre *E. faecalis*, buscando um metodo complementar na desinfecção clinica dos canais e maior taxa de sucesso no tratamento endodôntico.

Endereço: HUMAITA 1680
 Bairro: CENTRO CEP: 14.801-903
 UF: SP Município: ARARAQUARA
 Telefone: (16)3301-6499 E-mail: cep@foar.unesp.br



Continuação do Parecer: 2.385.006

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O estudo é relevante pois pode determinar uma metodologia que permitiria uma maior taxa de sucesso no tratamento endodôntico.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos foram apresentados.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não existem pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

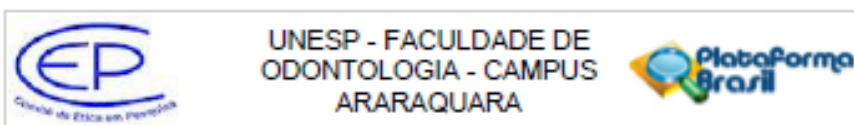
Protocolo APROVADO em reunião de 17 de Novembro de 2017.

O pesquisador deverá encaminhar relatórios parciais a cada 01 (um) ano até o prazo final da pesquisa, quando deverá encaminhar o relatório final.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	FB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_927320.pdf	22/10/2017 21:16:42		Aceito
Outros	micro_compromisso.pdf	22/10/2017 21:16:19	Fábio Luiz Camargo Vilela Berbert	Aceito
Outros	micro_orcamento.pdf	14/09/2017 16:13:45	Fábio Luiz Camargo Vilela Berbert	Aceito
Outros	micro_banco_de_dentes_.pdf	14/09/2017 15:25:20	Fábio Luiz Camargo Vilela Berbert	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_micro.pdf	24/05/2017 16:36:09	Fábio Luiz Camargo Vilela Berbert	Aceito
Outros	micro_ressarc.pdf	24/05/2017 14:53:56	Fábio Luiz Camargo Vilela Berbert	Aceito
Outros	micro_devolucao_sobras.pdf	24/05/2017 14:53:37	Fábio Luiz Camargo Vilela Berbert	Aceito
Outros	micro_detalhamento_despesas.pdf	24/05/2017 14:53:16	Fábio Luiz Camargo Vilela Berbert	Aceito
Outros	micro_autorizacao_laboratorio.pdf	24/05/2017 14:52:29	Fábio Luiz Camargo Vilela Berbert	Aceito
TCE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	micro_tce.pdf	24/05/2017 14:51:33	Fábio Luiz Camargo Vilela Berbert	Aceito

Endereço: HUMAITA 1680
Bairro: CENTRO CEP: 14.801-903
UF: SP Município: ARARAQUARA
Telefone: (16)3301-6459 E-mail: cep@foar.unesp.br



Continuação do Parecer: 2.385.000

Folha de Rosto	micro_folha_de_rosto.pdf	24/05/2017 14:51:17	Fábio Luiz Camargo Vilela Berbert	Aceito
----------------	--------------------------	------------------------	--------------------------------------	--------

Situação do Parecer:

Aprovado

Neecessita Apreciação da CONEP:

Não

ARARAQUARA, 17 de Novembro de 2017

Assinado por:
Ligia Antunes Perreira Pinelli
(Coordenador)

Endereço: HUMAITA 1620
Bairro: CENTRO CEP: 14.801-900
UF: SP Município: ARARAQUARA
Telefone: (16)3301-8459 E-mail: ocp@foar.unesp.br

Não autorizo a reprodução deste trabalho até dia 29 de março de 2020

(Direitos de publicação reservados ao autor)

Araraquara, 29 de março de 2018

Ariel Zogbi Barbosa Mançanares