

ANA FLAVIA FOLHAS NATALI

Avaliação da associação de dióxido de carbono pressurizado ao hipoclorito de sódio na inativação do biofilme de *Enterococcus faecalis* nos canais radiculares

**Araçatuba
2022**

ANA FLAVIA FOLHAS NATALI

Avaliação da associação de dióxido de carbono pressurizado ao hipoclorito de sódio na inativação do biofilme de *Enterococcus faecalis* nos canais radiculares

Trabalho de conclusão de curso apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Bacharel em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Rogerio de Castilho Jacinto

**Araçatuba
2022**

Os resultados deste trabalho dedico aos meus pais, Marcos Natali e Edilete dos Santos Folhas, com todo meu amor e infinitos agradecimentos, cujo apoio incondicional me deu forças para seguir em frente. Sem eles, nada disso teria sido possível.

AGRADECIMENTO

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, na pessoa do diretor da Faculdade de Odontologia de Araçatuba Prof. **Glauco Issamu Miyahara** e do vice-diretor Prof. **Alberto Carlos Botazzo Delbem**.

Aos **funcionários** da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP pelo carinho e atenção sempre oferecidos.

Meus sinceros agradecimentos a todos **os Professores da Faculdade de Odontologia de Araçatuba** por todo ensinamento, pela dedicação e inspiração. Obrigada por serem mestres e me ensinarem uma profissão tão linda.

À agência de Fomento **FAPESP**. Processo nº 2021/02260-6, Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Rogerio de Castilho Jacinto** por ter me aceitado como orientada, e ter me dado a oportunidade de realizar a iniciação científica, que contribuiu ricamente para o meu conhecimento durante a graduação.

À **Mestranda Júlia Guerra de Andrade**, por ter me ajudado com as responsabilidades da iniciação científica.

Ao **Prof. Dr. Gustavo Sivieri Araujo** e à **Doutoranda Ana Paula Fernandes Ribeiro**, por terem aceitado meu convite em compor minha banca avaliadora.

À minha família, primeiramente aos meus pais, **Edilete dos Santos Folhas e Marcos Natali**, por terem criado a mim e a meus irmãos com tanta dedicação, amor e abdicção. As minhas conquistas são de vocês e para vocês, para que um dia eu possa retribuir mil vezes o que vocês proporcionaram para mim. À minha irmã, **Ana Caroline Folhas Natali** minha melhor amiga e muitas vezes mãe, que abdicou de tantas coisas para si, para me ajudar. Espero poder retribuir tudo o que você faz por mim com tanto carinho. Ao meu irmão **Marcos Felipe Folhas Natali**, meu melhor amigo, obrigada pela parceria e pelas nossas conversas que sempre enriquecem o meu conhecimento. Vocês me deram forças para eu não desistir.

Agradeço também as minhas tias maternas, **Eliane Folhas, Edilene Folhas, Maria do Carmo Folhas, Maria das Dores Costa**, que ao longo desses seis anos me ajudaram cada uma da sua forma, vocês foram essenciais para a minha formação. Agradeço também ao meu tio **Dorival Costa**, por ser meu exemplo de perseverança nos estudos. Em especial Agradeço a minha tia materna **Marlene Costa**, mulher batalhadora, que foi por três anos a minha mãe do coração, que me deu casa, carinho e apoio emocional.

Às minhas amigas de graduação, **Leticia Gabriella de Souza Rodrigues, Beatriz da Silva Araújo, Izabela Fornazari Delamura, Natalia Cristina de Souza Moraes, Priscila Marchesini**, a amizade de vocês foi um presente que a graduação me deu, vocês foram meu porto seguro, tornaram os dias mais leves e divertidos.

Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana.

Carl Jung

NATALI, AFF. **Avaliação da associação de dióxido de carbono pressurizado ao hipoclorito de sódio na inativação do biofilme de *Enterococcus faecalis* nos canais radiculares** (Trabalho de Conclusão de Curso) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2022.

RESUMO

A irrigação do sistema de canais radiculares durante o preparo químico-mecânico é parte essencial para a obtenção do sucesso do tratamento endodôntico. Muitos trabalhos vêm buscando novos protocolos de irrigação para promover uma melhor limpeza e desinfecção dos sistemas de canais radiculares. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar a eficácia da associação do dióxido de carbono (CO₂) pressurizado ao hipoclorito de sódio (NaOCl) na inativação do biofilme de *Enterococcus faecalis* presentes no interior dos canais radiculares através de cultura microbiológica. Para isso, 40 pré-molares inferiores humanos extraídos foram contaminados com *E. faecalis* por um período de 10 dias. Foram criados 4 grupos de acordo com o protocolo de irrigação: Grupo 1- irrigação convencional com hipoclorito de sódio 2,5% (NaOCl); Grupo 2- irrigação convencional com NaOCl 2,5% associado ao dióxido de carbono (CO₂); Grupo 3- solução salina estéril; Grupo 4- solução salina estéril associada ao CO₂; a análise das amostras foi realizada através da contagem do número de unidades formadoras de colônias nas placas comparando a coleta inicial (S1) com a coleta do canal após a irrigação (S2). Para análise estatística, os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade, foi aplicado o teste Two-way ANOVA de medidas repetidas, a um nível de significância de 5%. Os dados foram analisados no programa Sigma Plot 12.0 (Systat Software Inc., San Jose, USA). Bactérias cultiváveis estavam presentes em todas as amostras (S1). Todos os protocolos de irrigação foram eficazes na redução da carga bacteriana, independente da solução utilizada ($p < 0,05$). A associação com CO₂ melhorou a eficácia da descontaminação do canal radicular quando associado ao NaOCl 2,5% ($p < 0,05$) e os dois grupos foram superiores ao grupo da solução salina estéril ($p < 0,05$). Não houve diferença entre os grupos da solução salina estéril e solução salina estéril + CO₂ ($p > 0,05$). Em conclusão, o CO₂ não demonstrou ação antibacteriana, porém potencializou a ação do NaOCl 2.5% sobre o biofilme de *E. faecalis*.

Palavras-chave: endodontia, *Enterococcus faecalis*, hipoclorito de sódio, dióxido de carbono, bactérias

NATALI, AFF. **Evaluation of the association of pressurized carbon dioxide with sodium hypochlorite in the inactivation of *Enterococcus faecalis* biofilm in root canals.** (Trabalho de Conclusão de Curso) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2022.

ABSTRACT

Irrigation of the root canal system during chemical-mechanical preparation is an essential part of successful endodontic treatment. Many works have been looking for new irrigation protocols to promote better cleaning and disinfection of root canal systems. Thus, the aim of this work was to evaluate the effectiveness of the association of pressurized carbon dioxide (CO₂) with sodium hypochlorite (NaOCl) in the inactivation of the *Enterococcus faecalis* biofilm present inside the root canals through microbiological culture. For this, 40 extracted human lower premolars were contaminated with *E. faecalis* for a period of 10 days. Four groups were created according to the irrigation protocol: Group 1- conventional irrigation with 2.5% sodium hypochlorite (NaOCl); Group 2- conventional irrigation with 2.5% NaOCl associated with carbon dioxide (CO₂); Group 3- sterile saline solution; Group 4- sterile saline solution associated with CO₂; sample analysis was performed by counting the number of colony forming units on the plates comparing the initial collection (S1) with the canal collection after irrigation (S2). For statistical analysis, the data obtained were submitted to the normality test, the Two-way ANOVA test of repeated measures was applied, at a significance level of 5%. Data were analyzed using the Sigma Plot 12.0 program (Systat Software Inc., San Jose, USA). Cultivable bacteria were present in all samples (S1). All irrigation protocols were effective in reducing bacterial load, regardless of the solution used ($p < 0.05$). The association with CO₂ improved the effectiveness of root canal decontamination when associated with 2.5% NaOCl ($p < 0.05$) and both groups were superior to the sterile saline group ($p < 0.05$). There was no difference between the sterile saline and sterile saline + CO₂ groups ($p > 0.05$). In conclusion, CO₂ did not demonstrate antibacterial action, however it improved the action of NaOCl 2.5% on the *E. faecalis* biofilm.

Keywords: endodontics, *Enterococcus faecalis*, sodium hypochlorite, carbon dioxide, bacteria

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Cone de papel absorvente mantido por 1 minuto em cada canal radicular 17
- Figura 2 - (a) as raízes de cada grupo foram montadas em aparelho de alumínio estéril; (b) e foram irrigadas com o respectivo protocolo de irrigação. 17
- Figura 3 - Máquina para Gaseificar Água Jet SodaStream 18
- Figura 4 - Confirmação do crescimento bacteriano. a. Crescimento bacteriano inicial (Unidade formadora de colônia). b. Contaminação no interior dos túbulos (Microscopia eletrônica de varredura). 19

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Mediana (25%, valores de quartis de 75%) de UFC/ml antes e após protocolo de irrigação com NaOCl 2,5% e soro fisiológico com ou sem adição de CO₂ e porcentagem de redução de UFC. 20

LISTA DE SIGLAS

% - Porcento

°C – graus Celsius

µl - microlitro

BHI - caldo de infusão de cérebro-coração

CO₂ - dióxido de carbono

EDTA - ácido etilenodiaminotetracético

G – Gramas

Hs - horas

ml – mililitros

Mm – milímetros

NaOCl- hipoclorito de sódio

PCD - dióxido de carbono pressurizado

PI – Protocolo de irrigação

PUI – irrigação ultrassônica passiva

UFC – unidade formadoras de colônia

S1- coleta inicial

S2 – coleta final

S - Segundos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	OBJETIVOS.....	14
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
3.1	Seleção e preparo das amostras	15
3.1.1	Contaminação das amostras com <i>Enterococcus faecalis</i>	15
3.1.2	Coletas das amostras e cultura microbiológica.....	16
3.1.3	Divisão dos grupos.....	17
3.2	Forma de análise dos resultados	19
3.3	Estudo piloto.....	19
4	RESULTADOS	20
5	DISCUSSÃO.....	22
6	CONCLUSÃO.....	24
	REFERÊNCIAS	25
	ANEXO	29

1 INTRODUÇÃO

A irrigação do sistema de canais radiculares durante o preparo químico-mecânico é parte essencial para a obtenção do sucesso do tratamento endodôntico.¹ Dentro de suas funções principais, destacam-se a de limpeza, lubrificação e desinfecção do canal.² Além disso, devido à complexidade anatômica do sistema de canais radiculares, a irrigação favorece a limpeza de regiões que os instrumentos não conseguem atingir como deltas apicais, istmos e no interior dos túbulos dentinários.³

Atualmente, o hipoclorito de sódio (NaOCl) é o irrigante mais utilizado na endodontia, principalmente devido à sua atividade antimicrobiana e capacidade de dissolução de tecido orgânico.^{4,5} A atividade antimicrobiana do hipoclorito de sódio está relacionada à sua ação nos sítios enzimáticos das bactérias promovendo alterações celulares irreversíveis e a destruição de fosfolipídios pela formação de cloraminas que interferem no metabolismo das células, através da sua ação oxidante e pela degradação de ácidos graxos e lipídeos.⁶ Não há um consenso na literatura quanto à concentração ideal de NaOCl, variando de 0,5% a 5,25% sendo a concentração de 2,5% mais utilizada.⁷ Estudos evidenciam uma superioridade do hipoclorito de alta concentração em relação às soluções de 1 e 2,5%, mas mesmo assim não sendo capaz de eliminar completamente os microrganismos dos canais radiculares^{8,9} principalmente diante da utilização de sistemas de instrumentação de lima única, onde o tempo de permanência e o volume da solução irrigante tendem a ser menores. É importante ressaltar também que o NaOCl em altas concentrações é um potencial irritante dos tecidos periapicais,¹⁰ podendo causar dor pós-operatória e dificultar o reparo apical.

Além disso, a eliminação de bactérias dos túbulos dentinários dificilmente pode ser alcançada pela irrigação com agulha e seringa utilizando solução de hipoclorito de sódio, mesmo em altas concentrações¹¹. Além do NaOCl, o uso de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) é comum na prática do tratamento endodôntico para remoção da camada de tecidos inorgânicos deixada no canal durante o tratamento endodôntico.^{4,12}

A eficácia da terapia endodôntica envolvendo dentes infectados depende diretamente da máxima redução da quantidade de bactérias e de seus subprodutos dentro dos canais radiculares.^{13,14} A permanência de microrganismos e seus fatores de virulência no interior dos canais radiculares podem contribuir para o surgimento ou persistência da periodontite apical.^{3,15} Estudos mostram a prevalência de *Enterococcus faecalis* encontradas no canal radicular após tratamento endodôntico.^{16,17} *E. faecalis* é uma bactéria Gram-positiva que

possui diferentes mecanismos de virulência e podem resistir à terapia endodôntica e aos antibióticos sistêmicos, mesmo em condições de estresse.^{18,19} Assim, a busca por protocolos de irrigação do canal radicular com alta atividade antibacteriana e menor potencial para induzir efeitos colaterais adversos é desejável.

Desde de 1950, já se conhecia a capacidade do CO₂ de inativar microrganismos, mas somente nos últimos 15 anos ela recebeu atenção especial e aplicações práticas vem sendo estudadas. Spilimbergo e Bertucco²⁰ quantificaram em seu estudo, os efeitos biocidas do dióxido de carbono em alta pressão em várias espécies de bactérias. Alguns estudos mostraram a efetividade do dióxido de carbono sob pressão na inativação de microrganismos presentes em alimentos.^{21,22,23} As teorias que explicam o mecanismo de ação do CO₂ pressurizado, enfatizam a ruptura celular explosiva e a taxa de transferência de massa, em que a compressão intensifica a transferência de massa do dióxido de carbono através das membranas celulares e a decompressão aumenta a ruptura das células.^{24,25} Dentre as vantagens na utilização do CO₂ como esterilizante, podemos ressaltar que ele não é inflamável, não é tóxico e tem baixo custo, além de possuir baixa viscosidade e tensão superficial nula, de modo que possa penetrar rapidamente em estruturas complexas e materiais porosos.²⁶

Diante disso, levanta-se aqui um questionamento se a gaseificação do hipoclorito de sódio poderia levar a uma agitação natural da solução, aumentando sua atividade antimicrobiana, proporcionando bons resultados com baixo custo. Dang et al²⁷ estudou o efeito do dióxido de carbono pressurizado (PCD) e hipoclorito de sódio (NaOCl) na inativação de *Enterococcus* sp. em água do mar artificial, observando que o tratamento combinado de PCD / cloro resultou em uma maior desinfecção comparado com os dois tratamentos individuais. Esses achados sugerem que o tratamento combinado de PCD / cloro tem benefícios sinérgicos e fornece um método promissor para a desinfecção da água de mar. No entanto, não existem estudos com relação à atividade antimicrobiana dessa associação na desinfecção de canais radiculares.

2 OBJETIVOS

O objetivo do presente estudo consistiu em avaliar, *in vitro*, a influência da associação do dióxido de carbono ao hipoclorito de sódio na inativação do biofilme de *E. faecalis* presente nos canais radiculares.

A hipótese nula testada foi: a associação do dióxido de carbono ao hipoclorito de sódio não terá maior eficácia em relação aos demais protocolos de irrigação avaliados.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Seleção e preparo das amostras

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP (CAAE: 34692620.8.0000.5420). A pesquisa foi realizada com 40 pré-molares inferiores humanos extraídos, por motivo de doença periodontal ou para fins ortodônticos. Os dentes continham um único canal, raízes retas e completamente formadas, e não tinham tratamento endodôntico prévio. Todos os dentes foram armazenados em uma solução à 0,5% de NaOCI durante uma hora para desinfecção de superfícies. A presença de um único canal foi confirmada radiograficamente, para isso foram realizadas tomadas radiográficas periapicais em sentido vestibulo-lingual e mésio-distal.

A superfície externa de todos os dentes foi limpa com curetas periodontais. As coroas dentárias foram seccionadas com um disco de diamante, resfriado com água, montado em cortadeira de precisão Isomet 1000, para que todas as raízes fossem padronizadas no comprimento de trabalho de 16 mm.

Todos os dentes foram instrumentados com uma lima rotatória até 40.04 (MKlife, Brasil) sob irrigação contínua com 10 ml de água destilada. Para remoção da *smear layer* foi utilizado EDTA a 17% por 3 minutos, seguido de irrigação abundante com 5 ml de água destilada. A irrigação foi realizada usando uma agulha NaviTip (Ultradent, South Jordan, UT, EUA). Os dentes foram imersos em caldo de infusão de cérebro-coração (BHI, Difco, Kansas City, MO, EUA) e ativados em cuba ultrassônica por 1 minuto, para liberar o ar retido e permitir a penetração do meio de cultura nas irregularidades do canal radicular. Em seguida, os dentes foram esterilizados em autoclave por 30 minutos a 121°C.

3.1.1 Contaminação das amostras com *Enterococcus faecalis*

O protocolo de contaminação das amostras foi baseado na metodologia modificada de Carvalho MC et al, 2019. Culturas puras de *E. faecalis* (ATCC 29212) foram previamente cultivadas em caldo BHI 37 °C por 24hs. A cultura bacteriana foi transferida para outro tubo contendo BHI estéril e incubado por outras 24 horas para alcançar um crescimento exponencial. Essa cultura foi ajustada ao padrão McFarland #1 (3×10^8 UFC / ml) por meio de um espectrofotômetro (Bel Photonics do Brasil Ltda, Osasco, Brasil) (densidade óptica: 600: 0.08-0.13). Primeiramente, foram inseridos 800 µl de BHI esterilizado em cada Tubo Eppendorf (Axygen Scientific, Union City, EUA) contendo a amostra. A ativação foi realizada em banho

ultrassônico por 15 minutos para permitir penetração máxima do meio de cultura nos túbulos dentinários antes da contaminação bacteriana. A contaminação usando o inóculo padronizado foi realizada durante 10 dias, com centrifugação em dias alternados para permitir a penetração bacteriana no sistema de canais radiculares.

Após o ajuste da cultura do *E. faecalis*, foram incubadas novamente a 37 ° C por 7 horas para atingir um crescimento exponencial. O inóculo (800 µl) foi inserido nos tubos Eppendorf com as amostras e centrifugadas (Eppendorf Centrífuga 5417R, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) em sequência a 1.400, 2.000, 3.600 e 5.600 rpm em dois ciclos de cinco minutos para cada velocidade. O inóculo foi renovado a cada ciclo de centrifugação. Após oito ciclos de centrifugação, o caldo BHI esterilizado foi inserido nos tubos Eppendorf, agitado em Vórtex (Vortex-mix, Edison, EUA) e incubado a 37 ° C por 24 horas (este protocolo foi repetido nos dias 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19). Após a incubação (dia 2), as amostras foram novamente agitadas em vórtex por 10 segundos e o inóculo dos tubos Eppendorf foi descartado. Um mililitro de caldo BHI esterilizado foi inserido, seguido de ciclo de centrifugação de 3.600 rpm por 5 minutos a 25 ° C. E os tubos Eppendorf foram incubados novamente em 37 ° C por 24 horas (este protocolo foi repetido nos dias 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 e 20). No dia 21, as amostras foram removidas dos tubos Eppendorf, os excessos do meio de cultura foram removidos e as superfícies radiculares externas das raízes limpas com gaze estéril.

3.1.2 Coletas das amostras e cultura microbiológica

Após o período de cultivo bacteriano, todos os canais radiculares foram coletados para confirmar a contaminação (S1). Três cones de papel absorvente estéril foram utilizados por amostra. Cada cone foi mantido por 1 minuto no canal radicular (figura 1) e transferido para tubos Eppendorf contendo 1 ml de solução de ringer. Para a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC), cada tubo foi agitado em vórtex por 60s e, em seguida, foram realizadas diluições até 10⁻⁴ em tubos com solução de Ringer. 20 µl de cada diluição foram plaqueados em BHI ágar e incubados por 48 horas a 37°C para serem submetidos a contagem bacteriana. O crescimento bacteriano foi identificado pela contagem do número de unidade formadora de colônias (UFC / ml) de *E. faecalis*. Os tubos contendo as diluições em série foram mantidos na incubadora a 37 ° C por 7 dias para confirmar o crescimento microbiano.

Figura 1 – Cone de papel absorvente mantido por 1 minuto em cada canal radicular



Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

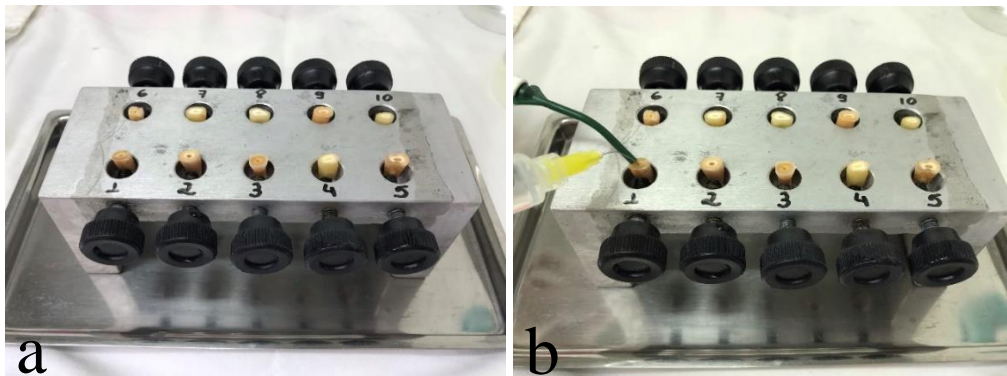
3.1.3 Divisão dos grupos

Após a contaminação, as amostras foram montadas em um aparelho de alumínio esterilizado (Figura 2a) e em seguida foram divididas aleatoriamente em 4 grupos, de acordo com o protocolo de irrigação utilizada como segue:

- **Grupo 1: NaOCl 2,5%**
- **Grupo 2: NaOCl 2,5% + CO₂**
- **Grupo 3: solução salina estéril**
- **Grupo 4: solução salina estéril + CO₂**

Todos os procedimentos de irrigação foram realizados com agulhas 30-G Navitip (Ultradent Products Inc, South Jordan, UT) sempre colocadas 1 mm aquém do comprimento de trabalho (Figura 2b), com aspiração simultânea.

Figura 2: (a) as raízes de cada grupo foram montadas em aparelho de alumínio esterilizado; (b) e foram irrigadas com o respectivo protocolo de irrigação.



Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

A adição do CO₂ nos grupos onde há a associação do gás, foi realizada através da máquina para gaseificar água jet (Sodastream Industries LTD, Kfar Saba, Israel) (figura 3). Um cilindro de gás (CO₂) foi rosqueado na parte de trás da máquina, em seguida, uma garrafa própria do equipamento, foi completada até a marca existente (800 ml) com a solução desejada e acoplada na máquina. O botão, localizado na parte superior, para fazer a adição do gás, foi acionado 10 vezes para padronização do volume de CO₂ nas soluções.

Figura 3 - Máquina para Gaseificar Água Jet SodaStream



Fonte: Site sodastream.com (2022)

Grupo 1: NaOCl 2,5% - o canal foi irrigado e agitado manualmente com lima tipo k 15 com 20 ml de NaOCl à 2,5%, EDTA 17% e 5 ml de NaOCl a 2,5%, cada um por 20 segundos, seguido de irrigação 1 ml de tiosulfato de sódio a 10% por 1 minuto para inativação do NaOCl. Então, uma amostra bacteriológica S2 foi coletada conforme descrito anteriormente. O volume total de irrigação com NaOCl a 2,5% foi de 25 ml.

Grupo 2: NaOCl 2,5% + CO₂ - os procedimentos de irrigação foram essencialmente os mesmos descritos para no grupo NaOCl 2,5%, exceto que a solução irrigadora utilizada foi o hipoclorito de sódio associado ao dióxido de carbono.

Grupo 3: Solução salina estéril - os procedimentos de irrigação foram essencialmente os mesmos descritos para o grupo NaOCl 2,5%, exceto que a solução irrigadora utilizada foi a solução salina estéril.

Grupo 4: Solução salina estéril + CO₂ - os procedimentos de irrigação foram essencialmente os mesmos descritos para o grupo NaOCl 2,5%, exceto que a solução irrigadora

utilizada foi a solução salina estéril associada ao dióxido de carbono.

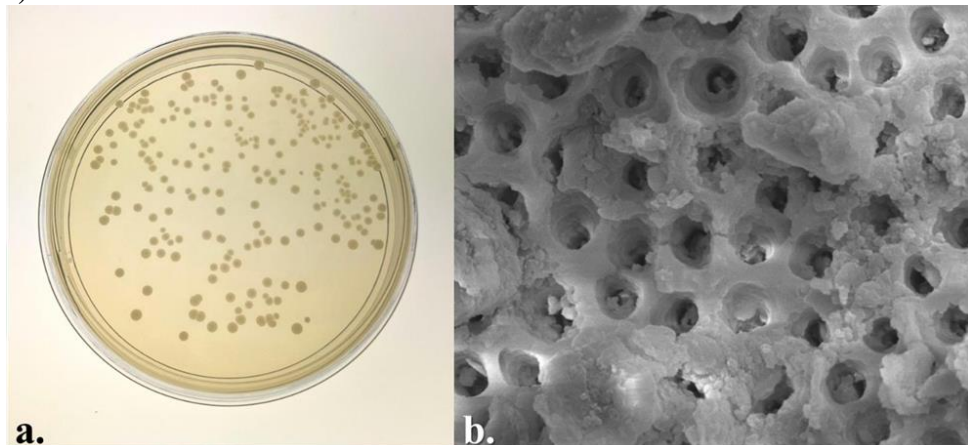
3.2 Forma de análise dos resultados

Após o período de incubação, foi realizada a contagem do número de unidades formadoras de colônias nas placas comparando a coleta inicial (S1) com a coleta final (S2). Os dados foram analisados no Sigma Plot 12.0 (Systat Software Inc., San Jose, USA). Para análise estatística os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade e variância. Foi realizado o teste Student-Newman-Keuls Post-Hoc a um nível de significância de 5%.

3.3 Estudo piloto

Foram utilizadas 10 amostras para realização do estudo piloto da contaminação por *E. faecalis*. Após o protocolo de contaminação, com duração de 10 dias, onde seguiu-se a troca de BHI caldo todos os dias, sendo a amostra agitada em vortéx e centrífuga em dias alternados. Com isso, confirmou-se o crescimento bacteriano em todas as placas de petri após a contaminação e após o período de crescimento de 48h na estufa a 37 °C (Figura 4a). Para confirmar a penetração no interior dos túbulos dentinários, as amostras foram analisadas através de microscopia eletrônica de varredura (Figura 4b).

Figura 4- Confirmação do crescimento bacteriano. a. Crescimento bacteriano inicial (Unidade formadora de colônia). b. Contaminação no interior dos túbulos (Microscopia eletrônica de varredura).



Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

4 RESULTADOS

A Tabela 1 mostra as contagens de *E. faecalis* entre os grupos antes e após os protocolos de irrigação, como porcentagem de redução bacteriana. Bactérias cultiváveis estavam presentes em todas as amostras S1 (40/40). Todos os protocolos de irrigação foram eficazes na redução da carga bacteriana ($p < 0,05$).

A irrigação com NaOCl 2,5% como solução de irrigação foi mais eficaz que a solução salina estéril ($p = 0,001$). Todos os grupos foram significativamente diferentes entre si, exceto quando comparados os grupos 3 e 4. A associação com CO₂ melhora a eficácia da descontaminação do canal radicular quando associado ao NaOCl 2,5%. O Grupo 1 apresentou diferença significativa quando comparado ao Grupo 2. No entanto, a incorporação de CO₂ em solução salina estéril não aumentou a descontaminação das amostras ($p > 0,05$).

Tabela 1. Mediana (25%, valores de quartis de 75%) de UFC/ml antes e após protocolo de irrigação com NaOCl 2,5% e soro fisiológico com ou sem adição de CO₂ e porcentagem de redução de UFC.

Protocolo de irrigação	Antes PI	Depois PI	Redução UFC (%)
NaOCl 2.5%	6.5 ^{Aa}	1.2 ^{Ba}	99.99 ^a
	(0.5)	(1.2)	
NaOCl 2.5% + CO₂	6.3 ^{Aa}	0.4 ^{Bb}	100 ^a
	(0.4)	(0.7)	
Solução salina estéril	6.7 ^{Aa}	5.0 ^{Bc}	98.01 ^b
	(0.4)	(0.2)	
Solução salina estéril	6.9 ^{Aa}	4.9 ^{Bc}	99.20 ^b
+ CO₂	(0.3)	(0.2)	

Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

Médias seguidas de letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas. As letras maiúsculas horizontais mostram a comparação dentro do mesmo grupo antes e depois da irrigação. As letras minúsculas verticais mostram a comparação dentro dos diferentes grupos usando diferentes protocolos de irrigação ao mesmo tempo. Para % de

redução de UFC, diferentes letras minúsculas verticais indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$).

5 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo revelaram que todos os protocolos de irrigação foram eficazes na redução da carga bacteriana no interior dos canais radiculares e túbulos dentinários. Isso significa que a ação de lavagem das soluções tem um papel importante na diminuição da quantidade de detritos e subprodutos bacterianos.^{28,29} No entanto, o NaOCl 2,5% proporciona uma redução significativa na carga bacteriana em relação à solução salina, confirmando a importância do uso de irrigantes com propriedades antibacterianas.

O dióxido de carbono é um gás não tóxico, não inflamável e barato. O dióxido de carbono pressurizado (PCD) tem sido usado como técnica de esterilização na preservação de alimentos, indústria de tratamento de água e pode ser potencialmente útil em muitas outras aplicações.^{23,27,30} Muitos estudos têm investigado os efeitos da PCD em organismos patogênicos, células vegetativas e esporos, leveduras e bolores, mostrando grande potencial para inibir diversas espécies patogênicas.^{20,22,23} O mecanismo exato de inativação microbiana por PCD não é claro. Pode estar relacionado à sua capacidade de inibir a atividade enzimática, causando danos às membranas celulares e ao DNA.³¹

Neste estudo, o PCD associado ao NaOCl foi mais eficaz na eliminação de *E. faecalis* dentro dos canais radiculares quando comparado com aqueles sem associação com NaOCl e solução salina estéril. Dang et al., 2016 realizaram um estudo comparando o efeito de tratamentos combinados com PCD e NaOCl na inativação de *Enterococcus spp.* em água do mar artificial e observou que houve maior desinfecção com o aumento da pressão e da taxa de liberação de CO₂.

Muitos estudos na literatura utilizaram modelos *ex vivo* e contaminação por *E. faecalis* para avaliar a eficácia de diferentes protocolos de desinfecção do canal radicular. No presente estudo, a presença de bactérias cultiváveis foi revelada em 100% das amostras iniciais (S1), validando o protocolo de contaminação. *E. faecalis* é um coco gram-positivo anaeróbio facultativo presente na flora oral. É a espécie bacteriana mais prevalente em dentes com periodontite apical persistente, estando associada ao insucesso do tratamento.^{32,33} *E. faecalis* consegue sobreviver isolado nos canais radiculares, tem alta capacidade de formar biofilme, aderindo à dentina e tem capacidade de invadir os túbulos dentinários, o que o torna resistente ao tratamento endodôntico.^{34,35}

A técnica de cultura microbiológica que foi utilizada nesse estudo para avaliar a eficácia dos irrigantes, é o método de avaliação mais utilizado nos estudos (87%).³⁶ A

amostragem de biofilme foi realizada por meio de coleta com pontas de papel esterilizadas, que apesar das limitações, como coletar apenas bactérias cultiváveis presentes no interior dos canais radiculares, é um protocolo bem estabelecido.^{29,37,38}

A principal causa do insucesso do tratamento endodôntico é a permanência de microrganismos no espaço do canal radicular após o tratamento³⁹. A complexidade anatômica dos sistemas de canais radiculares como istmo, canais laterais, ramos apicais são desafios para a desinfecção radicular⁴⁰. Assim, é desejável que durante a irrigação, as substâncias químicas utilizadas durante o procedimento sejam capazes de atingir essas áreas de difícil acesso. É importante ressaltar que os irrigantes endodônticos não possuem uma boa profundidade de penetração.⁴¹

Assim, novos protocolos de irrigação vêm sendo estudados com o objetivo de melhorar a atividade antibacteriana e aumentar a penetração do líquido irrigante em seus ramos, como a Irrigação Ultrassônica Passiva (PUI),^{42,43} que utiliza pontas ultrassônicas para agitar soluções diretamente no espaço do canal. Estudos sobre o efeito antibacteriano da PUI mostram resultados significativamente melhores do que a irrigação com seringa, mas não há eliminação completa de bactérias e endotoxinas dos canais radiculares e túbulos dentinários.^{2,44,45}

Até onde sabemos, este é o primeiro estudo a investigar a eficácia da associação de CO₂ pressurizado com NaOCl na inativação do biofilme de *E. faecalis* no interior de canais radiculares por meio de cultura microbiológica na redução bacteriana nos canais radiculares.

O presente estudo demonstrou que, embora a carga bacteriana tenha diminuído, nenhuma técnica de irrigação testada foi capaz de eliminar completamente as bactérias dentro dos canais radiculares. Apesar da busca constante por um protocolo de desinfecção que elimine totalmente as bactérias, a grande variação anatômica e sua complexidade impossibilitam isso. Nossos resultados sugerem que o protocolo de irrigação associando CO₂ com 2,5% de NaOCl é mais eficaz na eliminação de *E. faecalis*. No entanto, análises adicionais avaliando a parte química e citotóxica dessa associação seriam necessárias para uso clínico.

6 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que todos os protocolos de irrigação utilizados foram eficazes na redução dos níveis bacterianos nos canais radiculares. A associação de CO₂ pressurizado com NaOCl 2,5% foi mais eficaz do que NaOCl 2,5% e solução salina na inativação do biofilme de *E. faecalis* no interior dos canais radiculares.

REFERÊNCIAS

- 1- Haapasalo M, Shen Y, Wang Z, Gao Y. Irrigation in endodontics. *Br Dent J.* 2014;216(6):299-303. doi: 10.1038/sj.bdj.2014.204. PMID: 24651335.
- 2- Orozco EIF, Toia CC, Cavalli D, Khoury RD, Cardoso FGDR, Bresciani E, Valera MC. Effect of passive ultrasonic activation on microorganisms in primary root canal infection: a randomized clinical trial. *J Appl Oral Sci.* 2019 28;28:e20190100. doi: 10.1590/1678-7757-2019-0100.
- 3- De Almeida A P, Souza M A, Miyagaki D C, Bello Y D, Cecchin D & Farina, A P. Comparative Evaluation of Calcium Hypochlorite and Sodium Hypochlorite Associated with Passive Ultrasonic Irrigation on Antimicrobial Activity of a Root Canal System Infected with *Enterococcus faecalis*: An In Vitro Study. *J Endod.* 2014;40(12), 1953–7. doi:10.1016/j.joen.2014.08.025
- 4- Carvalho AS, Camargo CH, Valera MC, Camargo SE, Mancini MN. Smear layer removal by auxiliary chemical substances in biomechanical preparation: a scanning electron microscope study. *J Endod.* 2008;34(11):1396-400.
- 5- Mohammadi Z. Sodium hypochlorite in endodontics: an update review. *Int Dent J.* 2008;58(6):329-41. doi: 10.1016/j.joen.2008.08.012
- 6- Estrela C, Estrela CR, Barbin EL, Spanó JC, Marchesan MA, Pécora JD. Mechanism of action of sodium hypochlorite. *Braz Dent J.* 2002;13(2):113-7. doi: 10.1590/s0103-64402002000200007
- 7- Ruksakiet K, Hanák L, Farkas N, Hegyi P, Sadaeng W, Czumbel LM, et al. Antimicrobial Efficacy of Chlorhexidine and Sodium Hypochlorite in Root Canal Disinfection: A Systematic Review and Meta-analysis of Randomized Controlled Trials. *J Endod.* 2020;46(8):1032-1041.e7. doi: 10.1016/j.joen.2020.05.002
- 8- Ma J, Wang Z, Shen Y, Haapasalo M. A new noninvasive model to study the effectiveness of dentin disinfection by using confocal laser scanning microscopy. *J Endod* 2011; 37: 1380–1385. doi: 10.1016/j.joen.2011.06.018
- 9- Wang Z, Shen Y, Haapasalo M. Effectiveness of endodontic disinfecting solutions against young and old *Enterococcus faecalis* biofilms in dentin canals. *J Endod* 2012; 38: 1376–1379. doi: 10.1016/j.joen.2012.06.035
- 10- Zehnder M, Kosicki D, Luder H, Sener B, Waltimo T. Tissue dissolving capacity and antibacterial effect of buffered and unbuffered hypochlorite solutions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002;94:756–62. doi: 10.1067/moe.2002.128961
- 11- Wong DT, Cheung GS. Extension of bactericidal effect of sodium hypochlorite into dentinal tubules. *J Endod.* 2014;40:825–9. doi: 10.1016/j.joen.2013.09.045
- 12- Calt S, Serper A. Time-dependent effects of EDTA on dentin structures. *J Endod.* 2002;28(1):17-9. doi: 10.1097/00004770-200201000-00004
- 13- Gomes BP, Lilley JD, Drucker DB. Associations of endodontic symptoms and signs with particular combinations of specific bacteria. *Int Endod J.* 1996 29:69–75. doi: 10.1111 / j.1365-2591.1996.tb01164.x
- 14- Barbosa-Ribeiro M, Arruda-Vasconcelos R, de-Jesus-Soares A, Zaia AA, Ferraz CCR, de Almeida JFA, et al. Effectiveness of calcium hydroxide-based intracanal medication on infectious/inflammatory contents in teeth with post-treatment apical periodontitis. *Clin Oral Investig.* 2019;23(6):2759-66. doi: 10.1007/s00784-018-2719-0

- 15- Siqueira JF Jr, Rôças IN. Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. *J Endod.* 2008;34(11):1291-301.e3. doi: 10.1016/j.joen.2008.07.028
- 16- Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Teixeira FB, Zaia AA, Souza Filho FJ. Evaluation of root canal microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. *Oral Microbiol Immunol* 2003;18:100–3. doi: 10.1034/j.1399-302x.2003.00058.x
- 17- Endo MS, Signoretti FG, Kitayama VS, Marinho ACS, Martinho FC, Gomes BPFA. Culture and molecular detection of from patients with failure endodontic treatment and antimicrobial susceptibility of clinical isolates. *Enterococcus faecalis*. *Braz Dent Sci* 2014;17:83–91
- 18- Figdor D, Davies JK, Sundqvist G. Starvation survival, growth and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum. *Oral Microbiol Immunol* 2003;18:234–9. doi: 10.1034/j.1399-302x.2003.00072.x
- 19- Barbosa-Ribeiro M, De-Jesus-Soares A, Zaia AA, Ferraz CC, Almeida JF, Gomes BP. Antimicrobial Susceptibility and Characterization of Virulence Genes of *Enterococcus faecalis* Isolates from Teeth with Failure of the Endodontic Treatment. *J Endod.* 2016;42(7):1022-8. doi: 10.1016/j.joen.2016.03.015
- 20- Spilimbergo S, Bertucco A. Non-thermal bacterial inactivation with dense CO₂. *Biotechnol Bioeng.* 2003;84(6):627-38. doi: 10.1002/bit.10783
- 21- Daniels JA, Krishnamurthi R, Rizvi SSH. A Review of Effects of Carbon Dioxide on Microbial Growth and Food Quality. *J Food Prot.* 1985;48(6):532-7. doi: 10.4315/0362-028X-48.6.532
- 22- Erkmén O. Antimicrobial effect of pressurised carbon dioxide on *Enterococcus faecalis* in physiological saline and foods. *J Sci Food Agric.* 2000;80(4):465-70.
- 23- Damar S, Balaban MO. Review of dense phase CO₂ technology: microbial and enzyme inactivation, and effects on food quality. *Journal of Food Science.* 2006;71(1):R1-R11. doi.org/10.1111/j.1365-2621.2006.tb12397
- 24- Hong SI, Park W, Pyun YR. Inactivation of *Lactobacillus* spp. From Kimchi by High Pressure Carbon Dioxide, LWT. *Food Science and Technology.* 1997;30(7):681-5. doi.org/10.1006/fstl.1997.0250
- 25- Dillow AK, Dehghani F, Hrkach JS, Foster NR, Langer R. Bacterial inactivation by using near and supercritical carbon dioxide. *Proc Natl Acad Sci.* 1999; 96 (18):10344-8. doi: 10.1073/pnas.96.18.10344
- 26- Zhang J, Davis TA, Matthews MA, Drews MJ, LaBerge M, An YH. Sterilization using high-pressure carbon dioxide. *J Supercrit Fluids.* 2006;38(3):354-72. doi.org/10.1016/j.supflu.2005.05.005
- 27- Dang TT, Imai T, Le TV, Nguyen DK, Higuchi T, Kanno A, Yamamoto K, Sekine M. Synergistic effect of pressurized carbon dioxide and sodium hypochlorite on the inactivation of *Enterococcus* sp. in seawater. *Water Res.* 2016;1;106:204-213. doi: 10.1016/j.watres.2016.10.003
- 28- Dametto FR, Ferraz CC, Gomes BP, 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 Jun;99(6):768-72. doi: 10.1016/j.tripleo.2004.08.026

- 29- Berber VB, Gomes BP, Sena NT, Vianna ME, Ferraz CC, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Efficacy of various concentrations of NaOCl and instrumentation techniques in reducing *Enterococcus faecalis* within root canals and dentinal tubules. *Int Endod J*. 2006 Jan;39(1):10-7. doi: 10.1111/j.1365-2591.2005.01038.x
- 30- Garcia-Gonzalez, Linsey, et al. High Pressure Carbon Dioxide Inactivation of Microorganisms in Foods: The Past, the Present and the Future. *International journal of food microbiology*, vol. 117, no. 1, 2007, pp. 1–28
- 31- Fukuzaki S. Mechanisms of actions of sodium hypochlorite in cleaning and disinfection processes. *Biocontrol Sci*. 2006 Dec;11(4):147-57. doi: 10.4265/bio.11.147
- 32- Distel JW, Hatton JF, Gillespie MJ. Biofilm formation in medicated root canals. *J Endod*. 2002 Oct;28(10):689-93. doi: 10.1097/00004770-200210000-00003
- 33- Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1998 Jan;85(1):86-93. doi: 10.1016/s1079-2104(98)90404-8
- 34- Asnaashari M, Mojahedi SM, Asadi Z, Azari-Marhabi S, Maleki A. A comparison of the antibacterial activity of the two methods of photodynamic therapy (using diode laser 810 nm and LED lamp 630 nm) against *Enterococcus faecalis* in extracted human anterior teeth. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2016 Mar;13:233-237. doi: 10.1016/j.pdpdt.2015.07.171
- 35- Chivatxaranukul P, Dashper SG, Messer HH. Dentinal tubule invasion and adherence by *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J*. 2008 Oct;41(10):873-82. doi: 10.1111/j.1365-2591.2008.01445.x
- 36- Swimberghe RCD, Coenye T, De Moor RJG, Meire MA. Biofilm model systems for root canal disinfection: a literature review. *Int Endod J*. 2019 May;52(5):604-628. doi: 10.1111/iej.13050
- 37- Carvalho MC, Zuolo ML, Arruda-Vasconcelos R, Marinho ACS, Louzada LM, Francisco PA, Pecorari VGA, Gomes BPPA. Effectiveness of XP-Endo Finisher in the reduction of bacterial load in oval-shaped root canals. *Braz Oral Res*. 2019;33:e021. doi: 10.1590/1807-3107bor-2019.vol33.0021
- 38- Jacinto RC, Montagner F, Signoretti FG, Almeida GC, Gomes BP. Frequency, microbial interactions, and antimicrobial susceptibility of *Fusobacterium nucleatum* and *Fusobacterium necrophorum* isolated from primary endodontic infections. *J Endod*. 2008 12:1451-6. doi: 10.1016/j.joen.2008.08.036
- 39- Ricucci D, Bergenholtz G. Bacterial status in root-filled teeth exposed to the oral environment by loss of restoration and fracture or caries--a histobacteriological study of treated cases. *Int Endod J*. 2003 Nov;36(11):787-802. doi: 10.1046/j.1365-2591.2003.00721.x
- 40- Marinho AC, Polay AR, Gomes BP. Accuracy of Turbidimetric *Limulus Amebocyte Lysate* Assay for the Recovery of Endotoxin Interacted with Commonly Used Antimicrobial Agents of Endodontic Therapy. *J Endod*. 2015 Oct;41(10):1653-9. doi: 10.1016/j.joen.2015.05.020
- 41- Paqué F, Peters OA. Micro-computed tomography evaluation of the preparation of long oval root canals in mandibular molars with the self-adjusting file. *J Endod*. 2011 Apr;37(4):517-21. doi: 10.1016/j.joen.2010.12.011
- 42- Gu LS, Kim JR, Ling J, Choi KK, Pashley DH, Tay FR. Review of contemporary irrigant

- agitation techniques and devices. *J Endod.* 2009 Jun;35(6):791-804. doi: 10.1016/j.joen.2009.03.010
- 43- Gulabivala K, Ng YL, Gilbertson M, Eames I. The fluid mechanics of root canal irrigation. *Physiol Meas.* 2010 Dec;31(12):R49-84. doi: 10.1088/0967-3334/31/12/R01
- 44- Ballal NV, Gandhi P, Shenoy PA, Dummer PMH. Evaluation of various irrigation activation systems to eliminate bacteria from the root canal system: A randomized controlled single blinded trial. *J Dent.* 2020 Aug;99:103412. doi: 10.1016/j.jdent.2020.103412
- 45- Weber CD, McClanahan SB, Miller GA, Diener-West M, Johnson JD. The effect of passive ultrasonic activation of 2% chlorhexidine or 5.25% sodium hypochlorite irrigant on residual antimicrobial activity in root canals. *J Endod.* 2003 Sep;29(9):562-4. doi: 10.1097/00004770-200309000-00005

ANEXO A – Comitê de Ética

UNESP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA-CAMPUS DE
ARAÇATUBA/ UNIVERSIDADE
ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO
DE MESQUITA FILHO"



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação do efeito sinérgico do dióxido de carbono pressurizado e hipoclorito de sódio comparado aos diferentes protocolos de irrigação dos canais radiculares na inativação do biofilme de *Enterococcus faecalis*.

Pesquisador: Rogério de Castilho Jacinto

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 34692620.8.0000.5420

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba - UNESP

Patrocinador Principal: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho
FUND COORD DE APERFEICOAMENTO DE PESSOAL DE NIVEL SUP

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.294.444

Apresentação do Projeto:

O objetivo desse trabalho será avaliar a eficácia da associação do dióxido de carbono(CO₂) pressurizado às diferentes concentrações do hipoclorito de sódio (NaOCl) comparado aos diferentes protocolos de irrigação dos canais radiculares na inativação do biofilme de *Enterococcus faecalis* presentes nos túbulos dentinários através de cultura microbiológica. Para isso, 150 pré-molares inferiores humanos extraídos serão contaminados com *E. faecalis* por um período de 10 dias. Serão criados 15 grupos de acordo com o protocolo de irrigação: Grupo 1- irrigação convencional com hipoclorito de sódio 1% (NaOCl); Grupo 2- irrigação convencional com NaOCl; 2,5% Grupo 3- irrigação convencional com NaOCl 5,25% ; Grupo 4- Irrigação Ultrassônica Passiva(IUP)) NaOCl 1% ;Grupo 5- IUP com NaOCl 2,5% ;Grupo 6- IUP com NaOCl 5,25%;Grupo 7- irrigação convencional com NaOCl 1% associado ao dióxido de carbono(CO₂); Grupo 8- irrigação convencional com NaOCl 2,5% () associado ao CO₂; Grupo 9- irrigação convencional com NaOCl 5,25% associado ao CO₂; Grupo 10- IUP com NaOCl 1% associado ao CO₂;

Endereço: JOSE BONIFACIO 1193

Bairro: VILA MENDONCA

CEP: 16.015-050

UF: SP

Município: ARACATUBA

Telefone: (18)3636-3200

Fax: (18)3636-3332

E-mail: andrebertoz@foa.unesp.br

UNESP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA-CAMPUS DE
ARAÇATUBA/ UNIVERSIDADE
ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO
DE MESQUITA FILHO"



Continuação do Parecer: 4.294.444

Grupo 11- IUP com NaOCl 2,5% () associado ao CO₂; Grupo 12- IUP com hipoclorito de sódio NaOCl 5,25% () associado ao CO₂; Grupo 13- controle negativo- solução salina estéril associada ao CO₂; Grupo 14- controle negativo- IUP com solução salina estéril; Grupo 15- controle negativo- IUP com solução salina estéril associada ao CO₂; a análise das amostras será feita através da contagem do número de unidades formadoras de colônias nas placas comparando a coleta inicial (S1) com a coleta do canal após a irrigação (S2) e coleta dos túbulos dentinários após a irrigação nos 3 terços da raiz (S3). Para análise estatística, os dados obtidos serão submetidos ao teste de normalidade, será aplicado o teste Two-way ANOVA de medidas repetidas, a um nível de significância de 5%. Os dados serão analisados no programa Sigma Plot 12.0 (Systat Software Inc., San Jose, USA).

Objetivo da Pesquisa:

Hipótese:

A hipótese nula do estudo é a de que a associação do dióxido de carbono às diferentes concentrações de hipoclorito de sódio não terá maior eficácia em relação aos demais protocolos de irrigação avaliados.

Objetivo Primário:

Com base no exposto, o objetivo deste estudo será avaliar, in vitro, a influenciada associação do dióxido de carbono pressurizado às diferentes concentrações de hipoclorito de sódio comparado aos diferentes protocolos de irrigação dos canais radiculares na inativação do biofilme de *Enterococcus faecalis* presentes nos túbulos dentinários.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Risco mínimo.

Benefícios:

Ao participar deste trabalho o paciente não terá benefícios diretos. Entretanto, esperamos que este estudo resulte em informações importantes sobre a associação do dióxido de carbono pressurizado às diferentes concentrações de hipoclorito de sódio e protocolos de irrigação no tratamento

Endereço: JOSE BONIFACIO 1193
Bairro: VILA MENDONCA **CEP:** 16.015-050
UF: SP **Município:** ARACATUBA
Telefone: (18)3636-3200 **Fax:** (18)3636-3332 **E-mail:** andrebertoz@foa.unesp.br

UNESP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA-CAMPUS DE
ARAÇATUBA/ UNIVERSIDADE
ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO
DE MESQUITA FILHO"



Continuação do Parecer: 4.294.444

endodôntico.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto científico dentro das normas da CONEP.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos obrigatórios foram apresentados.

Recomendações:

NÃO HÁ.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

recomenda-se a aprovação do projeto.

Considerações Finais a critério do CEP:

Não havendo pendências, o CEP propõe a aprovação do projeto de pesquisa salientando que, de acordo com a Resolução 466 CNS de 12/12/2012 (título X, seção X.1., art. 3, item b, e, título XI, seção XI.2., item d), há necessidade de apresentação de relatórios semestrais, devendo o primeiro relatório ser enviado até 15/03/2021. O CEP reitera a necessidade de entrega de uma via (não cópia) do TCLE ao sujeito participante da pesquisa e solicita ao pesquisador responsável leitura da carta circular 003/2011 CONEP/CNS antes do início do projeto.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1582684.pdf	20/07/2020 12:35:27		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Julia.docx	20/07/2020 12:35:08	CAROLINE LOUREIRO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Julia.docx	20/07/2020 12:31:43	CAROLINE LOUREIRO	Aceito
Cronograma	Cronogramadioxidodecarbono.docx	03/07/2020 12:04:20	Júlia Guerra De Andrade	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_Julia.pdf	03/07/2020 11:44:20	CAROLINE LOUREIRO	Aceito

Endereço: JOSE BONIFACIO 1193
Bairro: VILA MENDONCA **CEP:** 16.015-050
UF: SP **Município:** ARACATUBA
Telefone: (18)3636-3200 **Fax:** (18)3636-3332 **E-mail:** andrebertoz@foa.unesp.br