



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araçatuba
Faculdade de Odontologia



JÚLIA GUERRA DE ANDRADE

**Avaliação do efeito sinérgico da associação do hipoclorito
de sódio com dióxido de carbono contra o biofilme de
*Enterococcus faecalis***

Araçatuba
2022



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araçatuba
Faculdade de Odontologia



JÚLIA GUERRA DE ANDRADE

**Avaliação do efeito sinérgico da associação do hipoclorito
de sódio com dióxido de carbono contra obiofilme de
*Enterococcus faecalis***

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Araçatuba, para obtenção de título de Mestre em Ciência Odontológica - Área de Concentração: Endodontia.

Orientador: Prof. Assoc. Rogério de Castilho Jacinto

Araçatuba
2022

Catálogo na Publicação (CIP)
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

A553a Andrade, Júlia Guerra de.
Avaliação do efeito sinérgico da pressurização do hipoclorito de sódio com dióxido de carbono contra o biofilme de *Enterococcus faecalis* / Júlia Guerra de Andrade. - Araçatuba, 2022
32 f. : il. ; tab.

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

1. Irrigantes do canal radicular 2. Hipoclorito de sódio
3. Dióxido de carbono 4. Bactérias 5. Biofilmes I. T.
Black D24
CDD 617.67

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

DADOS CURRICULARES

Júlia Guerra de Andrade

Nascimento	27.07.1993 – Itabira- MG
Filiação	Léa Lúcia Guerra de Andrade Marcos Martins de Andrade
2002-2006	Curso de Graduação em Odontologia pela Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais- PUC/MG
2008-2010	Curso de Especialização em Endodontia pela Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo – USP/SP
2007-2019	Curso de MBA Gestão Empresarial com Ênfase em Finanças pela Faculdade de Ciências Administrativas e contábeis de Itabira – FUNCESI/MG
2020-2022	Desenvolvimento do projeto de Mestrado em Ciências Odontológicas Área de Endodontia Faculdade de Odontologia de Araçatuba- UNESP
Associações	CROMG – Conselho Regional de Odontologia de Minas Gerais. CROSP - Conselho Regional de Odontologia de São Paulo. SBPqO - Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica

*Dedico este
trabalho,*

À minha filha, Teresa, que tem o olhar tão puro e um sorriso inocente que me servem de guia para querer ser sempre o melhor de mim. Obrigada por suportar minha ausência em tantos momentos que Deus permita que eu seja exemplo pra você!

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, agradeço por ser tão presente em minha vida, por trilhar meu caminho e entregar meu destino nas mãos de pessoas tão especiais.... **Meus pais Marcos e Léa**, obrigada por me fazerem ser tanto! Em cada parte minha, cada conquista e cada reconhecimento, vocês estavam por trás. Na minha ausência, foram a presença que a Teresa precisava... vocês são meus melhores ouvidos, meu mais sólido chão. Graças a vocês estou concretizando este sonho! Obrigada, à **minha filha**, por me escolher sua mãe. Por me fazer querer ser melhor a cada dia....tenho certeza que a felicidade estará sempre com você!

Agradeço ao meu querido **irmão Hugo**, minha **cunhada Carol** e meu **afilhado Thiago**, sempre presentes na minha vida! Que sorte eu tenho em poder contar com vocês.... Sofremos e brindamos juntos! Sempre! Agradeço também, à toda minha família, em especial, à **tia Dô**, que sempre acreditou em mim, que sabe falar a palavra certa na hora certa e que me dá forças para seguir em frente!

Ao **Rafael**, por se tornar tão importante na minha vida. Obrigada por estar ao meu lado em todos os momentos!

À **Rosane**, que sonhou junto comigo toda essa conquista, e à **Pati**, que se aventurou nas estradas Minas/São Paulo para que tudo isso fosse possível! Leio todos os dias a mensagem que você me enviou!

Ao meu **orientador, prof. Dr. Rogério**, por ter acreditado e me ajudado a realizar um sonho, que faz parte do meu projeto de vida. Ter você como meu orientador foi um privilégio que a vida me ofertou. Quanta paciência em me conduzir até aqui! Meu sincero agradecimento pela orientação valiosa, confiança e amizade.

À **Carol Loureiro**, por ter sido meu anjo guia durante todo esse tempo! Minha gratidão por cada vez que você me amparou, por todo tempo que você se dedicou em me ajudar. Sobra grandeza em seu coração! Admiro sua capacidade de descomplicar o complicado!

Aos **amigos da Pós-Graduação**, Ana Paula Fernandes, Pedro Chaves, Nathalia Machado, Henrique Banci, Cristiane Cantiga, Carolina Barros, Flávio Faria e Ana Maria Vasques que me acolheram com tanto carinho quando cheguei à Araçatuba! Ver o entusiasmo e dedicação de vocês me motivou ainda mais a não desistir do meu mestrado. À **Flávia Piazza**, por me receber durante bons dias em sua morada. E aos **queridos amigos que ingressaram comigo na Pós-Graduação**, Marcelo Seron, Ana Cláudia Rodrigues, Gabriela Pacheco,

Bharbara Moura, Lucas Chalub, Camila Arantes, Larissa Nunes, por serem tão especiais, cada um da sua maneira, e por se fazerem tão presentes, mesmo de longe! Agradeço imensamente a amizade de vocês!

À **Equipe de Docentes da Endodontia FOA/UNESP**, professores Eloi Dezan Junior, João Eduardo Gomes Filho, Gustavo Sivieri de Araújo, Luciano Tavares Ângelo Cintra e mais uma vez, ao professor Rogério de Castilho Jacinto, aos quais tive a honra de poder compartilhar dos seus conhecimentos, seja durante os seminários, das disciplinas que cursei ou nas conversas informais que tivemos pelos corredores da faculdade. Por vocês meu respeito e gratidão.

Ao professor **Antônio Chaves-Neto** por disponibilizar de seu tempo e conhecimento para enriquecer o nosso projeto.

À **Banca do Exame Geral de Qualificação**, composta pelos professores **Frederico Canato Martinho** e **Francisco Montagner**, que tanto contribuíram para compor esse trabalho.

Agradeço a toda equipe do **Departamento de Odontologia Preventiva e Restauradora**, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, em especial ao Jorge e Carlos por serem tão atenciosos.

À **Faculdade de Odontologia de Araçatuba**, na pessoa dos professores: Prof. Titular Glauco Issamu Miyahara, digníssimo Diretor e Prof. Titular Alberto Botazzo Delbem, digníssimo Vice-Diretor.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**) - por financiar a minha bolsa de mestrado durante um ano para que esse trabalho pudesse ser realizado.

“Mas se desejarmos fortemente o melhor e,
principalmente, lutarmos pelo melhor...
O melhor vai se instalar em nossa vida. Porque sou
do tamanho daquilo que vejo, e não do tamanho da
minha altura.”

Carlos Drummond de Andrade

ANDRADE, J.G. **Avaliação do efeito sinérgico da associação do hipoclorito de sódio com dióxido de carbono contra o biofilme de *Enterococcus faecalis***. 2022. 46 f. Dissertação (Mestrado) em Ciência Odontológicas - área Endodontia, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, 2022.

RESUMO

Objetivo: 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 e nos túbulos dentinários por meio de cultura microbiológica.

Material e métodos: 40 pré-molares inferiores humanos extraídos, previamente esterilizados, com único canal, foram contaminados com *E. faecalis* por um período de 10 dias. Os dentes, então, foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos experimentais (n=10) de acordo com o protocolo de irrigação, conforme segue: irrigação convencional com hipoclorito de sódio 2,5% (NaOCl); irrigação convencional com NaOCl 2,5% associado ao dióxido de carbono (CO₂); solução salina estéril; solução salina estéril associada ao CO₂. O pH e temperatura da solução de NaOCl 2,5% foram analisados puro e em combinação com a adição de CO₂ em diferentes pressões (1 a 10) usando um pHmetro digital calibrado a 25°C. As medições foram registradas em 30 e 60 segundos após cada adição de CO₂. A carga microbiana no interior dos canais radiculares, foi avaliada pela contagem de unidades formadoras de colônias nas placas comparando a coleta inicial (S1) com a coleta do canal após a irrigação (S2) e nos túbulos dentinários, avaliada por meio da contagem de unidades formadoras de colônia através da coleta de raspas de dentina dos túbulos dentinários após a irrigação nos 3 terços da raiz. O teste Two Way Repeated Measures ANOVA seguido de Post-Hoc de Student-Newman-Keuls foi usado para Comparação intergrupos e diferentes tempos de amostragem. Uma comparação intragrupo com terços radiculares também foi realizada por meio do teste Two Way Repeated Measures ANOVA seguido de Student-Newman-Keuls ao nível de significância estabelecido em 5% (p < 0,05).

Resultados: Bactérias cultiváveis estavam presentes em todas as amostras S1 (p > 0,05). Todos os protocolos de irrigação foram eficazes na redução da carga bacteriana, independente da solução utilizada (p < 0,05). Houve diferença estatística nos grupos do NaOCl 2,5% e NaOCl 2,5% associado ao CO₂ comparados à solução fisiológica, no interior dos canais radiculares. Em relação à análise dentinária, o grupo NaOCl 2,5% + CO₂ apresentou diferença significativa em todos os terços, com maior redução de UFC/ml no terço cervical. Não foi observada diferença significativa ao comparar os terços nos grupos de solução salina estéril.

Após 10 pressões, houve redução do valor do pH para 7,43 e aumento da temperatura da solução para 28°C. **Conclusão:** Embora a associação de CO₂ com NaOCl 2,5% favoreça sua capacidade de reduzir bactérias no interior do canal radicular, não potencializou seu efeito bactericida no interior dos túbulos dentinários.

Palavras-chave: irrigação endodôntica, hipoclorito de sódio, dióxido de carbono, bactérias, biofilme

ANDRADE, J.G. **Evaluation of the synergistic effect of association of sodium hypochlorite with carbon dioxide on *Enterococcus faecalis* biofilm.** 2022. 46 f. Dissertação (Mestrado) em Ciência Odontológicas - área Endodontia, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, 2022.

ABSTRACT

Objective: 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 and in the dentinal tubules through microbiological culture.

Material and methods: 40 extracted human lower premolars previously sterilized, with a single canal, were contaminated with *E. faecalis* for a period of 10 days. The teeth were randomly distributed into four experimental groups (n=10) according to the irrigation protocol, as follows: conventional irrigation with 2.5% sodium hypochlorite (NaOCl); conventional irrigation with 2.5% NaOCl associated with carbon dioxide (CO₂); sterile saline solution; sterile saline solution associated with CO₂. The pH and temperature of the 2.5% NaOCl solution were analyzed neat and in combination with the addition of CO₂ at different pressures (1 to 10) using a digital pH meter calibrated at 25° C. Measurements were recorded at 30 and 60 seconds after each CO₂ addition. The microbial load inside the root canals was evaluated by counting colony forming units in the plates comparing the initial collection (S1) with the collection of the canal after irrigation (S2) and in the dentinal tubules, evaluated by counting colony forming units by collecting dentin shavings from dentinal tubules after irrigation in the 3 thirds of the root. Data normality was verified by the Shapiro-Wilk test. The **Two Way Repeated Measures ANOVA** Student-Newman-Keuls Post-Hoc test was used for intergroup comparison and different sampling times. **One Way Analysis of Variance on Ranks** was used for % of CFU reduction. An intragroup comparison with root thirds was also performed using the Student-Newman-Keuls test. The **Two Way Repeated Measures ANOVA** Student-Newman-Keuls Post-Hoc test was used for intergroup comparison and different sampling times. An intragroup comparison with root thirds was also performed using the Student-Newman-Keuls test. The significance level was set at 5% ($p < 0.05$). **Results:** Cultivable bacteria were present in all S1 samples ($p > 0.05$). All protocols and irrigation were effective in reducing bacterial load, regardless of the solution used ($p < 0.05$). There was a statistical difference in the 2.5% NaOCl and 2.5% NaOCl groups associated with CO₂ compared to saline solution. Regarding the dentin analysis, the 2.5% NaOCl + CO₂ group showed a significant difference in all thirds, with a

greater reduction of CFU/ml in the cervical third. No significant difference was observed when comparing the thirds in the sterile saline groups. After 10 pressures, there was a reduction in the pH value to 7.43 and an increase in the temperature of the solution to 28°C. **Conclusion:** Although the association of CO₂ with 2.5% NaOCl favors its ability to reduce bacteria inside the root canal, it did not potentiate its bactericidal effect on the inside of the dentinal tubules.

Keywords: root canal irrigants, sodium hypochlorite, carbon dioxide, bacteria, biofilm

LISTA DE FIGURAS

- Figure 1 -** SEM image of *Enterococcus faecalis* biofilm formation in the root canalwalls and within the dentinal tubules. 4
- Figure 2 -** Study design 7
- Figure 3 -** pH measurement and temperature of 2.5% NaOCl solution during theaddition of CO₂ by the carbonator machine. 10

LISTA DE TABELAS

Table 1 -	Mean (Standard Deviation) of CFU/ml counts (\log_{10}) before and after irrigation protocols (IP), and percentage of CFU reduction	8
Table 2 -	Mean (Standard Deviation) of CFU/ml counts (\log_{10}) after irrigation protocols (IP) in the different thirds.	9

SUMÁRIO

INTRODUCTION	1
MATERIAL AND METHODS	2
<i>Sample selection and preparation</i>	2
<i>Cultivation of E. faecalis and specimen contamination</i>	3
<i>Experimental groups</i>	4
<i>Microbiological collection</i>	6
<i>Dentine samples</i>	6
<i>pH Measurement</i>	7
<i>Statistical analysis</i>	7
RESULTS	8
DISCUSSION	10
CONCLUSION	12
REFERENCES	13
Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)	20
Anexo 2 – Guia para submissão do artigo na revista <i>Brazilian Oral Research</i>	24

Introduction

The ability of carbon dioxide (CO₂) to inactivate microorganisms has gained special attention. Pressurized carbon dioxide (PCD) has shown great potential to inhibit several pathogenic species in both aqueous and non-aqueous products¹⁻³. Among the advantages of using PCD are its low cost, low viscosity, non-toxicity and zero surface tension, which allows its rapid penetration into complex structures and porous materials⁴. Previous studies have shown the effectiveness of PCD in inactivating microorganisms⁵⁻⁷. In addition, the effect of PCD resulted in better disinfection when associated with sodium hypochlorite (NaOCl) in the inactivation of *Enterococcus spp.* in seawater¹. In fact, the bactericidal activity of chlorine depends on the proportion of hypochlorous acid (HOCl), which is the predominant form at low pH levels⁸. It is assumed that a reduction in pH caused by CO₂ may help to increase the proportion of HOCl, thus increasing its bactericidal activity⁹. Therefore, pressurization of NaOCl with CO₂ may be an alternative to potentiate the antimicrobial activity of NaOCl in the root canal disinfection.

Root canal irrigation is critical to endodontic treatment success as it performs several functions including cleaning, lubrication, and disinfection of the root canal system¹⁰. Irrigation optimizes the disinfection in the regions untouched by the instruments such as apical delta, isthmus, and dentinal tubules¹¹⁻¹³. NaOCl is the most used endodontic irrigant, due to its antimicrobial activity and capacity of dissolving organic tissues^{14,15}. It has been tested in different concentrations for root canal disinfection, ranging from 0.5% to 6%¹⁶. Although the antimicrobial activity of NaOCl is directly proportional to its concentration, it should be considered that at high concentrations its cytotoxicity also increases in periapical tissues¹⁸⁻²⁰. The literature also suggests that reducing the pH of NaOCl between 6 and 7.5 leads to better antimicrobial activity of the solution.²¹

The persistence of microorganisms and their virulence factors within root canals can also contribute to the endodontic treatment failure^{11,22}. Persistent endodontic infections harbor a polymicrobial community with a predominance of Gram-positive facultative anaerobes, such as *E. faecalis*²³⁻²⁶. It has a biofilm-forming capacity even in areas of anatomical complexity, and also in dentinal tubules²⁷⁻³⁰. In addition to playing a crucial role in bacterial coaggregation, *E. faecalis* has other virulence factors that confer its resistance to endodontic therapy^{31,32}.

To date, there are no studies related to the antimicrobial activity of NaOCl pressurized with CO₂ for root canal disinfection. The aim of the present *in vitro* study was to evaluate the effectiveness of the association of PCD with NaOCl in the inactivation of *E. faecalis* biofilm inside root canals and dentinal tubules through microbiological culture. The null hypothesis tested was that pressurizing NaOCl with CO₂ does not promote a significant difference in the reduction of colony forming unit (CFU) compared with NaOCl in root canal disinfection.

Materials and methods

Sample selection and preparation

This study was approved by the Research Ethics Committee of School of Dentistry, Araçatuba - UNESP (CAAE: 34692620.8.0000.5420).

Forty human mandibular premolars, extracted for periodontal or orthodontic reasons, were selected for this study. Digital radiographs were taken in the mesiodistal and buccolingual directions to select only permanent teeth with a single root canal. Teeth with caries, root fractures, open apex, multi-rooted teeth, root curvatures > 10°, calcified canals, resorption defects, dental posts or prosthetic crowns, and previous endodontic treatment were excluded. All teeth were stored in 0.9% saline until use.

Remnants of periodontal tissues were removed with periodontal curettes. The teeth

crowns were sectioned transversely using a water-cooled diamond disk (American Burrs, Santa Catarina, Brazil) and the radicular samples were standardized in 16 mm lengths. The length was determined by inserting a size 10 K file (Dentsply Sirona, Ballaigues, Switzerland) in the root canal until the tip was visible in the region of the apical foramen under magnification³³. All root canals were instrumented with a rotary file up to 40.04 (MK life, RS, Brazil) following the manufacturer's recommendations regarding speed and torque. During instrumentation, 1 ml of 2.5% NaOCl (Rioquímica, São José do Rio Preto, SP, Brazil) was administered after each file.

The irrigation protocol to clean the entrance of dentin tubules was adapted of Ferraz et al³⁴. All teeth were submitted to an ultrasonic bath for 10 min in 17% EDTA (Biodinâmica, Ibiporã, PR, Brazil), followed by 10 min in a 5.25% NaOCl (Apothimed, SP, Brazil) bath to remove smear layer. The samples were neutralized with 5 ml of 5% sodium thiosulfate (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Each sample was immersed in approximately 700 ml of brain and heart infusion broth (BHI, Kasvi, Paraná, Brazil), and ultrasonically activated for 1 min to allow penetration of the culture medium into the root canal irregularities. The teeth were sterilized in an autoclave for 30 min at 121°C and they were kept in an incubator at 37°C for 48 h to check the effectiveness of the sterilization treatment.

Cultivation of E. faecalis and specimen contamination

The contamination protocol of the specimen was adapted of Carvalho et al.³⁵ Pure culture of *E. faecalis* (ATCC 29212) was cultivated in BHI broth at 37°C for 24 hours. The bacterial culture was transferred to another tube containing BHI and incubated, overnight at 37° C to achieve exponential growth. This culture was adjusted to McFarland standard #1 (3×10^8 CFU/ml) using a spectrophotometer (BioTek Instruments, Winooski, USA). The inoculum (800 µl) was inserted into the 2 ml Eppendorf tubes with the specimen and centrifuged (Eppendorf Centrifuge 5702-R, Eppendorf, Hamburg, Germany) in sequence at 1,400, 2,000, 3,600 and

5,600 g in double cycles of five minutes. The inoculum was renewed at each centrifugation cycle. After the eight centrifugation cycles, the sterile BHI broth was inserted into 2 mL tubes, agitated in vortex (Phoenix Luferco, Araraquara, Brazil), and incubated at 37 ° C for 24 hours. For 10 days, bacterial cultivation was carried out using sterile culture medium (BHI broth, Kasvi) with centrifugation (3,600 g for 5 minutes at 25° C) and alternate days to allow bacterial penetration into the root canal system. The sterile BHI broth (1 ml) was renewed every 48 hours, on the days of centrifugation. All procedures were performed under aseptic conditions in a laminar flow cabinet (Veco Bioseg 12 Ltda, Campinas, Brazil). On day 10, the samples were removed from the Eppendorf tubes as well as the excesses of the culture medium and the external root surfaces were cleaned with sterile gauze. Bacterial penetration into the dentinal tubules using this technique was confirmed by scanning electron microscopy (SEM) in a pilot study, as observed in figure 1.

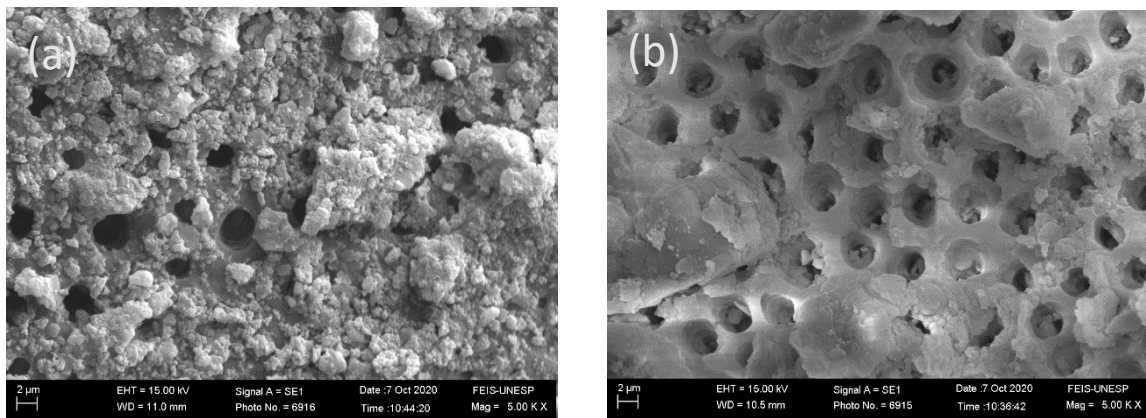


Figure 1. SEM image of *Enterococcus faecalis* biofilm formation in the root canal walls (a) and within the dentinal tubules (b).

Experimental groups

The sample size calculation was based on the data of a previous investigation³⁵⁻³⁷ which indicated 10 teeth per group with α -type error = 0.05 and power β = 0.80. Twelve teeth per group were included, considering the possibility of tooth loss throughout the study.

The samples were assigned into 4 experimental groups, according to the irrigation protocol used, as follows:

- 2.5% NaOCl group: the root canal was irrigated and manually agitated with a #15 K file using 15 ml of 2.5% NaOCl, 5 ml 17% EDTA, and 5 ml of 2.5% NaOCl for 20 seconds each. Then, 1 ml of 5% sodium thiosulfate for 1 min to inactivate NaOCl. The total volume of irrigation with 2.5% NaOCl was 20 ml^{35,38}.
- 2.5% NaOCl + CO₂ group: the irrigation procedures were essentially the same as those described for the 2.5% NaOCl group, except that the irrigating solution used was sodium hypochlorite associated with carbon dioxide introduced by the machine for aerating jet water (Sodastream Industries LTD, Kfar Saba, Israel).
- Sterile saline group: with similar irrigation procedures described above, except to the irrigation solution. In this group the sterile saline solution was used. The total volume of irrigation was 20 ml.
- Sterile saline + CO₂ group: the irrigation procedures were similar to other groups, except that the irrigating solution used was a sterile saline solution associated with carbon dioxide.

After contamination, the samples were mounted on a sterile aluminum table. The apical foramen of each experimental sample was sealed with a fast-setting epoxy resin to prevent apical bacterial leakage and to create a closed canal. All irrigation procedures were performed with 30-G NaviTip needles (Ultradent Products Inc, Indaiatuba, Brazil) always placed 1 mm short from the working length. The addition of CO₂ in 2.5% NaOCl + CO₂ group and Sterile saline + CO₂ group was carried out through the machine for aerating jet water (Sodastream Industries LTD, Kfar Saba, Israel). A gas cylinder (CO₂) was threaded on the back of the machine, and then a bottle of the equipment was completed to the existing mark (800 ml) with the desired solution and attached to the machine. The button, located at the top, to add the gas, was activated

10 times to standardize the volume of CO₂ in the solutions.

Microbiological collection

The method used for sample collection in the present study was previously reported by Yamamoto et al.³⁹ Briefly, bacteriological samples were collected from all root canals before (S1) and after the irrigation protocols (S2) using three sterile paper points (Dentsply Maillefer). Each cone was kept for one minute in the root canal and transferred to 2 ml Eppendorf tubes containing 1 ml of Ringer's solution (Sigma-Aldrich, St Luis, MI, USA). Each tube was vortexed for 30 s. The samples were homogenized and diluted to 10⁻⁴ before and 10⁻¹ after irrigation protocols. Then each dilution was plated on BHI agar and incubated at 37 ° C for 48 h. The colony-forming units (CFU/ml) grown were counted.

Dentine samples

Each tooth was sectioned into three thirds (cervical, medium and apical). Dentin debris were removed from the root canals to collect bacteria inside the dentinal tubules using increasing-diameter sterile diamond-tipped conical burs [4137 (ISO 025), KGSorensen, São Paulo, SP, Brazil] driven by a low-speed electric motor (Dentsply Sirona). The samples obtained from each third were individually stored in 2 ml Eppendorftubes containing Ringer's solution

(Berber et al. 2006), plated on BHI agar, and incubated at 37 °C for 48 h to count colony-forming units (CFU).

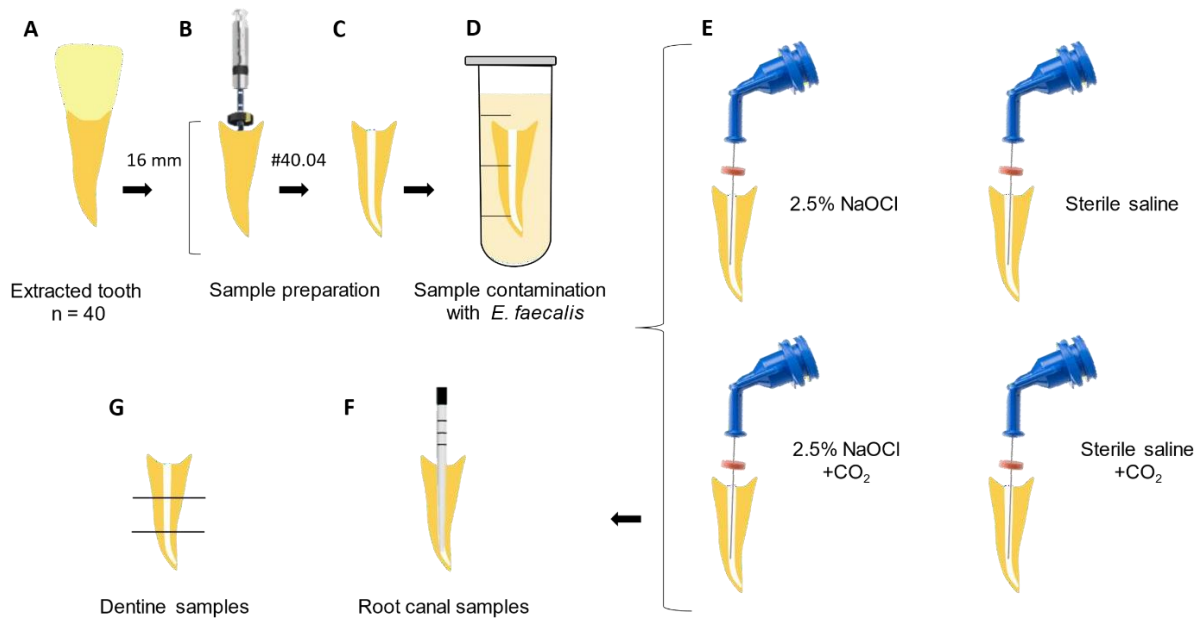


Figure 2. Study design. **A-** Extracted tooth used in experimental groups. **B-** Sample preparation: standardization of the root canal length (16 mm) and endodontic treatment with Rotatory Files #40/04. **C-** Root canal filled with BHI solution. **D-** Sample contamination with *E. faecalis* for 10 days. **E-** Experimental groups. **F-** Root canal sample collection after irrigation protocols. **G-** Dentine sample collection.

pH Measurement

The pH of the 2.5% NaOCl solution was analyzed pure and in combination with the addition of CO₂ at different pressures (1 to 10) using a digital pH meter (PHS3BW model, Bel Engineering, Monza, Italy) calibrated at 25°C. Measurements were recorded at 30 and 60 seconds after each addition of CO₂.

Statistical analysis

The data collected (CFUs) were statistically analyzed by using Sigma Plot 12.0 for Windows (Systat Software Inc., San Jose, USA). The Two Way Repeated Measures ANOVA

followed by Student-Newman-Keuls Post-Hoc test was used for inter-group comparison and different sampling times. One Way Analysis of Variance on Ranks was used for percentage of CFU reduction. An intra-group comparison with root thirds was also performed during the Two Way Repeated Measures ANOVA Student-Newman-Keuls test. The significance level was set at 5% ($p < 0.05$).

Results

Table 1 shows inter-group *E. faecalis* counts before and after irrigation protocols, as the percentage of bacterial reduction. Cultivable bacteria were present in all samples S1 (40/40). All irrigation protocols were effective in reducing bacterial load ($p < 0.05$). Irrigation using 2.5% NaOCl as the irrigation solution was more effective than the sterile saline solution ($p = 0.001$), regardless of the presence of CO₂. The association with CO₂ improves the effectiveness of root canal decontamination when associated with 2.5% NaOCl. However, incorporate CO₂ in sterile saline solution did not increase decontamination of the samples ($p > 0.05$).

The inter- and intra-group analysis are presented in Table 2. 2.5% NaOCl + CO₂ group showed a significant difference in all thirds, with greater reduction of CFU/ml in the cervical third. No significant difference was observed when comparing the thirds in sterile saline groups.

Table 1. Mean (Standard Deviation) of CFU/ml counts (log₁₀) before and after irrigation protocols (IP).

Irrigation Protocol	Before IP	After IP
2.5% NaOCl	6.5 ^{Aa} (0.5)	1.2 ^{Ba} (1.2)
2.5% NaOCl + CO₂	6.3 ^{Aa} (0.4)	0.4 ^{Bb} (0.7)

Sterile saline	6.7 ^{Aa} (0.4)	5.0 ^{Bc} (0.2)
Sterile saline + CO₂	6.9 ^{Aa} (0.3)	4.9 ^{Bc} (0.2)

$p < 0.05$ Means followed by different letters indicate statistically significant differences. The horizontal uppercase letters show the comparison within the same group before and after irrigation. The lowercase vertical letters show the comparison within the different groups using different irrigation protocols at the same time.

Table 2. Mean (Standard Deviation) of CFU/ml counts (\log_{10}) after irrigation protocols (IP) in the different thirds.

Thirds	Irrigation Protocol			
	2.5% NaOCl	2.5% NaOCl + CO₂	Sterile saline	Sterile saline + CO₂
Cervical	0.8 ^{Aa} (1.3)	0.2 ^{Aa} (0.5)	3.9 ^{Ba} (0.6)	4.1 ^{Ba} (0.6)
Medium	0.7 ^{Aa} (1.6)	1.0 ^{Ab} (1.4)	4.2 ^{Ba} (0.4)	3.9 ^{Ba} (0.9)
Apical	2.7 ^{Ab} (1.8)	3.5 ^{Ac} (0.6)	4.5 ^{Ba} (0.3)	4.5 ^{Ba} (0.5)

$p < 0.05$ Means followed by different letters indicate statistically significant differences. The horizontal uppercase letters show the comparison within the different groups using different irrigation protocols. The lowercase vertical letters show the comparison between the thirds after irrigation.

The pure 2.5% NaOCl solution has an alkaline pH value (13.39 - 13.51) at 25°C. With the increase in gas injections, the pH value of the solution decreased, reaching a pH value of 7.43 in a total of 10 injections (Figure 3). The temperature of the solution also changed, increasing

from 25.3 °C in the pure solution to 28 °C in the solution with 10 injections of CO₂.

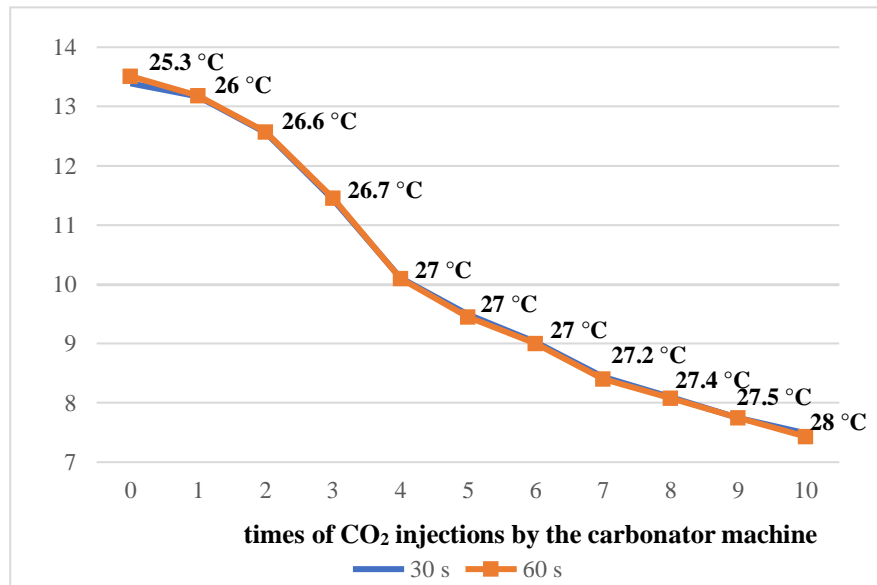


Figure 3. pH measurement and temperature of 2.5% NaOCl solution during the addition of CO₂ by the carbonator machine.

Discussion

Pressurized carbon dioxide (PCD) has been used as a sterilization technique both in the food preservation and water treatment industry, with a potential of being useful in many other applications^{1,5,40}. Many studies have investigated the effects of PCD on pathogenic organisms, vegetative cells and spores, yeasts and molds, showing great potential to inhibit several pathogenic species⁵⁻⁷. However, to the best of our knowledge, this is the first study to investigate the effectiveness of the association of pressurized CO₂ with NaOCl in human substrate and in biofilm inactivation.

Although high concentration NaOCl solution has greater antimicrobial activity, its potential to irritate periapical tissues is more critical compared with the lower concentrations⁴¹. In this view, our aim was to test the 2.5% NaOCl associated with pressurized CO₂ in order to improve its antibacterial activity and serve as an alternative to high concentration solutions.

The presence of cultivable bacteria was revealed in 100% of the initial samples (S1),

validating the contamination protocol. *E. faecalis* is widely used in models of *ex vivo* bacteriological studies for several reasons: it survives isolated in root canals⁴², it is resistant to endodontic treatment⁴³ and it is an easy bacterium to grow in the laboratory⁴⁴. Biofilm sampling was performed through collection with sterilized paper tips, which despite limitations, such as collecting only cultivable bacteria present inside the root canals, is a well-established protocol^{14,45,46}. For sampling the biofilm inside the dentinal tubules, dentin samples were obtained with drills right after the biomechanical procedures. This method has been shown to be effective in other work⁴⁵. The microbiological culture technique was used in our study to assess the effectiveness of irrigants, which is the most used evaluation method in studies (87%)⁴⁷.

In the present study, PCD associated with 2.5% NaOCl was more effective against *E. faecalis* biofilm within the root canals ($p < 0.05$) when compared with 2.5% NaOCl. The significant synergistic benefit of this association has also been observed in previous publications^{1,48}. The reduction in pH of 2.5% NaOCl caused by CO₂ observed in the present study, may be the most effective factor in improving disinfection⁹, probably due to the increase in the proportion of HOCl in NaOCl, which has high bactericidal activity⁸.

In our experiment, the gas injection by the carbonator machine was activated 10 times, to reach pH 7.4, as shown in the pH curve. The influence of pH on the antibacterial activity of NaOCl in *ex vivo* infected root canals can be explained by the fact that the acidification of NaOCl favors its ability to kill bacteria as the lowest values of cell viability were found in 2.5% NaOCl groups at acidic pH⁴⁹. Likewise, the 4.2% NaOCl solution proved to be more effective in terms of its bactericidal action with the acidification of the solution to pH 6.5⁵⁰. Regarding the influence of temperature on the effectiveness NaOCl of the solution, it is not possible to infer that the increase in temperature observed by the addition of CO₂, would have any influence as few articles have been published. Previous *in vitro* studies have suggested that increasing the temperature of a low-concentration NaOCl solution improved its tissue dissolution capacity⁵¹

and increased its antimicrobial action⁵². However, in a randomized controlled clinical study, no extra antibacterial efficacy was observed with NaOCl preheating⁵⁴. Another *in vivo* study showed that pre-warmed (60°C) NaOCl begins to reduce to body temperature (35.7°C) within minutes as soon as the solution touches the root canal wall⁵⁵.

Regarding disinfection within the dentinal tubules, the results of this study suggest that the penetration capacity of NaOCl inside the dentinal tubules did not increase with the addition of pressurized CO₂ ($p > 0.05$). This result was contrary to the expectation that the association of the physicochemical properties of the liquid (solvation), and of the gas (diffusivity), combined with the low surface tension of CO₂ would increase penetration into dentin⁴⁰. However, it is important to point out that the PCD technique in microbial inactivation in the food industry is associated with an agitation to promote the solubilization of CO₂, thus improving its cellular penetration and increasing its antimicrobial activity. Therefore, for further research, it is suggested to evaluate the association of passive ultrasonic irrigation (PUI) that uses ultrasonic tips to stir solutions with PCD in the root canals. Studies on the antibacterial effect of PUI show significantly better results than conventional syringe irrigation^{13,56,57}.

Despite the constant search for a disinfection protocol that totally eliminates bacteria, the great anatomical variation and its complexity make this impossible. New irrigation protocols are needed to improve antibacterial activity and increase irrigation liquid penetration in hard-to-reach areas. The present study showed that the irrigation protocol associating CO₂ with 2.5% NaOCl is more effective against *E. faecalis* biofilm inside the root canal. However, additional analyzes evaluating the chemical and cytotoxic part of this association would be necessary for clinical use.

Conclusion

Although the association of CO₂ with 2.5% NaOCl favors its ability to reduce bacteria inside the root canal, it did not potentiate its bactericidal effect on the inside of the dentinal

tubules.

References

1. Dang T-LT, Imai T, Le TV, Nguyen D-MK, Higuchi T, Kanno A, et al. Synergistic effect of pressurized carbon dioxide and sodium hypochlorite on the inactivation of *Enterococcus* sp. in seawater. *Water Research*. 2016 Dec;106:204–13.
2. Dehghani F, Annabi N, Titus M, Valtchev P, Tumilar A. Sterilization of ginseng using a high pressure CO₂ at moderate temperatures. *Biotechnology and Bioengineering*. 2009 Feb 1;102(2):569–76.
3. Kim SR, Park HJ, Yim DS, Kim HT, Choi I-G, Kim KH. Analysis of survival rates and cellular fatty acid profiles of *Listeria monocytogenes* treated with supercritical carbon dioxide under the influence of cosolvents. *Journal of Microbiological Methods*. 2008 Sep;75(1):47–54.
4. Zhang J, Davis TA, Matthews MA, Drews MJ, LaBerge M, An YH. Sterilization using high-pressure carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids*. 2006 Oct;38(3):354–72.
5. Damar S, Balaban MO. Review of Dense Phase CO₂ Technology: Microbial and Enzyme Inactivation, and Effects on Food Quality. *Journal of Food Science*. 2006 May 31;71(1):R1–11.
6. Erkmen O. Antimicrobial effect of pressurised carbon dioxide on *Enterococcus faecalis* in physiological saline and foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2000 Mar;80(4):465–70.
7. Spilimbergo S, Bertucco A. Non-thermal bacterial inactivation with dense CO₂. *Biotechnology and Bioengineering*. 2003 Oct 28;84(6):627–38.
8. Fukuzaki S. Mechanisms of Actions of Sodium Hypochlorite in Cleaning and Disinfection Processes. *Biocontrol Science*. 2006;11(4):147–57.
9. Vo HT, Imai T, Teeka J, Sekine M, Kanno A, Van Le T, et al. Comparison of disinfection effect of pressurized gases of CO₂, N₂O, and N₂ on *Escherichia coli*. *Water Research*. 2013 Sep;47(13):4286–93.

10. Haapasalo M, Shen Y, Wang Z, Gao Y. Irrigation in endodontics. *British Dental Journal*. 2014 Mar;216(6):299–303.
11. de Almeida AP, Souza MA, Miyagaki DC, Bello YD, Cecchin D, Farina AP. 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. *Journal of Endodontics*. 2014 Dec;40(12):1953–7.
12. de Gregorio C, Estevez R, Cisneros R, Paranjpe A, Cohenca N. Efficacy of Different Irrigation and Activation Systems on the Penetration of Sodium Hypochlorite into Simulated Lateral Canals and up to Working Length: An In Vitro Study. *Journal of Endodontics*. 2010 Jul;36(7):1216–21.
13. Orozco EIF, Toia CC, Cavalli D, Khoury RD, Cardoso FG da R, Bresciani E, et al. Effect of passive ultrasonic activation on microorganisms in primary root canal infection: a randomized clinical trial. *Journal of Applied Oral Science*. 2020;28(28).
14. Carvalho AS, Camargo CHR, Valera MC, Camargo SEA, Mancini MNG. Smear Layer Removal by Auxiliary Chemical Substances in Biomechanical Preparation: A Scanning Electron Microscope Study. *Journal of Endodontics*. 2008 Nov;34(11):1396–400.
15. Mohammadi Z. Sodium hypochlorite in endodontics: an update review. *International Dental Journal*. 2008 Dec;58(6):329–41.
16. Aveiro E, Chiarelli-Neto VM, de -Jesus-Soares A, Zaia AA, Ferraz CCR, Almeida JFA, et al. Efficacy of reciprocating and ultrasonic activation of 6% sodium hypochlorite in the reduction of microbial content and virulence factors in teeth with primary endodontic infection. *International Endodontic Journal*. 2020 May;53(5):604–18.
17. Wong DTS, Cheung GSP. Extension of Bactericidal Effect of Sodium Hypochlorite into Dentinal Tubules. *Journal of Endodontics*. 2014 Jun;40(6):825–9.
18. Gazzaneo I, Vieira GCS, Pérez AR, Alves FRF, Gonçalves LS, Mdala I, et al. Root Canal Disinfection by Single- and Multiple-instrument Systems: Effects of Sodium Hypochlorite Volume, Concentration, and Retention Time. *Journal of Endodontics*. 2019 Jun;45(6):736–41.
19. 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. *Journal of Endodontics*. 2011 Oct;37(10):1380–5.

20. Wang Z, Shen Y, Haapasalo M. Effectiveness of Endodontic Disinfecting Solutions against Young and Old *Enterococcus faecalis* Biofilms in Dentin Canals. *Journal of Endodontics*. 2012 Oct;38(10):1376–9.

21. Rossi-Fedele G, Guastalli AR, Dođramacı EJ, Steier L, De Figueiredo JAP. Influence of pH changes on chlorine-containing endodontic irrigating solutions. *International Endodontic Journal*. 2011 Jun 10;44(9):792–9.

22. Siqueira JF, Rôças IN. Clinical Implications and Microbiology of Bacterial Persistence after Treatment Procedures. *Journal of Endodontics*. 2008 Nov;34(11):1291-1301.e3.

23. Barbosa-Ribeiro M, Arruda-Vasconcelos R, Louzada LM, dos Santos DG, Andreote FD, Gomes BPFA. Microbiological analysis of endodontically treated teeth with apical periodontitis before and after endodontic retreatment. *Clinical Oral Investigations*. 2020 Aug 28;25(4):2017–27.

24. Endo MS, Ferraz CCR, Zaia AA, Almeida JFA, Gomes BPFA. Quantitative and qualitative analysis of microorganisms in root-filled teeth with persistent infection: Monitoring of the endodontic retreatment. *European Journal of Dentistry*. 2013 Jul;07(03):302–9.

25. Pinheiro ET, Gomes BPFA, Ferraz CCR, Teixeira FB, Zaia AA, Souza Filho FJ. Evaluation of root canal microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. *Oral Microbiology and Immunology*. 2003 Mar 21;18(2):100–3.

26. Siqueira JF, Rôças IN. Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics*. 2004 Jan 1;97(1):85–94.

27. Distel J, Hatton J, Gillespie M. Biofilm Formation in Medicated Root Canals. *Journal of Endodontics*. 2002 Oct;28(10):689–93.

28. Guerreiro-Tanomaru JM, de Faria-Júnior NB, Duarte MAH, Ordinola-Zapata R, Graeff MSZ, Tanomaru-Filho M. Comparative Analysis of *Enterococcus faecalis* Biofilm Formation

on Different Substrates. *Journal of Endodontics*. 2013 Mar;39(3):346–50.

29. Sedgley CM, Molander A, Flanagan SE, Nagel AC, Appelbe OK, Clewell DB, et al. Virulence, phenotype and genotype characteristics of endodontic *Enterococcus* spp. *Oral Microbiology and Immunology*. 2005 Feb;20(1):10–9.

30. Zoletti GO, Pereira EM, Schuenck RP, Teixeira LM, Siqueira JF, dos Santos KRN. Characterization of virulence factors and clonal diversity of *Enterococcus faecalis* isolates from treated dental root canals. *Research in Microbiology*. 2011 Feb 1;162(2):151–8.

31. Barbosa-Ribeiro M, De-Jesus-Soares A, Zaia AA, Ferraz CCR, Almeida JFA, Gomes BPFA. Antimicrobial Susceptibility and Characterization of Virulence Genes of *Enterococcus faecalis* Isolates from Teeth with Failure of the Endodontic Treatment. *Journal of Endodontics*. 2016 Jul 1;42(7):1022–8.

32. Figdor D, Davies JK, Sundqvist G. Starvation survival, growth and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum. *Oral Microbiology and Immunology*. 2003 Jun 25;18(4):234–9.

33. Castelo-Baz P, Martín-Biedma B, Cantatore G, Ruíz-Piñón M, Bahillo J, Rivas-Mundiña B, et al. In Vitro Comparison of Passive and Continuous Ultrasonic Irrigation in Simulated Lateral Canals of Extracted Teeth. *Journal of Endodontics*. 2012 May;38(5):688–91.

34. Ferraz CCR, de Almeida Gomes BPF, Zaia AA, Teixeira FB, de Souza-Filho FJ. In Vitro Assessment of the Antimicrobial Action and the Mechanical Ability of Chlorhexidine Gel as an Endodontic Irrigant. *Journal of Endodontics*. 2001 Jul 1;27(7):452–5.

35. Carvalho MC, Zuolo ML, Arruda-Vasconcelos R, Marinho ACS, Louzada LM, Francisco PA, et al. Effectiveness of XP-Endo Finisher in the reduction of bacterial load in oval-shaped root canals. *Brazilian Oral Research*. 2019;33.

36. Bortoluzzi EA, Carlon D, Meghil MM, El-Awady AR, Niu L, Bergeron BE, et al. Efficacy of 3D conforming nickel titanium rotary instruments in eliminating canal wall bacteria from oval-shaped root canals. *Journal of Dentistry*. 2015 May;43(5):597–604.

37. Silva EJNL, Belladonna FG, Zuolo AS, Rodrigues E, Ehrhardt IC, Souza EM, et al. Effectiveness of XP-endo Finisher and XP-endo Finisher R in removing root filling remnants:

a micro-CT study. *International Endodontic Journal*. 2017 May 29;51(1):86–91.

38. Marinho ACS, Martinho FC, Gonçalves LM, Rabang HRC, Gomes BPFA. Does the Reciproc file remove root canal bacteria and endotoxins as effectively as multifile rotary systems? *International endodontic journal*. 2015;48(6):542–8.

39. Yamamoto LY, Loureiro C, Cintra LTA, Leonardo R de T, Banci HA, Ribeiro APF, et al. Antibiofilm activity of laser ablation with indocyanine green activated by different power laser parameters compared with photodynamic therapy on root canals infected with *Enterococcus faecalis*. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2021 Sep;35:102377.

40. Garcia-Gonzalez L, Geeraerd AH, Spilimbergo S, Elst K, Van Ginneken L, Debevere J, et al. High pressure carbon dioxide inactivation of microorganisms in foods: The past, the present and the future. *International Journal of Food Microbiology*. 2007 Jun;117(1):1–28.

41. Zehnder M, Kosicki D, Luder H, Sener B, Waltimo T. Tissue-dissolving capacity and antibacterial effect of buffered and unbuffered hypochlorite solutions. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 2002 Dec;94(6):756–62.

42. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 1998 Jan;85(1):86–93.

43. Saleh IM, Ruyter IE, Haapasalo M, Ørstavik D. Survival of *Enterococcus faecalis* in infected dentinal tubules after root canal filling with different root canal sealers *in vitro*. *International Endodontic Journal*. 2004 Mar;37(3):193–8.

44. Ørstavik D, Haapasalo M. Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. *Dental Traumatology*. 1990 Aug;6(4):142–9.

45. Berber VB, Gomes BPFA, Sena NT, Vianna ME, Ferraz CCR, Zaia AA, et al. Efficacy of various concentrations of NaOCl and instrumentation techniques in reducing *Enterococcus faecalis* within root canals and dentinal tubules. *International Endodontic Journal*. 2006 Jan 3;39(1):10–7.

46. Jacinto RC, Montagner F, Signoretti FGC, Almeida GC, Gomes BPFA. Frequency, Microbial Interactions, and Antimicrobial Susceptibility of *Fusobacterium nucleatum* and

Fusobacterium necrophorum Isolated from Primary Endodontic Infections. *Journal of Endodontics*. 2008 Dec;34(12):1451–6.

47. Swimberghe RCD, Coenye T, De Moor RJG, Meire MA. Biofilm model systems for root canal disinfection: a literature review. *International Endodontic Journal*. 2018 Dec 20;52(5):604–28.

48. Cha H-G, Seo M-H, Lee H-Y, Lee J-H, Lee D-S, Shin K, et al. Enhancing the efficacy of electrolytic chlorination for ballast water treatment by adding carbon dioxide. *Marine Pollution Bulletin*. 2015 Jun;95(1):315–23.

49. del Carpio-Perochena A, Bramante CM, de Andrade FB, Maliza AGA, Cavenago BC, Marciano MA, et al. Antibacterial and dissolution ability of sodium hypochlorite in different pHs on multi-species biofilms. *Clinical Oral Investigations*. 2015 Feb 26;19(8):2067–73.

50. Mercade M, Duran-Sindreu F, Kuttler S, Roig M, Durany N. Antimicrobial efficacy of 4.2% sodium hypochlorite adjusted to pH 12, 7.5, and 6.5 in infected human root canals. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 2009 Feb;107(2):295–8.

51. Stojicic S, Zivkovic S, Qian W, Zhang H, Haapasalo M. Tissue Dissolution by Sodium Hypochlorite: Effect of Concentration, Temperature, Agitation, and Surfactant. *Journal of Endodontics*. 2010 Sep;36(9):1558–62.

52. Giardino L, Mohammadi Z, Beltrami R, Poggio C, Estrela C, Generali L. Influence of Temperature on the Antibacterial Activity of Sodium Hypochlorite. *Brazilian Dental Journal*. 2016;27:32–6.

53. Sirtes G, Waltimo T, Schaetzle M, Zehnder M. The Effects of Temperature on Sodium Hypochlorite Short-Term Stability, Pulp Dissolution Capacity, and Antimicrobial Efficacy. *Journal of Endodontics*. 2005 Sep;31(9):669–71.

54. Karataş E, Ayaz N, Uluköylü E, Baltacı M, Adigüzel A. Effect of final irrigation with sodium hypochlorite at different temperatures on postoperative pain level and antibacterial activity: a randomized controlled clinical study. *Journal of Applied Oral Science*. 2021;29.

55. de Hemptinne F, Slaus G, Vandendael M, Jacquet W, De Moor RJ, Bottenberg P. In Vivo

Intracanal Temperature Evolution during Endodontic Treatment after the Injection of Room Temperature or Preheated Sodium Hypochlorite. *Journal of Endodontics*. 2015 Jul;41(7):1112–5.

56. 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. *Journal of Dentistry [Internet]*. 2020 Aug 1;99:103412. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300571220301585>

57. Weber C, Mcclanahan S, Miller G, Dienerwest M, Johnson J. The Effect of Passive Ultrasonic Activation of 2% Chlorhexidine or 5.25% Sodium Hypochlorite Irrigant on Residual Antimicrobial Activity in Root Canals. *Journal of Endodontics*. 2003 Sep;29(9):562–4.

Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)

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 MENDONÇA

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 MENDONÇA

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

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



Continuação do Parecer: 4.294.444

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

ARACATUBA, 23 de Setembro de 2020

Assinado por:
Aldiéris Alves Pesqueira
(Coordenador(a))

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

Anexo 2 – Guia para submissão do artigo na revista *Brazilian Oral Research*

Instruções aos autores

Missão, escopo e política de submissão

A *Brazilian Oral Research* - BOR (versão online ISSN 1807-3107) é a publicação oficial da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica - SBPqO (Divisão brasileira da *International Association for Dental Research* - IADR). A revista tem classificação A2 Qualis Capes (Odontologia), Fator de Impacto™/2018/2019 1,508 (Institute for Scientific Information - ISI), é revisada por pares (sistema duplo-cego) e tem como missão disseminar e promover o intercâmbio de informações sobre as diversas áreas da pesquisa odontológica e com acesso aberto, modalidade dourada, sem embargo.

A **BOR** aceita submissão dos seguintes tipos de artigos originais e de revisão, nas seguintes tipologias: Pesquisa Original (artigo completo ou *Short Communication*), Revisão Sistemática (e Meta-Análise), além de Cartas ao Editor. Todas as submissões deverão ser exclusivas à BOR.

As revisões críticas de literatura são artigos escritos à convite do editor.

A submissão dos manuscritos, e de toda documentação relacionada, deve ser realizada exclusivamente pelo ScholarOne Manuscripts™, através do link de submissão online.

O processo de avaliação do conteúdo científico do manuscrito será iniciado somente após o atendimento dos requisitos descritos nestas Instruções aos Autores. O manuscrito em desacordo com estes requisitos será devolvido ao autor de correspondência para adequações.

Importante: Após ser aceito por seu mérito científico, todo manuscrito deverá ser submetido a uma revisão gramatical e estilística do idioma inglês. Para conhecer as empresas recomendadas, entre em contato com bor@sbppo.org.br. Os autores deverão encaminhar o texto revisado juntamente com o certificado de revisão fornecido pela empresa de edição escolhida. **Não serão aceitas revisões linguísticas realizadas por empresas que não estejam entre as indicadas pela BOR.**

Apresentação do manuscrito

O texto do manuscrito deverá estar redigido em inglês e fornecido em arquivo digital compatível com o programa "Microsoft Word" (em formato DOC, DOCX ou RTF).

Cada uma das figuras (inclusive as que compõem esquemas/compos) deverá ser fornecida em arquivo individual e separado, conforme as recomendações descritas em tópico específico.

Fotografias, micrografias e radiografias deverão ser fornecidas em formato TIFF, conforme as recomendações descritas em tópico específico.

Gráficos, desenhos, esquemas e demais ilustrações vetoriais deverão ser fornecidos em formato PDF, em arquivo individual e separado, conforme as recomendações descritas em tópico específico.

Arquivos de vídeo poderão ser submetidos, respeitando as demais especificidades, inclusive o anonimato dos autores (para fins de avaliação) e respeito aos direitos dos pacientes.

Importante: o ScholarOne™ permite que o conjunto dos arquivos somem no máximo 10 MB. No caso de a inclusão do arquivo de vídeo acarretar em tamanho superior, é possível informar o link de acesso ao vídeo. Na reprodução de documentação clínica, o uso de iniciais, nomes e/ou números de registro de pacientes são proibidos. A identificação de pacientes não é permitida. Um termo de consentimento esclarecido, assinado pelo paciente, quanto ao uso de sua imagem deverá ser fornecido pelo(s) autor(es) quando solicitado pela **BOR**. Ao reproduzir no manuscrito algum material previamente publicado (incluindo textos, gráficos, tabelas, figuras ou quaisquer outros materiais), a legislação cabível de Direitos Autorais deverá ser respeitada e a fonte citada.

As seções do manuscrito devem ser apresentadas observando-se as características específicas de cada tipo de manuscrito: folha de rosto (*Title Page*), introdução, metodologia, resultados, discussão, conclusão, agradecimentos e referências.

Folha de rosto (*Title Page*; dados obrigatórios)

- Indicação da área temática da pesquisa enfocada no manuscrito.
- Áreas Temáticas: Anatomia; Biologia Craniofacial; Biologia Pulpar; Bioquímica; Cariologia; Ciências do Comportamento; Cirurgia Bucomaxilo; Controle de Infecção; Dentística; Disfunção Temporomandibular; Estomatologia; Farmacologia; Fisiologia; Imaginologia; Implantodontia - Clínica Cirúrgica; Implantodontia - Clínica Protética; Implantodontia Básica e Biomateriais; Imunologia; Materiais Dentários; Microbiologia; Oclusão; Odontogeriatrics; Odontologia Legal; Odontologia Social; Odontopediatria; Ortodontia; Ortopedia; Patologia Oral; Periodontia; Prótese; Saúde Coletiva; Terapia Endodôntica.

- Título informativo e conciso, limitado a um máximo de 110 caracteres incluindo espaços.
- Nomes completos e por extenso de todos os autores, incluindo os respectivos e-mails e ORCID.

Recomenda-se aos autores confrontar seus nomes anotados na Folha de Rosto (*Title Page*) com o perfil criado no ScholarOne™, de modo a evitar incompatibilidades.

- Dados de afiliação institucional/profissional de todos os autores, incluindo universidade (ou outra instituição), faculdade/curso em inglês, departamento em inglês, cidade, estado e país. **Só é aceita uma afiliação por autor**. Verificar se as afiliações foram inseridas corretamente no ScholarOne™.

Texto Principal

Resumo: deve ser apresentado na forma de um parágrafo único estruturado (sem sub-divisões em seções), contendo objetivo, metodologia, resultados e conclusões. No Sistema, utilizar a ferramenta *Special characters* para caracteres especiais, se aplicável.

Descritores: devem ser fornecidos de 3 (três) a 5 (cinco) descritores principais, escolhidos dentre os descritores cadastrados em <https://meshb.nlm.nih.gov/search> (não serão aceitos sinônimos).

Introdução: deve apresentar o estado da arte do assunto pesquisado, a relevância do estudo e sua relação com outros trabalhos publicados na mesma linha de pesquisa ou área, identificando suas limitações e possíveis vieses. O objetivo do estudo deve ser apresentado concisamente ao final dessa seção.

Metodologia: devem ser fornecidas todas as características do material pertinente ao assunto da pesquisa (ex.: amostras de tecido, sujeitos da pesquisa). Os métodos experimentais, analíticos e estatísticos devem ser descritos de forma concisa, porém suficientemente detalhada para permitir que outros possam repetir o trabalho. Os dados de fabricantes ou fornecedores de produtos, equipamentos, ou softwares devem ser explicitados na primeira menção feita nesta seção, como segue: nome do fabricante, cidade e país. Os programas de computador e métodos estatísticos também devem ser especificados. A menos que o objetivo do trabalho seja comparar produtos ou sistemas específicos, os nomes comerciais de técnicas, bem como de produtos ou equipamentos científicos ou clínicos só devem ser citados nas seções de "Metodologia" e "Agradecimentos", de acordo com o caso. No restante do manuscrito, inclusive no título, devem ser utilizados os nomes genéricos. Nos manuscritos que envolvam radiografias, microrradiografias ou imagens de MEV, devem ser incluídas as seguintes informações: fonte de radiação, filtros e níveis de kV utilizados. Os manuscritos que relatem estudos em humanos devem incluir comprovação de que a pesquisa foi conduzida eticamente de acordo com a Declaração de Helsinki (*World Medical Association*).

O número de protocolo de aprovação emitido por um Comitê Institucional de Ética deve ser citado. Estudos observacionais devem seguir as diretrizes STROBE e o check list deve ser submetido. Ensaio clínico devem ser relatados de acordo com o protocolo padronizado da *CONSORT Statement*, revisões sistemáticas e meta-análises devem seguir o PRISMA, ou Cochrane.

Ensaio Clínico

Os ensaios clínicos segundo as diretrizes CONSORT. O número de registro do ensaio clínico e o nome do registro da pesquisa serão publicados com o artigo.

Manuscritos que relatem a realização de estudos em animais devem também incluir comprovação de que a pesquisa foi conduzida de maneira ética, e o número de protocolo de aprovação emitido por um Comitê Institucional de Ética deve ser citado. Caso a pesquisa envolva um registro genético, antes da submissão, as novas sequências genéticas devem ser incluídas num banco de dados público, e o número de acesso deve ser fornecido à **BOR**. Os autores poderão utilizar as seguintes bases de dados:

- GenBank
- EMBL
- DDBJ

As submissões de manuscritos que incluam dados de *microarray* devem incluir a informação recomendada pelas diretrizes MIAME (*Minimum Information About a Microarray Experiment*) e/ou descrever, na forma de itens, como os detalhes experimentais foram submetidos a uma das bases de dados publicamente disponíveis, tais como:

- ArrayExpress
- GEO

Resultados: devem ser apresentados na mesma ordem em que o experimento foi realizado, conforme descrito na seção "Metodologia". Os resultados mais significativos devem ser descritos. Texto, tabelas e figuras não devem ser repetitivos. Os resultados com significância estatística devem vir acompanhados dos respectivos valores de p.

Tabelas: devem ser numeradas e citadas consecutivamente no texto principal, em algarismos arábicos. As tabelas devem ser submetidas separadamente do texto em formato DOC, DOCX ou XLS (podem estar reunidas em um único arquivo).

Discussão: deve discutir os resultados do estudo em relação à hipótese de trabalho e à literatura pertinente. Deve descrever as semelhanças e as diferenças do estudo em relação aos outros estudos correlatos encontrados na literatura, e fornecer explicações para as possíveis diferenças encontradas. Deve também identificar as limitações do estudo e fazer sugestões para pesquisas futuras.

Pesquisa Original

Devem ser limitados a 30.000 caracteres incluindo espaços (considerando-se introdução, metodologia, resultados, discussão, conclusão, agradecimentos, tabelas, referências e legendas de figuras). Será aceito um máximo de 8 (oito) figuras e 40 (quarenta) referências. O resumo deve conter, no máximo, 250 palavras.

Formatação Folha de rosto (*Title Page*)

- Texto principal (30.000 caracteres incluindo espaços)
- Resumo - máximo de 250 palavras
- Descritores - de 3 (três) a 5 (cinco) descritores principais
- Introdução
- Metodologia
- Resultados
- Discussão
- Conclusão
- Agradecimentos
- Referências - máximo de 40 referências
- Legendas de figuras
- Figuras - máximo de 8 (oito) figuras, conforme descrito acima
- Tabelas.

Resumo de Pesquisa Original (*Short Communication*)

Devem ser limitados a 10.000 caracteres incluindo espaços (considerando-se, introdução, metodologia, resultados, discussão, conclusão, agradecimentos, tabelas, referências e legendas de figuras). É permitido um máximo de 2 (duas) figuras e 12 (doze) referências. O resumo deve conter, no máximo, 100 palavras.

Formatação

- Folha de rosto
- Texto principal (10.000 caracteres incluindo espaços)
- Resumo - máximo de 100 palavras
- Descritores - de 3 (três) a 5 (cinco) descritores principais
- Introdução
- Metodologia
- Resultados
- Discussão
- Conclusão
- Agradecimentos
- Referências - máximo de 12 referências
- Legendas de figuras
- Figuras - máximo de 2 (duas) figuras, conforme descrito acima
- Tabelas.

- Folha de rosto
- Texto principal (30.000 caracteres incluindo espaços)
- Resumo - máximo de 250 palavras
- Formulação da pergunta
- Localização dos estudos
- Avaliação crítica Coleta de dados
- Análise e apresentação dos dados
- Aprimoramento
- Atualização da revisão
- Referências - não há limite para a quantidade de referências
- Figuras - não há limite para a quantidade de figuras
- Tabelas.

Carta ao Editor

Cartas devem incluir evidências que sustentem a opinião do(s) autor(es) sobre o conteúdo científico ou editorial da BOR, e ser limitadas a 500 palavras. Figuras ou tabelas não são permitidas.

"Checklist" para Submissão Inicial

- Arquivo de folha de rosto (*Title Page*, em formato DOC, DOCX ou RTF).
- Arquivo do texto principal (*Main Document*, manuscrito), em formato DOC, DOCX ou RTF.
- Tabelas, em formato DOC, DOCX ou EXCELL.
- Figuras: Fotografias, micrografias e radiografias (largura mínima de 10 cm e resolução mínima de 500 DPI) em formato TIFF. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/pub/filespec-images>). Gráficos, desenhos, esquemas e demais ilustrações vetoriais em formato PDF. Cada uma das figuras deve ser submetida em arquivos separados e individuais (não inseridas no arquivo de texto).
- Declaração de interesses e de financiamento, submetida em um documento separado e em formato PDF.

Termo de transferência de direitos autorais e declarações de responsabilidade

O manuscrito submetido para publicação deve ser acompanhado do Termo de Transferência de Direitos Autorais e Declarações de Responsabilidade, disponível no sistema online e de preenchimento obrigatório.

Plágio

A **BOR** emprega um sistema de detecção de plágio. Ao enviar o seu manuscrito para a Revista, este manuscrito poderá ser rastreado. Isto não tem relação com a simples repetição de nomes / filiações, mas envolve frases ou textos utilizados.