

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO

Karolina Frick Bischoff

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO
ÁCIDO GLICÓLICO E SUA INFLUÊNCIA NA
MICRODUREZA DA DENTINA
RADICULAR: UM ESTUDO *IN VITRO***

Passo Fundo
2020

Karolina Frick Bischoff

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO
ÁCIDO GLICÓLICO E SUA INFLUÊNCIA NA
MICRODUREZA DA DENTINA
RADICULAR: UM ESTUDO *IN VITRO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da UPF, para obtenção do título de mestre em Odontologia, área de concentração em Clínica Odontológica, sob orientação do prof. Dr. Matheus Albino Souza.

Passo Fundo
2020

Folha reservada para
Ata de aprovação da Banca Examinadora

Observação:

Mantenha esta página no seu arquivo, imprimindo-a.
Após, faça a substituição pela Ata de aprovação fornecida pela
Secretaria para manter a correta numeração do seu trabalho.

Folha reservada para
Ficha catalográfica

Observação:

Mantenha esta página no seu arquivo, imprimindo-a.
Após, faça a substituição pela Ficha Catalográfica fornecida pela
Secretaria para manter a correta numeração do seu trabalho.

BIOGRAFIA DO AUTOR

Karolina Frick Bischoff, nascida em 16 de junho de 1994, na cidade de Palmeira das Missões. Concluiu a graduação em odontologia pela Universidade de Passo Fundo no ano de 2017. Atualmente é bolsista FAPERGS no mestrado em Odontologia da Faculdade de Passo Fundo, sob a orientação do Professor Dr. Matheus Albino Souza, e além disso está fazendo especialização em endodontia na Faculdade de Passo Fundo.

OFERECIMENTOS E AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me permitir estar aqui e ter conseguido concluir mais essa etapa.

Aos meus pais Fabiano Freire Bischoff e Ana Claudia Bischoff, pelo incansável apoio e por serem sempre meu alicerce e minha maior inspiração, sem e o incentivo de vocês jamais chegaria onde cheguei, essa conquista é nossa.

À minha irmã Luiza Frick Bischoff, que sempre esteve ao meu lado em todos os momentos, me apoiando e me ajudando, e me aguentando nas horas difíceis.

Ao meu professor orientador Matheus Albino Souza, que sempre esteve presente nessa caminhada, disposto a ajudar, incentivar e apoiar, sem dúvida é uma pessoa que me serve de inspiração e que eu admiro muito.

À professora da farmácia Luciana Grando, por toda ajuda durante a realização do meu experimento, por sempre estar disponível para me auxiliar e sanar qualquer dúvida, sua ajuda foi de grande valia.

À aluna de graduação Bárbara Rigo, que teve papel importante na execução desse trabalho.

À FAPERGS por fomentar a minha pesquisa, e me permitir a realização da mesma.

Á todos os meus colegas e a minha turma de pós graduação, que foram pessoas importantíssimas e que fizeram essa caminhada ser mais fácil.

Á todos os professores que nesses 2 anos agregaram de alguma forma no meu crescimento profissional.

Aos funcionários da Faculdade de Odontologia, que de alguma forma ou de outra também contribuíram para essa formação.

Á todo o programa de pós graduação pela oportunidade e por todo amparo fornecido.

Á todos os alunos que me receberam e me acolheram, me fizeram crescer cada dia mais e pudera me ensinar também.

SUMÁRIO

BIOGRAFIA DO AUTOR.....	5
OFERECIMENTOS E AGRADECIMENTOS	6
LISTA DE TABELAS	9
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE ABREVIATURAS	12
1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	20
3. PROPOSIÇÃO.....	50
4. MATERIAIS E MÉTODOS	51
5. RESULTADOS.....	72
6. DISCUSSÃO	73
7. CONCLUSÃO	80
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81
9. ANEXOS	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores de células mortas (média \pm desvio padrão) para cada um dos protocolos usados.....77

Tabela 2. Valores de microdureza Vickers (média \pm desvio padrão) para cada um dos protocolos usados.77

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Heparina , seringa heparinizada realizando a coleta, e seringa preenchida com 5ml de sangue.....	58
Figura 2 e 3. Meio próprio para cariótipo.....	59
Figura 4 e 5. Vinte gotas de sangue no meio próprio para cariótipo.....	60
Figura 6 e 7. Amostras em estufa de CO2.....	60
Figura 8 e 9. Exposição aos irrigantes Finais.....	61
Figura 10 e 11. Adição de 3:1 por 5 minutos nas culturas.....	63
Figura 12 e 13. Centrifugação das células.....	63
Figura 14. Remoção do sobrenadante.....	64
Figura 15 e 16. Células gotejadas em lâminas limpas.....	64
Figura 17. Células presentes na lâminas.....	65
Figura 18. Dentes humanos unirradiculares extraídos.....	66
Figura 19. Corte na junção amelocementária.....	66
Figura 20. Confecção de sulco longitudinais.....	66
Figura 21. Clivagem das raízes.....	67
Figura 22. Duas amostras de cada raiz.....	67
Figura 23. Amostras fixadas em resina acrílica autopolimerizável.....	68
Figura 24. Porção dentinária exposta para cima.....	68
Figuras 25,26 e 27. Amostras sendo lixadas com lixas abrasivas na sequência de granulação 180, 320 e 600.....	68
Figura 28. Amostras em recipiente plástico cobertas por água destilada.....	69
Figura 29. Cuba ultrassônica.....	69
Figura 30. Ciclo de lavagem na cuba ultrassônica.....	69
Figura 31. Secagem com cânulas de aspiração.....	71
Figura 32. Microdurômetro Vickers.....	71
Figura 33. Ilustração das endentações realizadas no canal radicular (Cruz-Filho et al., 2011).....	71
Figura 34. Imagem da endentação realizada pelo microdurômetro Vickers.....	71
Figura 35. Água destilada.....	73
Figura 36. EDTA 17%.....	73
Figura 37. QMIX.....	73
Figura 38. Ácido Glicólico.....	73

Figura 39. Inserção de 5 mL de cada irrigante testado.....	74
Figura 40. Irrigante imerso por 1 minuto.....	74
Figura 41. Lavagem das amostras com 5 ml de água destilada.....	74
Figura 42. Secagem com cânulas de aspiração.....	74
Figura 43. Realização de nova endentação.....	75

LISTA DE ABREVIATURAS

EDTA - Ácido Etilenodiamino tetra-acético
AC – Ácido cítrico
AG – Ácido glicólico
CHX – Clorexidina

RESUMO

Avaliar, in vitro, a influência do uso de 3 concentrações de ácido glicólico na citotoxicidade e microdureza da dentina radicular. A citotoxicidade foi avaliada através da contagem de células vivas e células mortas, para este estudo foi realizado a cultura de linfócitos humanos a partir de doadores de sangue, não expostos a agentes cancerígenos. Os linfócitos foram lançados em meio próprio para cariótipo e foram incubados a 37°C por um tempo total de 72 horas. Após 48 horas, foram incubados os tratamentos e divididos nos grupos de tratamento como descrito acima. Em cada grupo de tratamento, para uma maior confiabilidade dos resultados foi confeccionado duas lâminas. Foi feita a contagem de células totais de cada lâmina, separada em vivas e mortas, e foi feita uma média em porcentagem, seguido foi realizado o teste ANOVA seguido pelo post-hoc de Tukey com nível de significância de 5%. Trinta dentes unirradiculares humanos extraídos foram utilizados para o teste de microdureza. A porção coronária foi seccionada na junção amelocementária e dois sulcos longitudinais foram confeccionados nas faces vestibular e lingual, utilizando disco de diamante. As raízes foram clivadas em duas metades com o auxílio de uma lâmina de micrótomo, provendo duas amostras de cada raiz. Foram fixadas em resina acrílica autopolimerizável, deixando a dentina do canal radicular exposta. As 60 amostras foram lixadas, polidas e divididas aleatoriamente em três grupos (n=10), de acordo com o irrigante final utilizado, como segue: G1 – água destilada; G2 – EDTA 17%; G3 – QMix; G4 – Ácido glicólico 10%; G5 – Ácido glicólico 17%; G4 – Ácido glicólico 25%. As amostras foram irrigadas com 5 ml dos irrigantes finais testados, permanecendo em contato pelo período de 1 minuto. A microdureza da dentina radicular foi por um microdurômetro Vickers, realizando 3 endentações, antes e após os tratamentos.

Todos os irrigantes finais se apresentaram citotóxicos quando comparados com o grupo controle, o ácido glicólico 10% apresentou menor citotoxicidade do que os outros irrigantes utilizados. Todos os irrigantes finais testados mantiveram o mesmo nível de microdureza na dentina radicular, quando comparados ao grupo controle, sem diferença estatística entre eles ($p < 0,05$). Diante do exposto, o presente estudo traz a proposta de avaliar a citotoxicidade do ácido glicólico e sua influência na microdureza da dentina radicular, fazendo um comparativo com os irrigantes finais convencionalmente utilizados na terapia endodôntica.

Palavras chave: ácido glicólico, EDTA, citotoxicidade, QMix, microdureza.

ABSTRACT¹

¹ Evaluation of glycolic acid cytotoxicity and its influence on radicular dentin microhardness: an *in vitro* study.

To evaluate, in vitro, the influence of the use of 3 glycolic acid concentrations on the cytotoxicity and microhardness of root dentin. Cytotoxicity was evaluated by counting living and dead cells. For this study, human lymphocytes were cultured from blood donors not exposed to carcinogens. The lymphocytes were released into karyotype media and incubated at 37 ° C for a total time of 72 hours. After 48 hours, the treatments were incubated and divided into treatment groups as described above. In each treatment group, for greater reliability of results, two slides were made. Total cells were counted from each slide, separated into live and dead, and averaged in percentage, followed by ANOVA followed by Tukey post-hoc with a significance level of 5%. Thirty extracted human uniricular teeth were used for the microhardness test. The coronary portion was sectioned at the cementoenamel junction and two longitudinal grooves were made at the buccal and lingual surfaces using a diamond disc. The roots were cleaved into two halves with the aid of a microtome slide, providing two samples of each root. They were fixed in self-curing acrylic resin, leaving the root canal dentin exposed. The 60 samples were sanded, polished and randomly divided into three groups (n = 10), according to the final irrigant used, as follows: G1 - distilled water; G2 - EDTA 17%; G3 - QMix; G4 - 10% glycolic acid; G5 - Glycolic acid 17%; G4 - 25% glycolic acid. The samples were irrigated with 5 ml of the final irrigants tested, remaining in contact for a period of 1 minute. The microhardness of the root dentin was performed by a Vickers microdurometer, performing 3 indentations before and after the treatments. All final irrigants were cytotoxic when compared to the control group, 10% glycolic acid presented lower cytotoxicity than the other used irrigators. All final irrigants tested maintained the same level of microhardness in the root dentin when compared to the control group. Statistical difference between them ($p < 0.05$), all final irrigants were cytotoxic when compared to the control group, glycolic acid 10% presented lower cytotoxicity than the other irrigants used. It was concluded that the tested irrigating solutions were able to induce cell death and did not modify the root hardness microhardness.

Keywords: glycolic acid, EDTA, cytotoxicity, QMix, microhardness.

1. INTRODUÇÃO

Os microorganismos exercem um papel significativo na indução e progressão das alterações patológicas que acometem a polpa e os tecidos periapicais (KAKEHASHI et al., 1965), trazendo a necessidade do uso de instrumentos endodônticos e substâncias químicas auxiliares para promover uma adequada descontaminação do sistema de canais radiculares (HAAPASALO et al., 2010). No entanto, durante o preparo químico mecânico, ocorre a liberação de raspas de dentina, que, associadas aos componentes orgânicos, microorganismos e substâncias químicas auxiliares, dão origem a uma camada denominada de smear layer. Esta camada adere à superfície dentinária e promove a obliteração dos túbulos dentinários, impedindo a penetração de agentes antimicrobianos (TORABINEJAD et al., 2002). Além disso, a presença da smear layer, nessas situações, promove uma redução da resistência de união à dentina de materiais resinosos (SHAHRAVAN et al., 2007). Dessa forma, o uso de protocolos de irrigação final se faz necessário, no intuito de promover a remoção da smear layer, ao mesmo tempo em que não induza efeitos tóxicos nos tecidos adjacentes e se preserve ao máximo a estrutura dentinária.

O EDTA 17%, irrigante final mais utilizado em endodontia, possui algumas limitações, dentre as quais se incluem uma limitada ação antimicrobiana contra o biofilme de *Enterococcus faecalis* (DE

ALMEIDA et al., 2016), uma reduzida ação de limpeza no terço apical de canais radiculares (KURUVILLA et al., 2015), a redução da microdureza dentinária (ASLANTAS et al., 2014) e o seu efeito tóxico quando em contato com células do tecido conjuntivo (KOLAOUZIDOU et al., 1999; BOTTON et al., 2016). Além disso, uma série de componentes tóxicos são liberados na sua produção, o que pode trazer um impacto prejudicial ao meio ambiente (SILLANPÄÄ, 1997).

O QMix é um irrigante endodôntico que apresenta na sua composição o EDTA 17%, a clorexidina 2% e um agente surfactante. A partir desta composição, o EDTA 17% contribui para a remoção da smear layer, a clorexidina contribui para o processo de descontaminação e o agente surfactante reduz a tensão superficial do produto, aumentando penetração no interior dos túbulos dentinários (STOJICIC et al., 2012). Como consequência, traria uma maior capacidade de limpeza das paredes do canal radicular. Além disso, apesar da presença do EDTA 17% na sua composição, não há relatos consolidados na literatura sobre a genotoxicidade do produto e os prejuízos ao meio ambiente a partir da síntese do QMix.

O ácido glicólico (GA) é o menor de um grupo de ácidos orgânicos naturais conhecidos como α -hidroxil. É derivado de cana-de-açúcar e outros vegetais doces (BRODY, 1977; GREEN et al., 2009). Este produto se caracteriza por ser incolor, inodoro e solúvel em água (THIBAUT et al., 1998), sendo amplamente utilizado em dermatologia no procedimento de peeling químico cutâneo (RAJARATNAM et al., 2010). Além disso, o seu uso está associado ao aumento da síntese de colágeno e proliferação de fibroblastos em estudos prévios (KIM et al., 1998; BERNSTEIN et al., 2001). Mais recentemente, foi estudado seu uso na odontologia,

apresentando resultados satisfatórios na desmineralização do substrato do esmalte e dentina para adesão de materiais restauradores (CECCHIN et al., 2018.)

Diante do exposto, o presente estudo traz a proposta de avaliar a citotoxicidade do ácido glicólico e sua influência na microdureza da dentina radicular, fazendo um comparativo com os irrigantes finais convencionalmente utilizados na terapia endodôntica.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Citotoxicidade

Uma substância com um potencial citotóxico, é aquela capaz de causar um dano na membrana celular, levando até a morte da mesma, que pode ser avaliado através de culturas celulares e o método de viabilidade bacteriana (ROGERO *et al.*, 2003).

SEGURA, *et al.*, em 1997, investigaram o efeito do EDTA na capacidade de aderência dos substrato de macrófagos inflamatórios de ratos para determinar se o vazamento de EDTA nos tecidos periapicais durante a terapia do canal radicular pode alterar a função dos macrófagos. Os macrófagos inflamatórios foram obtidos de ratos Wistar e ressuspensos em meio RPMI-1640. Os ensaios de capacidade de aderência do substrato foram realizados em tubos Eppendorf durante 15 minutos de incubação a 37 graus C em uma atmosfera humidificada de 5% de CO₂. Os resultados mostraram que o EDTA diminuiu a capacidade de aderência do substrato de macrófagos inflamatórios de uma maneira dependente da dose e do tempo. Em conclusão, uma concentração de EDTA inferior à utilizada em endodontia diminuiu significativamente a capacidade de aderência do substrato de macrófagos. Essa aderência é o primeiro passo no processo fagocítico e na apresentação do antígeno, mas o vazamento de EDTA para

os tecidos periapicais durante a preparação dos canais radiculares pôde inibir a função dos macrófagos e reduziu as reações inflamatórias periapicais.

KOLAOUZIDOU, et al., 1999, avaliaram e compararam os efeitos citotóxicos de soluções de EDTA neutro (15%, 1% e 0,1%) e alcalino (17%, 1%, 0,1%) com os da solução de hipoclorito de sódio (2,25%, 1%, 0,1%) usando uma linhagem celular estabelecida: L929, com células de fibroblastos. A citotoxicidade foi avaliada por técnica quantitativa em cinco períodos de observação (1, 3, 6, 12 e 24 h). Os efeitos não citotóxicos foram observados nos grupos controle. Nos testes utilizando EDTA e NaOCI, houve uma diminuição na densidade celular confirmando o efeito citotóxico dos materiais testados. As concentrações de 17% e 15% de EDTA e 2,25% de NaOCI foram citotóxicas enquanto que em concentrações de 0,1%, os agentes eram moderadamente citotóxicos. Concluiu-se que todos os agentes testados apresentaram citotoxicidade moderada a grave no presente modelo experimental de maneira dependente da concentração.

SCEIZA, et al., em 2001, analisaram a citotoxicidade de ácido cítrico a 10% e EDTA-T em cultura de fibroblastos usando azul tripano. As soluções foram diluídas para 1%, 0,1% e 0,01% e aplicadas a culturas de células NIH 3T3. Células cultivadas em fresco DMEM serviu como grupo controle. Após 0, 6, 12 e 24 h (ensaio de curto prazo, viabilidade) e 1, 3, 5 e 7 dias (ensaio a longo prazo, sobrevivência), as células foram contadas utilizando um hemocitometro. Em testes de curto prazo, a viabilidade celular variou de 85% a 99% para todos os grupos experimentais sem diferenças estatísticas quando comparados com culturas do grupo controle, exceto para o grupo tratado com 1% de EDTA-

T, que causou uma diminuição progressiva na viabilidade celular. Em testes de longo prazo, todas as culturas aumentaram em número desde o dia 1 até o final do período experimental, não mostrando inibição da proliferação celular, exceto para as culturas tratadas com 1% de EDTA-T, que impediram totalmente o crescimento celular. Todas as diluições de ácido cítrico a 10% foram mais biocompatíveis que o EDTA-T. Culturas tratadas com ácido cítrico apresentaram maior porcentagem de células viáveis nos ensaios de curto prazo, e as células mantiveram sua capacidade de autor renovação.

SERPER, *et al*, em 2001, compararam a capacidade de remoção da smear layer e a citotoxicidade de NaOCl, EDTA e Água Potencial Oxidativa(OPW). Foram examinados 15 incisivos superiores humanos extraídos. Os canais radiculares foram ampliados para o forame apical até uma lima K # 60 e irrigados com: (a) NaOCl seguido de OPW, (b) OPW durante e após a instrumentação e (c) NaOCl seguido de EDTA e NaOCl. O efeito desses irrigantes na camada de esfregaço foi avaliado usando um microscópio eletrônico de varredura. A citotoxicidade *in vitro* destes irrigantes foi examinada por ensaio colorimétrico MTT. Descobriu-se que a combinação de NaOCl e OPW, bem como a aplicação de OPW por si só, não conseguiu remover a smear layer do terço apical, enquanto que a combinação EDTA e NaOCl obteve a remoção completa. OPW, quando usado durante e após a instrumentação, removeu a smear layer no terço médio de forma mais eficaz do que a NaOCl seguida de OPW. EDTA exerceu mais efeitos citotóxicos em todas as concentrações testadas quando comparadas com OPW e NaOCl. Em conclusão, O OPW foi menos citotóxico do que outros irrigantes, mas não removeu efetivamente a smear layer. Tratamento com EDTA seguido por NaOCl removeu

eficientemente a smear layer, mas sua citotoxicidade deve ser considerada durante a terapia endodôntica.

ZHANG, et al., em 2003, examinaram a citotoxicidade de MTAD em comparação com irrigantes e medicações comumente usados. Os fibroblastos L929 foram cultivados em placas de cultura de células e colocados em contato com várias concentrações de irrigantes e medicamentos teste. A citotoxicidade destes materiais foi avaliada 24 horas após a incubação utilizando o ensaio MTT. As médias e os desvios padrão de absorvância foram calculados para cada grupo e analisados estatisticamente para determinar a presença ou ausência de diferença significativa entre as médias. Os valores da dose inibitória de 50% foram calculados, classificados e analisados estaticamente usando o intervalo de sinal para mediana. Com base nos resultados, concluíram que o MTAD é menos citotóxico que eugenol, 3% de H₂O₂, CA(OH)₂ pasta, NaOCL a 5,25%, Peridex e EDTA é mais citotóxica do que NaOCl a 2,63%, 1,31% e 0,66%.

MALHEIROS, *et al*, em 2005, avaliaram e compararam a citotoxicidade de uma solução 17% EDTA e a de três soluções com diferentes concentrações de ácido cítrico (10, 15 e 25%) em fibroblastos cultivados. As análises foram medidas *in vitro*. Células NIH-3T3 (CRL 1658) obtidas da American Type Culture Collection (Rockville, MD) foram cultivadas a 37 ° C em meio de Eagle modificado por Dulbecco, suplementado por 10% de soro bovino fetal e 1% de solução antibiótica antimicótica em 5% de CO₂ Atmosfera com 95% de umidade. Os grupos experimentais foram: (I) controle, culturas crescido em DMEM fresco; (II) DMEM contendo 17% de solução de EDTA diluída a 0,1%; (III) DMEM contendo solução de ácido cítrico a 25% diluída a 0,1%; (IV)

DMEM contendo 15% solução de ácido cítrico diluída para 0,1%; (V) DMEM contendo 10% de solução de ácido cítrico diluído para 0,1%; (VI) DMEM contendo 17% de solução de EDTA diluída a 0,5%; (VII) Culturas tratadas com uma solução de ácido cítrico a 25% diluída a 0,5%; (VIII) DMEM contendo solução de ácido cítrico a 15% diluída a 0,5%; (IX) culturas tratadas com um ácido cítrico a 10% solução diluída para 0,5%. Concluíram, então, que a solução de EDTA de 17% causou maiores efeitos citotóxicos do que as soluções de ácido cítrico testadas.

AMARAL, *et al*, em 2007, avaliaram a citotoxicidade, “in vivo”, de EDTA 17% e soluções de ácido cítrico 15% em macrófagos usando o método MTT. Um total de 5 x 10⁵ (5) células foram plaqueadas em cultura média com 17% de EDTA ou 15% de ácido cítrico. O meio fresco foi usado como controle. Os valores de toxicidade foram analisados estatisticamente pelo teste de anova e Tukey (P <0,05) em períodos curtos (0, 6, 12, 24 h) e médios (1, 3, 5, 7 dias), utilizando a absorvência ELISA. Concluiu-se que tanto o EDTA como o ácido cítrico apresentaram efeitos citotóxicos nas culturas de macrófagos “in vivo”. Porém o ácido cítrico foi o menos tóxico em períodos de 1 a 7 dias de uso.

RING, *et al*, compararam, em 2008, o efeito de 10 tratamentos diferentes de irrigantes endodônticos e quelantes na fixação da célula-tronco da polpa dental (DPSC) às superfícies dos canais radiculares. Trinta e oito dentes unirradiculares humanos extraídos foram limpos e moldados usando a instrumentação rotativa ProTaper e ProFile (Tulsa Dentsply, Tulsa, OK). Os tratamentos de irrigação investigados foram 6% de hipoclorito de sódio, 2% de gluconato de clorexidina, Aquatine Endodontic Cleanser e Morinda citrifolia. Os tratamentos de irrigação foram utilizados em conjunto com EDTA ou MTAD. Os dentes

instrumentados foram imediatamente colocados em cultura celular com DPSC confluentes por 1 semana. O número de DPSCs anexados parece estar correlacionado com a citotoxicidade da solução de irrigação do canal radicular. A presença ou ausência da smear layer teve pouca influência sobre a atividade de DPSC. Os resultados sugerem que fármacos biocompatíveis são necessários para promover a aderência do DPSC à dentina do canal radicular, o que é essencial para realizar algumas terapias endodônticas regenerativas. Em conclusão, o Aquatone EC / EDTA e MCJ / EDTA estão entre as mais ótimas das soluções de irrigação para ajudar na sobrevivência e fixação de DPSCs para serem utilizados como parte do tratamento endodôntico regenerativo.

PAPPEN, et al., em 2009, avaliaram *in vitro*, as concentrações de óxido nítrico (NO) em células peritoneais de macrófagos murinos após contato com MTAD, Tetraclean, Smear Clear e EDTA. As células de macrófagos foram obtidas de camundongos Swiss após lavagem peritoneal. Os agentes quelantes foram diluídos em água destilada obtendo 12 concentrações, o ensaio MTT identificou as concentrações, por grupo, apresentando maior viabilidade celular (análise de variância, $p < 0,01$). Concentrações selecionadas foram testadas para a expressão de NO usando a reação de Griess. Meio de cultura e lipopolissacarídeo (LPS) foram utilizados como grupo controle. Através da análise estatística mostrou que os quelantes apresentaram concentrações elevadas quando comparados com o controle negativo. MTAD induziu a menor quantidade de NO, seguida por Tetraclean, EDTA e Smear Clear. Conclui-se então que os quelantes endodônticos testados apresentaram severos efeitos pró-inflamatórios em macrófagos murinos. Soluções a base de ácido cítrico induzem menos liberação de NO do que irrigantes a base de EDTA.

GAMBARINI, *et al*, em 2011, investigaram a citotoxicidade in vitro da FotoSan (CMS DENTAL APS, Copenhagem Dinamarca), 17% EDTA, e 2% Clorexidina. Os fibroblastos do ligamento periodontal de pacientes saudáveis foram cultivados. FotoSan (com e sem ativação de luz por 30 segundos), 17% de EDTA e 2% de clorexidina foram utilizados para os testes de viabilidade celular. As células não tratadas foram usadas como controle. A vitalidade celular foi avaliada pelo teste MTT. A produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) foi medida usando uma sonda fluorescente sensível à oxidação. Os resultados foram analisados estatisticamente por ANOVA, seguido de uma comparação múltipla de meios por Student-Newman-Keuls, e a significância estatística foi definida em $p < 0,05$. Foi concluído que, os efeitos citotóxicos do FotoSan foram estatisticamente inferiores do que os observados com 2% de clorexidina, enquanto que não foram encontradas diferenças significativas em comparação com 17% de EDTA. SERPER, *et al*, em 2001 ZHANG, *et al.*, em 2003, MALHEIROS, *et al*, em 2005

SAGHIRI, *et al*, em 2011, avaliaram o possível impacto do pH nos efeitos citotóxicos de MTAD, EDTA 17%, e NaOCl 2,6% nos fibroblastos gengivais humanos usando o teste MTT. Os fibroblastos foram expostos aos irrigantes e sua viabilidade foi avaliada após 1, 6 e 12 h. O pH do meio foi medido em cada intervalo. Os valores de absorção de luz foram medidos para cada meio de cultura usando o dispositivo Elisa Reader. Concluíram que o NaOCl teve significativamente menor citotoxicidade do que EDTA e MTAD. A citotoxicidade também diminuiu em 12, 6 e 1 h, respectivamente.

ASHOFTEH, *et al*, em 2012, compararam as respostas do tecido subcutâneo ao MTAD (mistura de um isômero de tetraciclina, um ácido e

um detergente), 17% de EDTA e 2,6% de NaOCl. Trinta e seis ratos Wistar albinos foram utilizados para o estudo, onde as soluções de teste foram injetadas subcutaneamente em áreas predeterminadas no dorso do animal. Os ratos foram então divididos aleatoriamente em três grupos de doze cada e sacrificados a cada 2 horas, 2 dias e 2 semanas. A gravidade da inflamação induzida por cada irrigante em diferentes intervalos de tempo foi avaliada histologicamente. Concluíram então que a diferença de gravidade das reações inflamatórias induzidas pelos irrigantes testados nos diferentes intervalos de tempo foi estaticamente significativa. Não houve diferença significativa entre a gravidade da inflamação induzida por MTAD e 2,6% de NaOCl nos vários intervalos de tempo. As respostas de tecido subcutâneo ao MTAD não foram diferentes das observadas em espécimes de EDTA de 17% em intervalos de 2 horas e 2 dias. Sob as condições deste estudo, o MTAD tem a mesma toxicidade que 2,2% de NaOCl.

MARINS, *et al.*, em 2012, avaliaram a capacidade “in vitro”, de irrigantes em induzir dano genético ou morte celular. Células de fibroblastos murine foram expostas ao EDTA, hipoclorito de sódio (NaOCl), MTAD e ácido cítrico em concentrações crescentes por 3 horas a 37° C. O grupo controle negativo foi tratado com controle veicular (solução tampão fostato – PBS) por 3 horas a 37° C, e o controle positivo foi tratado com metilmetanosulfonato, 1µM, durante 3 horas a 37 ° C. A citotoxicidade foi avaliada pelo teste do azul de tripano e genotoxicidade foi avaliada pelo ensaio de célula única (cometa). Os resultados mostraram que a exposição a 2,5% e 5% de NaOCl e 8,5% de ácido cítrico resultou em um efeito citotóxico significativo. O NaOCl, EDTA e ácido cítrico não produziram efeitos genotóxicos em relação aos danos do ensaio

cometa para todas as concentrações avaliadas. Embora o MTAD não tenha sido um agente citotóxico, mostrou efeitos genotóxicos significativos em todas as concentrações testadas. Verificou-se que o NaOCl, o EDTA e o ácido cítrico são citotóxicos dependendo da dose, mas não eram genotóxicos. O MTAD não causou morte celular, mas apresentou efeitos genotóxicos.

SMITH, *et al*, em 2012, determinaram se as preparações de matriz extracelular (ECM) de polpa (pECM) e dentina (dECM) possuíam atividade antimicrobiana. As preparações ECM de dentina e celulose foram isoladas com 10% de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), pH 7,2 e uso sequencial de 0,5 mol L (-1) NaCl, pH 11,7 e 0,1 mol L (-1) ácido tartárico, pH 2,0, respectivamente, com inclusão de inibidores de protease por toda parte. A atividade antimicrobiana contra *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis* e *Enterococcus faecalis* foi avaliada usando turbidez como medida do crescimento de bactérias. A citotoxicidade dos extratos nas células primárias de polpa também foi determinada pela liberação de lactato desidrogenase (LDH). A análise estatística dos dados foi realizada utilizando os testes t de estudante emparelhados. Concluíram então que a atividade antibacteriana bacteriostática de pECM e dECM indica que a liberação dessas moléculas de matriz de celulose e dentina pode contribuir para respostas de defesa durante doenças dentárias, tratamento e reparo.

BALLAL, *et al*, avaliaram e compararam, em 2013, o efeito genotóxico e apoptótico de soluções aquosas de EDTA com ácido maleico (MA) usando células de fibroblasto pulmonar de hamster chinês crescendo *in vitro*. As células que crescem exponencialmente foram tratadas com várias concentrações de EDTA ou MA sozinhas durante 30

min, e o efeito genotóxico foi analisado por micronúcleos, bem como os ensaios de cometa e o tipo de morte celular através de medições de células apoptóticas usando métodos microscópicos e de citometria de fluxo. Para todos os experimentos, H₂O₂ foi usado como um controle positivo. Concluíram, então, que MA e EDTA não são potencialmente agentes genotóxicos e MA induziu menor morte apoptótica / necrótica do que a EDTA em suas doses clinicamente relevantes.

ALKAHTANI, *et al*, em 2014, avaliaram e compararam a citotoxicidade do QMIX na irrigação do canal em células-tronco mesenquimatosas da medula óssea humana (hTERT-MSC-C1) e compararam com a hipoclorito de sódio (NaOCl). As células foram expostas ao QMIX e NaOCl. A viabilidade celular foi avaliada por ensaios de MTT e alamarBlue. A morfologia celular foi estudada após duas horas de exposição ao QMix e NaOCl. Após períodos de incubação de 2 e 4 horas que as análises foram realizadas. Finalmente, a mancha fluorescente de brometo de etídio / alga de acridina (EB / AO) foi aplicada às células nas lâminas de 8 câmaras depois de serem incubadas com os agentes de teste durante 2 horas para detectar células vivas e mortas. Concluiu-se que as soluções Qmix e NaOCl foram tóxicas para as células-tronco mesenquimatosas onde cada uma induziu a morte celular de maneira diferente.

VOUZARA, *et al.*, em 2015, avaliaram a capacidade de irrigantes do canal radicular comumente usados de induzir efeitos citotóxicos, quando aplicados isoladamente ou em combinação. As células MRC5 foram cultivadas como culturas de monocamada a 37 ° C, numa atmosfera contendo 5% de CO₂ em ar e 100% de humidade relativa. As células foram expostas a hipoclorito de sódio (NaOCl), ácido

etilenodiaminotetracético (EDTA), clorexidina (CHX) e suas combinações (NaOCl/EDTA, NaOCl/CHX, EDTA/CHX) em diluições seriadas. O meio de crescimento foi o meio de Eagle modificado por Dulbecco suplementado com 10% de soro bovino fetal e antibióticos e foi usado como controle. O efeito na sobrevivência celular foi estimado após 6 e 24 h de exposição por meio do ensaio da sulforrodamina B, em referência aos controles. As curvas de dose-resposta foram plotadas, e 50% das doses inibitórias (IC50) foram submetidas a análise estatística (anova e teste de comparação post hoc; $P < 0,05$). Os irrigantes testados foram citotóxicos de maneira dependente da dose e do tempo. O CHX foi o irrigante mais citotóxico testado, seguido pelo NaOCl, enquanto o EDTA foi o irrigante testado menos citotóxico. A CHX foi significativamente mais citotóxica que o NaOCl e o EDTA. O NaOCl foi significativamente mais citotóxico do que o EDTA. A ação combinada de irrigantes não produziu um aumento significativo em sua citotoxicidade.

BOTTON, *et al*, em 2015, avaliaram a toxicidade, *in vitro*, dos agentes irrigantes e associações farmacológicas usadas na pulpectomia de dentes unirradiculares. A viabilidade celular (MTT), a peroxidação lipídica (TBARS), o teste de cometas alcalinas e os testes GEMO foram realizados para avaliar a citotoxicidade e genotoxicidade das soluções: hipoclorito de sódio (1% e 2,5%), 2% de clorexidina, 6% de ácido cítrico e 17 % EDTA, que foram testados, individualmente e em associação, expondo células mononucleares de sangue periférico humano. Após a realização do teste de Kolmogorov-Smirnov, os dados foram analisados por anova seguido do teste post hoc de Dunnett e Kruskal-Wallis seguido do teste post hoc de Dunn. Um nível de significância foi estabelecido em $P < 0,05$. Entre as soluções, a que menos apresentou toxicidade foi a

clorexidina. A associação EDTA e clorexidina apresentou o menor potencial de toxicidade entre todos os grupos.

PRADO, *et al*, em 2015, compararam os efeitos antimicrobianos e citotóxicos de uma solução de ácido fosfórico 37% para outros fármacos comumente usados na endodontia. 37% de ácido fosfórico, 17% de EDTA, 10% de ácido cítrico, 2% de clorexidina (solução e gel) e 5,25% de NaOCl foram adicionadas. A atividade antimicrobiana foi testada contra *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Actinomyces meyeri*, *Parvimonas micra*, *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella nigrescens* de acordo com o método de difusão em ágar. A citotoxicidade dos irrigantes foi determinada utilizando o ensaio MTT. Concluíram que o ácido fosfórico 37% demonstrou maior atividade antimicrobiana e citotoxicidade semelhante à de 5,25% de NaOCl e 2% de clorexidina (gel e solução). O EDTA e ácido cítrico apresentaram maior viabilidade celular que os outros irrigantes.

FHARHAD, *et al.*, em 2016, avaliaram o efeito de algumas soluções irrigadoras em células tronco de papila periapical humana (SCAP) após diferentes períodos de exposição. Células tronco de terceiros molares inferiores impactados e imaturos foram isolados e transferidos para placas de 24 placas de wells, divididas aleatoriamente em 6 grupos experimentais expostas a BioPure MTAD Cleanser, QMix, EDTA 17%, Clorexidina 2%, NaOCl a 5,25%, solução salina estéril e grupo controle não tratado. A citotoxicidade foi avaliada após 1,5, e 15 minutos de exposição utilizando o ensaio de tiazol tetrazólio (MTT). Os dados foram analisados estatisticamente usando medidas repetidas ANOVA. Nível de significância foi fixado em 0,05. A porcentagem média de células viáveis

em todos os grupos experimentais foi significativamente diferente dos grupos de solução salina estéril em todos os momentos. A porcentagem média de células viáveis diminuiu significativamente ao longo do tempo nos grupos NaOCl, QMix, EDTA e MTAD, mas nenhuma redução significativa foi observada no grupo CHX. Em todos os momentos, a maior e a menor citotoxicidade foram observadas nos grupos MTAD e solução salina normal, respectivamente. A citotoxicidade dos materiais de estudo do mais alto a mais baixo foi o seguinte: MTAD > EDTA > QMix = NaOCl > CHX > solução salina estéril. Concluiu-se que clorexidina teve a menor citotoxicidade em comparação com EDTA, MTAD, QMix e NaOCl e sua citotoxicidade não mudou ao longo do tempo em comparação com outras soluções.

DAL BELLO, *et al.*, em 2019, avaliaram os efeitos do ácido glicólico sobre a microdureza, rugosidade, conteúdo mineral da dentina, remoção da camada de *smear layer* e citotoxicidade. Cem dentes humanos foram divididos aleatoriamente em seis grupos: água destilada (grupo controle), EDTA 17%, ácido cítrico 10%, ácido glicólico 5%, ácido glicólico 10% e ácido glicólico 17%. A microdureza e a rugosidade foram medidas no lúmen do canal. Para avaliação da remoção de *smear layer* foi utilizado a microscopia eletrônica de varredura (MEV) (2000x), energia espectroscopia de raios X dispersiva (EDS) para análises químicas. O ensaio de viabilidade celular foi feito em células de fibroblastos. A menor microdureza e maior rugosidade foram observado para ácido glicólico 17%. O ácido glicólico mostrou a capacidade de remover a camada de esfregaço para uma similar ao EDTA e ácido cítrico sem diferença estatística entre as concentrações utilizadas. O ácido glicólico e o ácido cítrico eram citotóxicas de maneira dependente da dose.

2.2 Microdureza Dentinária

KAKEHASHI, et al, em 1965, observaram as alterações patológicas resultantes de exposições experimentais de polpa não tratadas em ratos livres de germes, em comparação com ratos convencionais com uma microflora normalmente complexa. Os tecidos pulparem desses ratos foram expostos por perfuração através da superfície oclusal do primeiro molar superior direito com uma broca circular de carvão montada em um mandril de mão com ponta de fusão de joalheiro. Após variados intervalos de tempo pós-operatórios (1 a 42 dias), os animais foram mortos e os tecidos apropriados foram seccionados em série. No oitavo dia, o tecido pulpar vital permaneceu apenas na metade apical das raízes nos animais convencionais. Necrose pulpar completa com granulomas e formação de abscesso ocorreu em todos os espécimes mais velhos. Evidência de reparo foi uniformemente ausente. Em contraste, não foram encontradas polpas desvitalizadas, granulomas apicais ou abscessos nos animais livres de germes. A ponte dentinal começou aos 14 dias e aos 21 e 28 dias foi concluída, independentemente do ângulo ou gravidade da exposição. Estes resultados, mesmo em face de impacções brutas de alimentos, indicam que a presença ou ausência de uma flora microbiana é o principal determinante na cicatrização de polpas de roedores expostas.

YAMADA, et al, em 1983, testaram a eficácia da instrumentação do canal radicular com 1 mL de solução de NaOCl a 5,25% entre cada instrumentação e lavagem final com 20 mL de várias soluções e combinações de soluções. O microscópio eletrônico de varredura mostrou

que 10 mL de EDTA 17%, pH 7,7 seguida de 10 mL de solução de NaOCl a 5,25% foi a mais eficaz.

SILLANPAA, et al, em 1997, avaliaram que O EDTA pode ser extremamente persistente em ETAR e também em águas naturais; O DTPA parece mais biodegradável. No entanto, a biodegradabilidade do DTPA pode ser de significância desprezível, pois o EDTA, e em alguns casos também o DTPA, é geralmente encontrado nas águas receptoras de muitas áreas industriais, sendo classificado como um dos principais poluentes orgânicos lançados nas águas. A estimativa da especiação química de EDTA e DTPA em águas naturais é uma tarefa desafiadora devido à complexidade do sistema e deve ser baseada não apenas em cálculos de equilíbrio, mas também em determinações analíticas diretas de diversas espécies metálicas. Infelizmente, os métodos analíticos para estudos de especiação em concentrações ambientalmente relevantes não estão disponíveis. Além disso, o monitoramento de EDTA ou DTPA em sedimentos e partículas sólidas não foi iniciado. Não se espera que o EDTA e o DTPA sejam extremamente tóxicos para os organismos aquáticos. Por outro lado, em águas naturais, vários compostos afetam os organismos simultaneamente. No entanto, não se espera que esses complexos metálicos sejam tão biodisponíveis quanto os íons metálicos livres. Em conjunto, o EDTA e o DTPA, sendo compostos persistentes, contribuem para a química geral do ambiente aquático. Eles também podem causar várias indiretas e, sob circunstâncias extremas, efeitos diretos no ambiente aquático. Assim, sua liberação em águas naturais deve ser minimizada sempre que possível.

SALEH, et al, em 1999, avaliaram o efeito de algumas soluções de irrigação endodônticas sobre a microdureza da dentina do canal radicular.

Utilizaram 18 incisivos maxilares, recentemente extraídos. As coroas foram seccionadas na junção cimento-esmalte. Os canais foram instrumentados com uma lima #50 e irrigados com solução salina. Dividiu-se em 2 grupos, com 9 raízes em cada um. A microdureza da dentina foi medida para fins de controle a 500 µm e 1 mm da interface pulpo-dentinária. As porções do canal nos segmentos radiculares incluídos no primeiro grupo foram irrigadas com 3% de H₂O₂ e 5% de soluções de NaOCl usadas alternativamente, enquanto a solução de EDTA a 17% foi a irrigação utilizada no segundo grupo. Um mililitro de cada solução / segmento foi aplicado durante o tempo de exposição de 60 s. Após a irrigação, a microdureza da dentina foi reavaliada e comparada com os valores de controle obtidos antes do tratamento de irrigação. Concluíram então que a irrigação com H₂O₂/NaCl ou EDTA diminuiu a microdureza da dentina radicular, sendo a do EDTA maior redução.

DOGAN, et al, em 2001, avaliaram, in vitro, os efeitos do uso do EDTA, RC-Prep e NaOCl no conteúdo mineral da dentina radicular usando microanálise por espectrometria de dispersão de energia. Trinta e seis dentes humanos anteriores foram utilizados. Os espécimes de dentina foram polidos e divididos em seis grupos experimentais. Os dois primeiros grupos foram tratados com EDTA ou RC-Prep seguido de irrigação com NaOCl. Os grupos 3 a 5 foram tratados com EDTA, RC-Prep e NaOCl, respectivamente. O último grupo foi irrigado com solução salina como controle. Os níveis de cálcio, fósforo e magnésio foram medidos na dentina radicular após os tratamentos. Os resultados mostraram que (i) EDTA combinado com irrigação com NaOCl como irrigante final e NaOCl isolado alterou significativamente a relação cálcio / fósforo da dentina radicular ($p < 0,05$); e (ii) houve um aumento significativo no nível

de magnésio após o uso de agente quelante combinado com NaOCl ($p < 0,05$). Concluiu-se que o uso do NaOCl como irrigação final alterou a eficácia dos agentes quelantes na dentina radicular.

FERRAZ, et al, em 2001, avaliaram o gel de gluconato de clorexidina como irrigante endodôntico. Primeiramente foi investigada a habilidade do gel de clorexidina em desinfetar canais radiculares *in vitro* com *Enterococcus faecalis*. Um microscópio eletrônico de varredura também foi usado para avaliar sua capacidade de limpeza em comparação com irrigantes endodônticos comumente usados, como hipoclorito de sódio e gluconato de clorexidina líquido. Os resultados indicaram que o gel de clorexidina produziu uma superfície de canal radicular mais limpa e teve uma capacidade antimicrobiana comparável àquela obtida com as outras soluções testadas. Concluiu-se que o gluconato de clorexidina na forma de gel tem potencial para uso como irrigante endodôntico.

ÇALT, et al, em 2002, avaliaram os efeitos do EDTA na remoção da smear layer e na estrutura da dentina após 1 e 10 minutos de aplicação. Seis dentes unirradiculares extraídos foram instrumentados até lima nº 60. Os terços apicais e coronais de cada raiz foram removidos, deixando um terço médio de 5 mm que foi então cortado longitudinalmente em dois segmentos iguais. Utilizando 10 mL de solução de EDTA 17%, as metades pertencentes à mesma raiz foram irrigadas por 1 e 10 minutos, respectivamente. Todos os espécimes foram submetidos a irrigação com 10 mL de NaOCl a 5%. Então todos os espécimes foram preparados para avaliação de MEV. Os resultados mostraram que 1 minuto de irrigação com EDTA é eficaz na remoção da smear layer. No entanto, uma aplicação de 10 minutos de EDTA causou erosão dentinária excessiva peritubular e intertubular.

TORABINEJAD, et al, em 2002, avaliaram que há muitos anos que a instrumentação do canal radicular produz uma camada de smear que cobre as superfícies das paredes de canal preparadas. Esta camada contém substâncias inorgânicas e orgânicas, como fragmentos de processos odontoblásticos e detritos necróticos. Há uma falta de concordância quanto ao efeito da smear layer na qualidade da instrumentação e obturação, mas a própria smear layer pode estar infectada e proteger as bactérias dentro dos túbulos dentinários. Vários métodos foram usados para remover a camada de smear. Resultados conflitantes foram obtidos a partir de inúmeros estudos in vitro sobre a significância da presença ou a remoção da smear layer.

ARI, et al, em 2004, avaliaram o efeito do gluconato de clorexidina a 0,2% na microdureza e rugosidade da dentina do canal radicular em comparação com as soluções de irrigação amplamente utilizadas. Noventa dentes anteriores extraídos por razões periodontais foram utilizados. As coroas dos dentes foram removidas na Junção cimento-esmalte. As raízes foram separadas longitudinalmente em dois segmentos, incorporados em resina acrílica e polidos. Um total de 180 espécimes foram divididos em 6 grupos de 30 dentes aleatoriamente de acordo com a solução de irrigação utilizada: grupo 1: 5,25% de NaOCl durante 15 min; grupo 2: 2,5% de NaOCl durante 15 min; grupo 3: 3% de H₂O₂ durante 15 min; grupo 4: EDTA a 17% por 15 min; grupo 5: gluconato de clorexidina a 0,2% durante 15 min; e grupo 6: água destilada (controle). Concluíram então que todas as soluções de irrigação, exceto a clorexidina, diminuíram significativamente a microdureza da dentina do canal radicular.

ELDENIZ, et al, em 2005, avaliaram o efeito das soluções de ácido cítrico e EDTA sobre a microdureza e a rugosidade da dentina do

canal radicular humano. Quarenta e cinco dentes humanos seccionados longitudinalmente foram utilizados. Os espécimes foram divididos aleatoriamente em três grupos de 30 dentes cada um e foram tratados da seguinte forma: (a) um ácido cítrico de um molar (19%) durante 150 s seguido de NaOCl a 5,25%; (b) EDTA a 17% por 150 s e enxaguada com 5,25% de NaOCl; (c) lavou-se com água destilada e serviu como controle. Três grupos foram então divididos em dois subgrupos de 15 espécimes cada. Os espécimes, no primeiro subgrupo, foram submetidos ao teste de Vicker, enquanto o segundo subgrupo foi submetido a testes de rugosidade superficial. Concluíram então que houve diferenças significativas na microdureza entre os grupos de teste, sendo o grupo de ácido cítrico o menos difícil. Além disso, o ácido cítrico aumentou significativamente a rugosidade da superfície.

DE-DEUS, et al, em 2006, avaliaram o efeito das soluções de ácido cítrico, ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) e ácido etilenodiaminotetraacético mais Cetavlon (EDTAC) sobre a microdureza da dentina do canal radicular humano. Dezesesseis caninos humanos maxilares foram seccionados transversalmente na junção cimento-esmalte e as coroas foram descartadas. Posteriormente, cada raiz foi incorporada em um cilindro de resina epóxi e seu terço médio seccionado horizontalmente em fatias de 4 mm de espessura. As amostras foram divididas aleatoriamente em três grupos de acordo com o agente quelante empregado, da seguinte forma (n = 6): grupo 1: EDTA 17%, grupo 2: EDTAC 17% e grupo 3: ácido cítrico 10%. A microdureza de dentina foi então medida com uma carga de 50 g por 15 s. No início do experimento, foram obtidos valores de microdureza de referência para amostras sem gravidade (t = 0 min). As mesmas amostras foram então expostas a 50

microL da solução de quelante durante 1, 3 e 5 min. O teste t de Student ($P < 0,05$) foi usado para comparar resultados para diferentes tempos para cada quelador e diferentes quelantes para cada tempo. Concluíram então que a microdureza diminuiu com o aumento do tempo de aplicação de soluções de quelação. Não houve diferenças significativas entre microdureza inicial para os três grupos, bem como após 1 min de aplicação das substâncias. Após 3 min, EDTA produziu uma redução significativamente maior na microdureza. No entanto, não houve diferença significativa entre EDTA e EDTAC após 5 min. O ácido cítrico causou redução significativa na microdureza.

OLIVEIRA, et al, em 2007, avaliaram o efeito da clorexidina e hipoclorito de sódio na microdureza da dentina radicular. As raízes de trinta pré-molares foram instrumentadas até a lima #50 e irrigadas com soro fisiológico. Em seguida seccionaram as raízes transversalmente nos terços cervical, médio e apical e montaram em blocos de resina acrílica. Utilizou-se 1 mL de cada solução na luz do canal radicular por 15 minutos e aferiu-se a microdureza nas distâncias de 500 e 1000 da luz do canal radicular. Os resultados evidenciaram que a clorexidina e o NaOCl diminuíram a microdureza nas duas distâncias estudadas. Não houve diferença na redução da microdureza entre os três terços avaliados, independente da distância.

SAYIN, et al, em 2007, avaliaram o efeito do uso único e combinado de EDTA, EGTA, EDTA + Cetavlon (EDTAC) tetraciclina-HCl e NaOCl sobre a microdureza da dentina do canal radicular. Trinta coroas de dentes humanos foram descartadas na junção de cimento-esmalte e as raízes foram divididas longitudinalmente ($n = 60$). Os espécimes foram incorporados na resina acrílica autopolimerizadora,

deixando a dentina do canal radicular exposta. As superfícies dentinárias foram preparadas para teste de microdureza por moagem e polimento. Os valores de microdureza de referência de espécimes não tratados foram registrados usando um testador de microdureza de Vicker nos níveis apical, de base e cervical do canal radicular. Posteriormente, os espécimes trataram com versões simples (solução de teste apenas) ou combinadas (solução de teste, seguida de 2,5% de NaOCl) dos irrigantes por 5 minutos. Os valores de microdureza pós-tratamento foram obtidos como os iniciais. As comparações estatísticas entre os grupos de teste e entre tratamentos simples e combinados foram realizadas utilizando ANOVA de 2 vias com medidas repetidas ($p = 0,05$). As comparações dentro de cada grupo em relação às regiões de aplicação foram feitas com a análise de variância não paramétrica de Friedman com o mesmo nível de significância. Concluíram que o EDTA sozinho ou anterior ao NaOCl resultou na diminuição máxima da microdureza dentinária. O efeito de amaciamento do tratamento subsequente com NaOCl foi dependente do material e da região. No entanto, para os regimes de tratamento combinados, o uso subsequente de níveis de NaOCl as diferenças estatísticas entre os valores de microdureza regional obtidos após o tratamento com EGTA, EDTAC e tetraciclina-HCl.

SHAHRAVAN, et al, em 2007, determinaram se a remoção da smear layer reduz o vazamento de dentes humanos obturados in vitro. PubMed foi pesquisado por artigos publicados entre 1975 e 2005, e os resultados foram categorizados com base no método de teste de vazamento. Entre 26 artigos elegíveis com 65 comparações, 53,8% das comparações não relataram diferença significativa, 41,5% relataram diferença em favor da remoção da smear layer e 4,7% relataram diferença

em favor de mantê-la; as diferenças foram significativas ($p < 0,001$). Das 65 comparações, 44 usaram o teste de vazamento de corante para avaliação. O efeito combinado nesse grupo mostrou que a remoção da smear layer diminui o vazamento de corante (escore $z = 0,37$, $z = 2,31$, $p = 0,021$). De acordo com a meta-regressão, o tipo de obturação, o local e a duração do teste, o selante e o corante e o ano de publicação não tiveram efeito sobre os resultados. Nas condições destes estudos de vazamento in vitro, conclui-se que a remoção da smear layer melhora a vedação estanque ao sistema de canais radiculares, enquanto outros fatores, como a técnica de obturação ou o selante, não produzem efeitos significativos.

PEREZ-HEREDIA, et al, em 2008, avaliaram e compararam in vitro o efeito descalcificador de 15% de EDTA, 15% de ácido cítrico, 5% de ácido fosfórico e 2,5% de hipoclorito de sódio na dentina de canal radicular. Dois cortes com 2 mm de espessura foram cortados do terço coronal da raiz de 10 incisivos humanos. Cada fatia foi dividida em duas partes iguais. Os espécimes foram distribuídos em um dos quatro grupos ($n = 10$) para imersão em 20 mL de EDTA a 15%, ácido cítrico a 15%, ácido fosfórico a 5% ou NaOCl a 2,5%, por três períodos de tempo (5, 10 e 15 min). A concentração de Ca (2+) extraído da dentina foi medida por espectrofotometria de absorção atômica. A quantidade de cálcio extraído foi analisada usando o teste de Kruskal-Wallis para comparações globais e o teste U de Mann-Whitney para comparações pareadas. Nos três períodos de tempo, 15% de EDTA e 15% de ácido cítrico extraíram a maior quantidade de cálcio, sem diferenças significativas entre eles. A solução de NaOCl a 2,5% extraiu quantidades insignificantes de cálcio, enquanto o EDTA a 15% extraiu 86,72% do cálcio nos primeiros 5 min e 15% de ácido cítrico e 5% de ácido fosfórico com padrão similar de

remoção de cálcio (77,03% e 67,08% nos primeiros 5 min, respectivamente). Soluções de EDTA a 15%, ácido cítrico a 15% e ácido fosfórico a 5% descalcificam a dentina radicular, com a maior parte do cálcio extraído durante os primeiros 5 min de ação. A eficácia das soluções a 15% de ácido cítrico e 15% de EDTA foi significativamente maior do que a de 5% de solução de ácido fosfórico em cada período de tempo (5, 10 e 15 min).

SAGHIRI, et al, em 2009, avaliaram a relação da microdureza e a erosão após irrigação com diferentes tipos de irrigantes de canal. Setenta e dois dentes pré-molares humanos de canal único foram selecionados e ampliados por limas rotatórias da Protaper. A parte do meio de cada raiz foi seccionada transversalmente para uma fatia de 4 mm. Os valores iniciais de microdureza de espécimes intactos foram medidos a profundidades de 100 microm e 500 microm da interface polpa-dentina usando um testador de microdureza Vickers. Os espécimes foram divididos em 6 grupos de 12 espécimes e foram tratados da seguinte forma: 1: 2,2% de NaOCl, 2: 17% de EDTA (5 minutos) e 2,6% de NaOCl (5 minutos), 3: 17% de EDTA (1 minuto) então 2,2% de NaOCl (1 minuto), 4: MTAD (5 minutos), 5: 2% de Clorexidina (5 minutos) e 6: solução salina (controle), respectivamente. Os valores de microdureza pós-tratamento foram obtidos da mesma maneira que os iniciais. Posteriormente, os espécimes foram preparados para análise de microscopia eletrônica de varredura. A quantidade de erosão da dentina foi examinada. Concluíram que o grupo 2 mostrou o efeito mais erosivo na dentina ($P < .0001$), juntamente com a menor diminuição da microdureza da dentina em profundidade de 100 microm, enquanto que o

MTAD mostrou maior redução na microdureza da dentina e efeito menos erosivo na dentina.

DAI, et al., em 2011 examinaram a capacidade de duas versões da solução irrigante QMix, comparando a remoção da Smear Layer da parede do canal e de detritos utilizando um projeto de canal aberto. Os canais foram irrigados com NaOCl (hipoclorito de sódio), que foi utilizado como irrigante inicial, e foi dividido em 5 grupos os irrigantes finais: [1] QMix I (pH = 8), [2] QMix II (pH = 7,5), [3] água destilada, [4] EDTA 17%, [5] BioPure MDTA. Os espécimes foram analisados por microscopia eletrônica de varredura, nos terços coronário, médio e apical. Os escores da remoção da smear layer, considerando o canal geral, foram observadas diferenças entre grupos, exceto grupo 1 versus 4 e os grupos 2 versus 4, após ajuste dos níveis do canal, houve diferença significativa de um grupo para outro, exceto dos grupos 2 versus 5. Para a remoção de detritos, não foi analisada diferença significativa entre os grupos. Concluiu-se então que as duas versões de QMix são tão efetivas como EDTA 17% na remoção da smear layer da parede do canal.

DE-DEUS, et al, em 2011, testaram o efeito de uma concentração não-cáustica de ácido peracético (PAA) em um modelo padronizado de smear layer. A cinética de dissolução da smear layer de PAA a 0,5% na dentina humana foi comparada com a de 2,25% de PAA e 17% de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). Discos dentais coronais foram preparados a partir de seis molares superiores humanos. Uma camada de smear padronizada foi produzida no lado pulpar de cada disco. A superfície coberta por smear layer foi dividida em três áreas similares e depois exposta a uma das três soluções testadas. Sequências de imagem de "co-site" (em torno de 40, 500 ×) das áreas específicas foram obtidas

após quatro tempos cumulativos de desmineralização (15, 30, 60 e 180 s). Uma sequência de processamento e análise de imagens mediu conjuntos de imagens, fornecendo dados da fração de área (AF, área livre de dentina em% da área de análise total). Concluiu-se que após 60 s de contato, a solução de PAA a 0,5% dissolveu a camada de smear, assim como 2,25% de PAA e 17% de EDTA.

CRUZ-FILHO, et al, em 2011, avaliaram o efeito de diferentes soluções de quelação sobre a microdureza da camada de dentina mais superficial do lúmen do canal radicular. Foram instrumentos trinta e cinco incisivos centrais maxilares de canal simples extraídos e as raízes foram seccionadas longitudinalmente em uma direção mesiodistal para expor a extensão do canal inteiro. Os espécimes foram distribuídos em sete grupos de acordo com a irrigação final: 15% de EDTA, 10% de ácido cítrico, 5% de ácido málico, 5% de ácido acético, vinagre de maçã, 10% de citrato de sódio e controle (sem irrigação). Um volume padronizado de 50 µL de cada solução quelante foi utilizado durante 5 minutos. A microdureza dentinária foi medida com um indentador de Knoop sob uma carga de 10 g e um tempo de permanência de 15 segundos. Os dados foram analisados estatisticamente por análise de variância unidirecional e teste de comparação múltipla de Tukey-Kramer com nível de significância de 5%. Concluíram que o EDTA e o ácido cítrico tiveram o maior efeito geral, causando uma diminuição acentuada da microdureza da dentina sem diferença significativa ($p > 0,05$) umas das outras. No entanto, ambos os quelantes diferiram significativamente das outras soluções ($p < 0,001$). Citrato de sódio e água desionizada foram semelhantes entre si ($p > 0,05$) e não afetaram a microdureza da dentina. O vinagre de maçã, ácido acético

e ácido málico foram semelhantes entre si ($p > 0,05$) e apresentaram resultados intermediários.

STOJICIC, et al., em 2012, avaliaram através de um modelo experimental laboratorial a substância irrigadora QMix contra o *Enterococcus faecalis*, placa mista bacteriana em fase planctônica e placa de biofilme. Além disso, examinaram a sua habilidade em remover smear layer. Para fazerem esse estudo, os *Enterococcus faecalis* e a placa mista bacteriana foram expostas ao QMix, junto com CHX 2%, MTAD e NaOCl 1% durante 3 segundos, 30 segundos e 3 minutos. Após exposição, amostras foram tiradas, e a partir delas, foram feitas diluições em série e análises de crescimento aeróbico e anaeróbico em placas de ágar de soja tríptico (TSA) ou em placas de ágar de sangue durante 24 e 72 horas. *Enterococcus faecalis* e as placas com biofilmes, foram cultivados por 3 semanas em discos de colágenos revestidos por hidroxiapatita ou dentina e foram expostos durante 1 minuto e 3 minutos por QMix, CHX 2%, MTAD e NaOCl 1% e 2%. Blocos de dentina foram expostos ao QMix e EDTA 5% durante 5 minutos. Obtiveram como resultado que o QMix e NaOCl 1% mataram todos os planctônicos *Enterococcus faecalis* e bactérias da placa em 5 segundos, enquanto a CHX 2% e MTAD foram incapazes de matar todas as bactérias da placa em 30 segundos. QMix e EDTA removeram igualmente bem a smear layer. Concluíram então, que o QMix e NaOCl mataram mais *Enterococcus faecalis*, bactérias da placa em fase planctônica e placa de biofilme que o CHX e MTAD, e que a capacidade de remover smear layer do QMix foi parecida com a do EDTA.

ASLANTAS, et al, avaliaram os efeitos de irrigantes de canal radicular na microdureza da dentina no canal radicular na presença e ausência de agentes modificadores de superfície. Quarenta e oito metades

da raiz foram preparadas por divisão longitudinal das raízes distais de 24 terceiros molares humanos mandibulares recém-extraídos e fixadas em resina acrílica auto-polimerizante, deixando a superfície dentinária exposta. Após o polimento, os valores de microdureza das superfícies dentinárias não tratadas foram registrados usando o testador Vickers no nível da raiz média. As metades da raiz foram divididas aleatoriamente em 6 grupos compostos de 8 amostras cada e tratadas por 5 minutos com um dos seguintes irrigantes: 17% EDTA, REDTA, 2% de gluconato de clorexidina (CHX), 2% de CHX com modificadores de superfície (CHX-Plus), NaOCl a 6% ou NaOCl a 6% com modificadores de superfície (Chlor-XTRA). Após o tratamento superficial, os valores de microdureza dentinária foram registrados nas proximidades das áreas iniciais de endentação. EDTA, REDTA, NaOCl e Chlor-XTRA diminuíram significativamente a microdureza da dentina radicular em comparação com controles intactos ($p < 0,05$). Concluíram, então, que a adição de modificadores de superfície aos irrigantes não afetou a microdureza das amostras.

TANEJA, et al, em 2014, avaliaram os efeitos dos agentes quelantes sobre a perda de cálcio e a microdureza da dentina radicular. Foram selecionados dez pré-molares inferiores simples. Os dentes foram seccionados e secções transversais espessas de 2 mm foram obtidas a partir do terço coronal da raiz. Cada seção foi então dividida em quatro quartos, sendo cada parte constituindo uma amostra do mesmo dente para cada grupo. Os grupos de tratamento foram: Grupo 1 (Controle): 5% de hipoclorito de sódio (NaOCl) durante 5 minutos + água destilada durante 5 min; Grupo 2: NaOCl a 5% durante 5 minutos + EDTA 17% durante 5 min; Grupo 3: 5% de NaOCl durante 5 min + 2,25% de ácido peracético

(PAA) durante 5 min e Grupo 4: NaOCl a 5% durante 5 min + QMix durante 5 min, respectivamente. A perda de cálcio das amostras foi avaliada utilizando o Espectrofotômetro de Absorção Atômica seguida da determinação da sua microdureza usando o Vickers Hardness Tester. Os dados foram analisados utilizando ANOVA unidirecional, teste Post hoc Tukey e correlação de Pearson. Concluíram então, que a irrigação com NaOCl + 2,25% de PAA causou a perda máxima de cálcio da dentina radicular e uma microdureza reduzida. Existe uma correlação negativa entre a perda de cálcio e redução na microdureza da dentina radicular.

KURUVILLA, et al, em 2015, avaliaram e compararam a eficácia do EDTA 17%, 18% de ácido etidrônico e 7% de ácido maleico na remoção da smear layer por meio de análise por microscopia eletrônica de varredura. Trinta pré-molares mandibulares recém-extraídos foram utilizados. Os dentes foram seccionados para obter comprimento de trabalho de 17mm e instrumentação até 40 tamanhos (lima K) com irrigação com NaOCl a 2,5% entre cada lima. As amostras foram divididas em Grupos I (ácido etilenodiaminotetracético a 17% (EDTA)), II (ácido etidrônico a 18%) e III (ácido maleico a 7%) contendo 10 amostras cada. Seccionamento longitudinal das amostras foi feito. Em seguida, as amostras foram observadas em microscópio eletrônico de varredura (MEV) nos níveis apical, médio e coronal. As imagens foram pontuadas de acordo com os critérios: 1. Sem camada de smear, 2. smear layer moderada e 3 smear layer pesada. Todos os três irrigantes experimentais removeram a smear layer dos diferentes níveis dentais (coronal, médio e apical). A irrigação final com 7% de ácido maleico foi mais eficiente que 17% de EDTA e 18% de ácido etidrônico na remoção da smear layer do terço apical do canal radicular.

TUNCER, et al, avaliaram, em 2015 os efeitos do QMIX, EDTA + Clorexidina, EDTA + ácido clorídrico e ácido maleico sobre a microdureza da dentina do canal radicular. Quarenta caninos superiores, recém extraídos, foram seccionados longitudinalmente em 80 segmentos e depois incorporados em uma resina acrílica ultra- polimerizável. A microdureza da dentina na amostra foi medida com um indentador de diamante Vickers nos terços coronais, médios e apicais das raízes. Finalmente, os espécimes foram divididos aleatoriamente em quatro grupos: 17% de EDTA + 2,5% de NaOCl; 17% de EDTA + 2% de CHX; QMix; e 7% de ácido maleico. Os valores de microdureza pós-tratamento foram obtidos e a diminuição da microdureza foi calculada como uma porcentagem. Os valores de microdureza foram analisados estatisticamente usando os testes U de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. Concluíram então, que o ácido maleico diminui a microdureza em todas as regiões, em comparação aos demais. Enquanto o QMix, EDTA 17% + CHX 2% e EDTA 17% + NaOCl 2,5% causaram a mesma redução na microdureza da dentina do canal radicular nas regiões coronais e médias.

BALDASSO, et al, avaliaram, em 2017, o efeito dos protocolos de irrigação final sobre a redução da microdureza e erosão da dentina do canal radicular. Foram utilizados 60 canais radiculares de incisivos mandibulares, instrumentados e divididos em 6 grupos aleatoriamente de acordo com o irrigante utilizado: QMiX, 17% de EDTA, 10% de ácido cítrico (CA), 1% de ácido peracético (PA), 2,5% de NaOCl (controle da solução) e água destilada (controle negativo). As soluções de quelação foram utilizadas para irrigar o canal seguido de 2,5% de NaOCl como queda final. Concluíram então que o QMIX e o EDTA 17% reduziram a

microdureza dentinária em maior profundidade. Porém o QMIX não causou erosão dentinária.

RAPGAY, et al, avaliaram, em 2018, e compararam o efeito do QMIX, óleo de melaleuca, tamaridus indica, extrato de chá verde e EDTA 17% na microdureza da dentina radicular. Sessenta pré-molares humanos recém extraídos de raiz única foram seccionados e divididos em seis grupos e submetidos a vários tratamentos. Cada grupo foi imerso em suas soluções por 5 minutos e depois submetido a Teste de microdureza Vickers. A redução máxima na microdureza foi observada no grupo EDTA, seguido pelos grupos Qmix e Tamarindus indica. Grupos de óleo de melaleuca e de chá verde não apresentaram redução significativa na microdureza. A menor redução foi vista no controle grupo salino. Concluiu-se que o EDTA induziu redução máxima na microdureza da dentina radicular, seguida por Qmix e Tamarindus indica. Houve nenhuma redução significativa por chá verde, óleo de melaleuca e solução salina ($p > 0,05$) Tamarindus indica causou redução significativamente menor do que EDTA ($p < 0,001$).

3. PROPOSIÇÃO

3.1 OBJETIVO GERAL:

3.1.1 Avaliar, in vitro, a citotoxicidade do ácido glicólico e sua influência na microdureza da dentina radicular.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

3.2.1. Avaliar, in vitro, a citotoxicidade do ácido glicólico em diferentes concentrações, em um modelo de cultura de linfócitos humanos.

3.2.2. Avaliar, in vitro, a microdureza da dentina radicular, submetida a tratamento com diferentes concentrações de ácido glicólico por meio da leitura com microdurômetro .

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi submetido à apreciação do comitê de ética e pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de Passo Fundo. O paciente doador de sangue foi protegido pela resolução 466/2012.

4.1 Avaliação da citotoxicidade

Obtenção de doadores voluntários de sangue para a cultura primária de linfócitos.

Para esse estudo, *in vitro*, foi realizada a cultura de linfócitos humanos a partir de 1 doador de sangue saudável da Faculdade de Odontologia da Universidade de Passo Fundo. O doador foi informado sobre o projeto, concordou em fazer parte do estudo e preencheu um termo de consentimento livre e esclarecido. Este projeto apresentou risco mínimo, riscos estes que são inerentes ao processo de coleta de sangue, como desconforto, irritabilidade e reações de hipersensibilidade da pele, formação de êmbolos ou hemorragia, porém para minimizar tais riscos a coleta foi realizada por profissional apto e com experiência. O pesquisador orientou o paciente sobre medidas preventivas para evitar ou minimizar tais desconfortos e no caso de acontecimento dessas reações adversas, orientou maneiras de manejo (utilização de compressas, não pressionar o

braço, não realizar exercício físico no dia da coleta de sangue). Foi realizado um questionário de saúde para selecionar os doadores, se em algum momento o paciente se sentisse constrangido e quisesse abandonar o questionário, ele estaria livre para isso e seria excluído da pesquisa, previamente a coleta para cultura foi realizado exames de sangue de rotina para confirmar o bom estado de saúde geral, se o paciente apresentasse alguma alteração de saúde seria instruído a procurar seu médico clínico geral e seria excluído da pesquisa, o mesmo teria direito de pedir acesso aos resultados dos exames realizados, os resultados das análises foram entregues somente ao paciente ou a pessoa previamente autorizada. O Paciente não exposto a agentes carcinogênicos como álcool e fumo, bem como não fazendo uso de medicamentos sistêmicos de uso contínuo, foram incluídos na amostra, a pesquisa não apresentou riscos para o paciente e ele não teve benefícios nenhum.

Foi utilizado material estéril e descartável, aberto na frente do voluntário. Foi coletado 5ml de sangue em seringa heparinizada (figura 1) e utilizado para a realização da cultura logo após a coleta para evitar interferências do meio.



Figura 1 – heparina , seringa heparinizada realizando a coleta, e seringa preenchida com 5ml de sangue

Cultura primária de linfócitos

Foi realizado dois ensaios para avaliação da citotoxicidade, diferindo no tempo de exposição dos linfócitos aos irrigantes. Para realização da cultura, os linfócitos foram lançados (20 gotas de sangue) (figura 4 e 5) em meio próprio para cariótipo (Cultilab – Brasil) (figura 2 e 3) e contendo fito-hemaglutinina para estimular mitoses. Serão incubados a 37°C por um tempo total de 72 horas em estufa de CO₂ (figura 6 e 7) (MALUF *et al.*, 2011; MOORHEAD *et al.*, 1960). O desenho experimental de cada ensaio encontra-se representado no fluxograma 1 e 2.

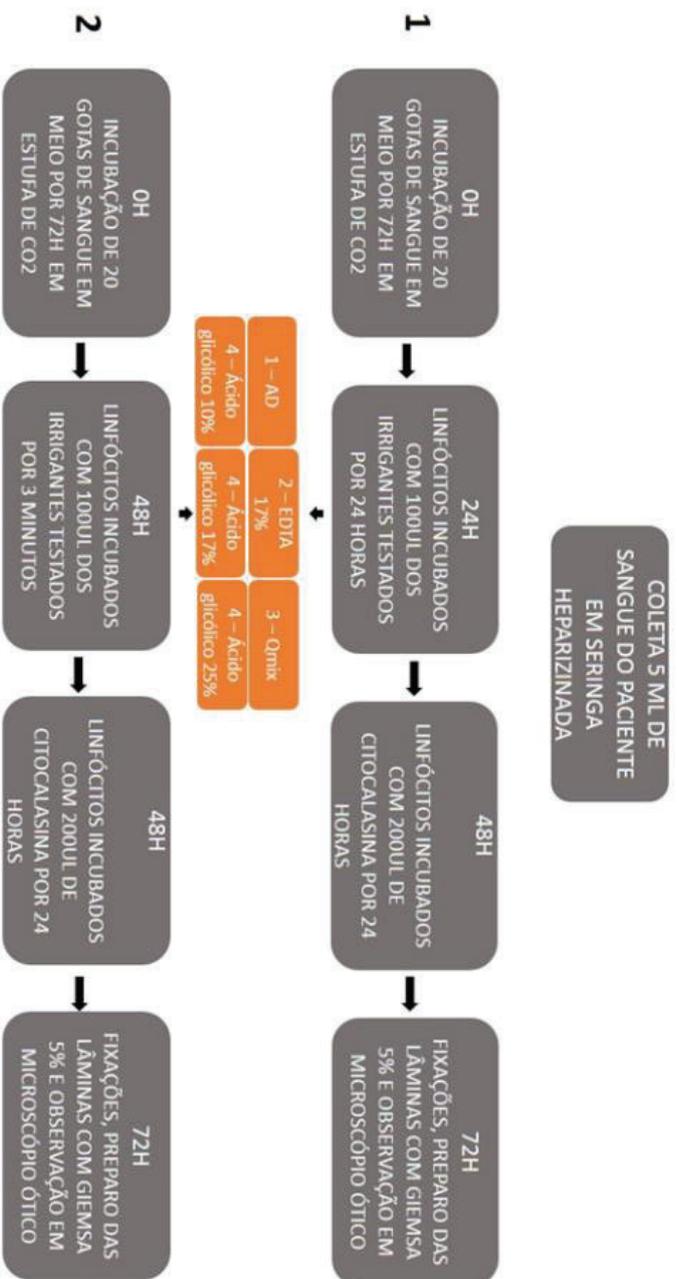




Figura 2 e 3 – meio próprio para cariótipo

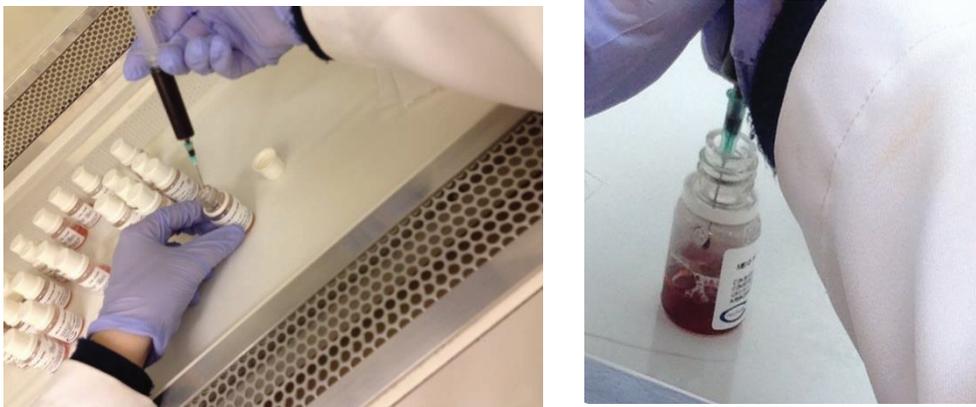


Figura 4 e 5 – 20 gotas de sangue no meio próprio para cariótipo



Figura 6 e 7 – amostras em estufa de CO2

Exposição aos irrigantes finais

Foi realizado após 48 horas e após 24 horas de cultura (fluxograma 1 e 2), os irrigantes finais testados foram incubados (figura 8 e 9), na quantidade de 100ul, individualmente, à cultura de linfócitos, havendo duas culturas de linfócitos para cada um dos irrigantes finais testados, conforme a seguinte distribuição:

G1- água destilada (controle negativo);

G2 – EDTA 17%;

G3 – Qmix;

G4 – ácido glicólico 10%;

G5 - ácido glicólico 17%;

G6 – ácido glicólico 25%.

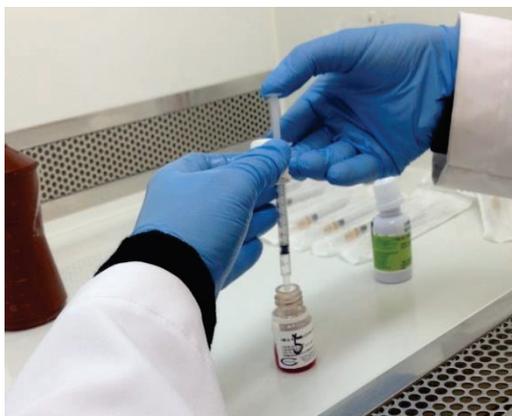


Figura 8 e 9 – exposição aos irrigantes finais.

Técnica de avaliação da citotoxicidade

Após 24 horas de contato com os irrigantes finais testados e 48 horas de cultura, os linfócitos foram incubados com citocalasina-B (CtB) na quantidade de 200ul , a uma concentração final de 6 ug/ml (20ug/ml), reagindo por mais 24 horas (LEE, *et al.*, 1999; FENECH, *et al.*, 2000), para representar a realidade clínica do uso dos irrigantes em endodontia, foi feito um segundo ensaio onde teve o contato com a cultura de linfócitos por 3 minutos.

Ao final do período de incubação (72 horas) foi adicionado o fixador metanol-ácido acético (3:1) (figura 10 e 11), deixando 5 minutos a temperatura ambiente para interromper a cultura. As células foram centrifugadas por 10 minutos a 1000 rpm (figura 12 e 13) e o sobrenadante será removido (figura 14) e para confecção de lamina para detecção dos micronúcleos foi utilizado o pelet. (FICANHA, *et al.*,2017).

As células foram fixadas e gotejadas sobre laminas limpas (figura 15 e 16), secas ao ar e coradas com Giemsa 5% por 7 minutos. Todas as laminas foram observadas em microscópio óptico.

Para avaliação da citotoxicidade, no primeiro ensaio ocorreu a morte celular em todos os tratamentos, exceto no grupo foi realizado a contagem de células totais presente da lamina (figura 17), e foi contabilizado a quantidade de células vivas que apresentavam núcleo sem deformação e citoplasma integro, e células mortas, e desse valor foi realizado uma média em porcentagem, para ver qual irrigante se apresentaria mais citotóxico às células de linfócitos. Em cada grupo de tratamento foi confeccionado 4 lâminas,afim de garantir uma maior confiabilidade dos resultados.

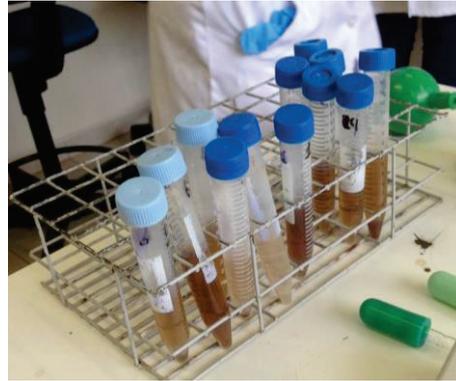


Figura 10 e 11 – adição de 3:1 por 5 minutos nas culturas



Figura 12 e 13 – centrifugação das células



Figura 14 – remoção do sobrenadante

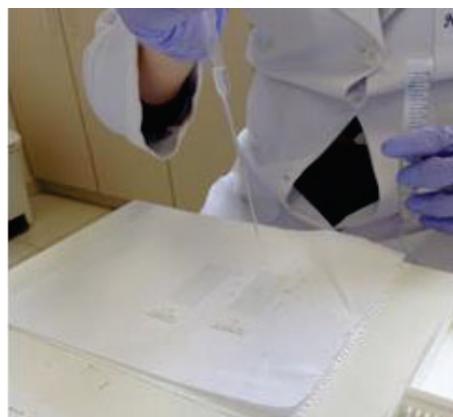


Figura 15 e 16 – células gotejadas em lâminas limpas

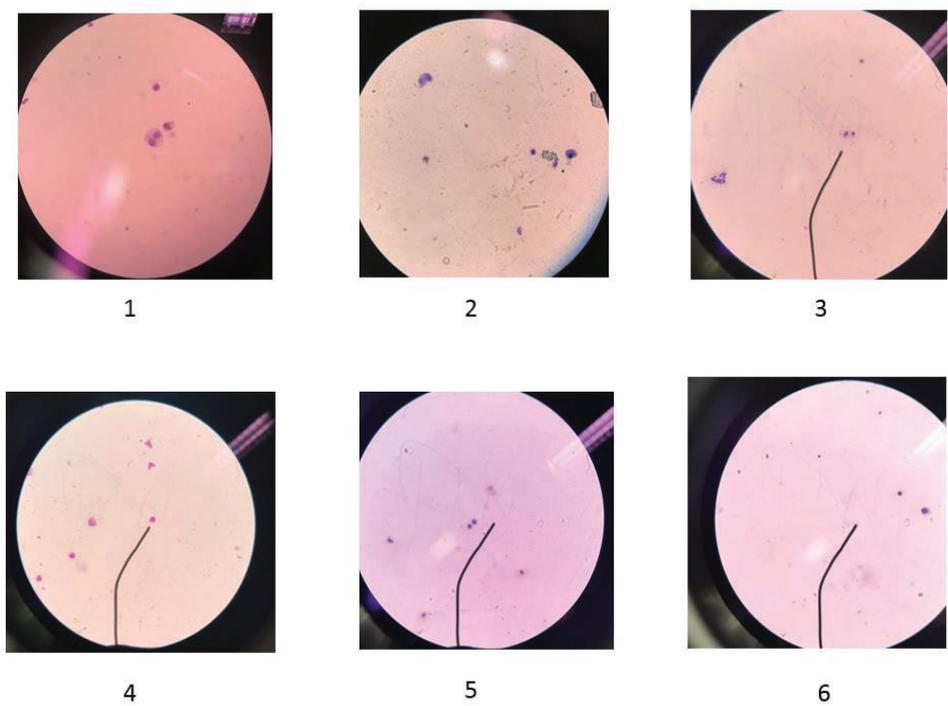


Figura 17 – células presentes na lâminas.

4.2. Avaliação da Microdureza

Obtenção e preparo das amostras

Trinta dentes unirradiculares humanos extraídos foram obtidos junto ao Biobanco da Faculdade de Odontologia da Universidade de Passo Fundo e utilizados para esta avaliação (Figura 18).



Figura 18 – Dentes humanos unirradiculares extraídos.

A porção coronária foi seccionada na junção amelocementária (Figura 19) e dois sulcos longitudinais (Figura 20) foram confeccionados nas faces vestibular e lingual, em toda a extensão do remanescente radicular, utilizando disco de diamante. As raízes foram clivadas em duas metades com o auxílio de uma lâmina de micrótomo e um martelo (Figura 21), provendo duas amostras de cada raiz, totalizando 30 amostras (Figura 22).

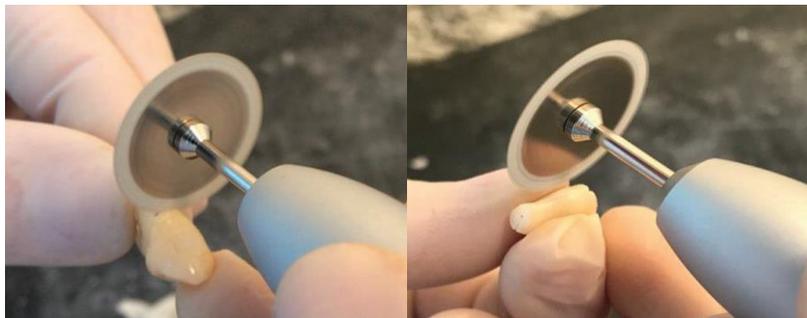


Figura 19 - Corte na junção amelocementária.

Figura 20 – Confeção de sulcos longitudinais.



Figura 21 – Clivagem das raízes.



Figura 22 – Duas amostras de cada raiz.

As amostras foram fixadas em resina acrílica (Figura 23), deixando a porção dentinária exposta para cima (Figura 24). Na sequência, as amostras foram lixadas com lixas abrasivas de papel (granulação 180, 320 e 600) sob constante refrigeração com água destilada, promovendo o nivelamento da amostra dentinária até chegar na luz do canal (Figuras 25,26 e 27). As amostras foram colocadas em recipientes plásticos contendo água destilada, de forma que ficassem totalmente cobertas (Figura 28). As amostras foram, então, inseridas em cuba ultrassônica (Figura 29), onde foi realizado um ciclo de lavagem pelo período de 1 minuto (Figura 30) para remoção de detritos decorrentes da confecção das amostras. Por fim, as amostras foram secas com cânula de aspiração (Figura 31).



Figura 23 – Amostras fixadas em resina acrílica autopolimerizável.

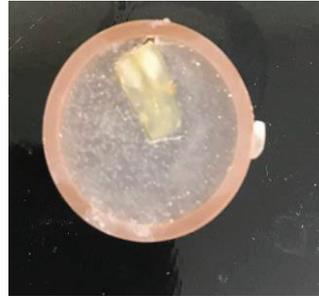


Figura 24 – Porção dentinária exposta para cima.



Figuras 25,26 e 27 – Amostras sendo lixadas com lixas abrasivas na sequência de granulação 180, 320 e 600.



Figura 28 - Amostras em recipiente plástico cobertas por água destilada.



Figura 29- Cuba ultrassônica.



Figura 30 – Ciclo de lavagem na cuba ultrassônica.



Figura 31– Secagem com cânulas de aspiração.

Determinação da microdureza

A microdureza da dentina radicular foi inicialmente mensurada utilizando um microdurômetro Vickers (Figura 32) (Emco Test, Kuchl, Austria), em uma magnificação de 250x, profundidade de 300 μm , carga de 300 g e um tempo de permanência de 20 segundos do dispositivo. Em cada amostra, três endentações foram realizadas conforme descrito por Cruz-Filho *et al.*, em 2011. (Figura 33) A primeira endentação feita a uma distância de 1.000 μm da entrada do canal radicular, e duas outras endentações foram feitas a uma distância de 200 μm uma da outra (Figura 34). O valor de microdureza representativo de cada amostra foi obtido por meio da média dos valores de microdureza obtidos de cada endentação, antes da imersão nos irrigantes finais testados.



Figura 32 - Microdurômetro Vickers.

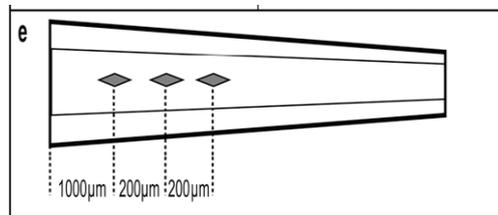


Figura 33 – Ilustração das endentações realizadas no canal radicular. (Cruz-Filho *et al.*,2011).

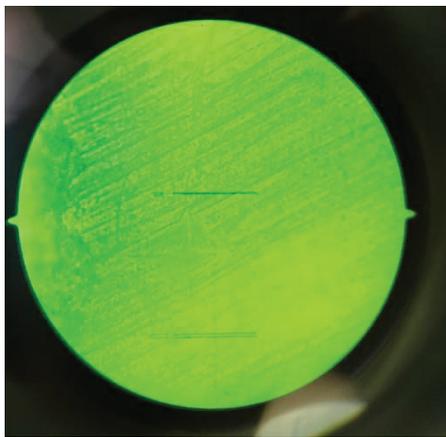


Figura 34 – Imagem da endentação realizada pelo microdurômetro Vickers.

Classificação dos grupos de tratamento

As 60 amostras foram divididas, aleatoriamente, em 6 grupos (n=10), de acordo com os protocolos de irrigação final utilizados para a remoção de *smear layer*, como segue: G1- água destilada (Figura 35); G2- EDTA 17% (Figura 36); G3- QMix (Figura 37); G4- Ácido glicólico 10% (Figura 38); G5- Ácido glicólico 17%; G6- Ácido glicólico 25%. As amostras foram irrigadas com 5 ml dos irrigantes finais testados (Figura 39) e permaneceram em contato pelo período de 1 minuto (Figura 40).

Após a realização dos protocolos de imersão nos irrigantes finais testados, as amostras foram lavadas com 5 ml de água destilada (Figura 41) e secas com cânula de aspiração (Figura 42).

Na sequência, a microdureza da dentina radicular de cada amostra foi novamente determinada como descrito anteriormente, em locais próximos às endentações iniciais realizadas (Figura 43).



Figura 35 – Água destilada.

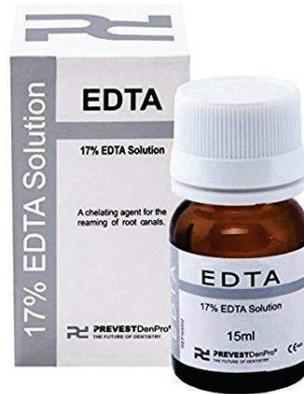


Figura 36 – EDTA 17%.



Figura 37 – QMIX.



Figura 38 – Ácido Glicólico.



Figura 39– Inserção de 5 mL de cada irrigante testado.



Figura 40 – Irrigante imerso por 1 minuto.



Figura 41 – Lavagem das amostras de com 5 mL de água destilada.



Figura 42 – Secagem com cânulas aspiração.

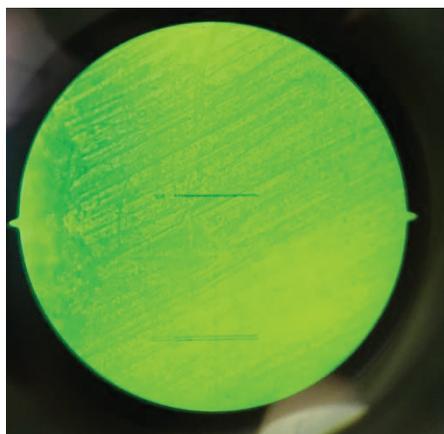


Figura 43 – Realização de nova endentação.

4.3 Análise estatística

Foi avaliado a normalidade dos grupos do teste de citotoxicidade através de Shapiro wilk test, em seguida realizado ANOVA seguido pelo *post-hoc* de Tukey com nível de significância de 5% para avaliar os diferentes valores de células mortas, no programa Bioestat 5.3.

A comparação percentual dos valores de microdureza da dentina radicular entre os grupos de irrigantes finais testados foi realizada por meio de ANOVA, com nível de significância de 5%. Os dados foram analisados utilizando o programa SPSS versão 17.0 (SPSS, Chicago, IL, Estados Unidos).

5. RESULTADOS

Os resultados de citotoxicidade, por meio da quantificação de células mortas, mostraram que todos os irrigantes finais foram diferentes estatisticamente quando comparados com o grupo controle, e os irrigantes Qmix e ácido glicólico foram diferentes estatisticamente dos demais grupos e semelhantes entre si ($p < 0.05$).

A média e o desvio padrão dos valores de citotoxicidade e microdureza estão apresentados na Tabela 1 e 2. Os resultados de microdureza demonstraram que todos os irrigantes finais testados mantiveram o mesmo nível de microdureza na dentina radicular, quando comparados ao grupo controle, sem diferença estatística entre eles ($p < 0,05$).

Tabela 1. Valores de células mortas em 3 minutos (média \pm desvio padrão) para cada um dos protocolos usados.

Grupo mortas	n	Valores de células
1. DW	2	0.0 ± 0^a
2. EDTA 17%	2	73.0 ± 9.89^b
3. Qmix	2	35.0 ± 4.24^c
4. Ácido Glicólico 10%	2	25.0 ± 4.24^c
5. Ácido Glicólico 17%	2	70.5 ± 6.63^d
6. Ácido Glicólico 25%	2	68.0 ± 2.82^d

* Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão. Diferentes letras representam uma diferença estatisticamente significante.

** DW= água destilada; EDTA= ácido etilenodiamino tetra-acético

Tabela 2. Valores de microdureza Vickers (média \pm desvio padrão) para cada um dos protocolos usados.

Grupo microdureza	n	Valores de
1. <i>DW</i>	10	39.33 \pm 3.18 ^a
2. <i>EDTA 17%</i>	10	39.28 \pm 4.56 ^a
3. <i>Qmix</i>	10	38.07 \pm 4.01 ^a
4. <i>Ácido Glicólico 10%</i>	10	35.62 \pm 3.47 ^a
5. <i>Ácido Glicólico 17%</i>	10	35.91 \pm 3.24 ^a
6. <i>Ácido Glicólico 25%</i>	10	35.98 \pm 3.38 ^a

6. DISCUSSÃO

O sucesso do tratamento endodôntico é principalmente dependente da limpeza, modelagem e desinfecção do sistema de canais radiculares (TANEJA et al., 2014). Não só eliminar a infecção dentro do sistema de canais, mas também prevenir a reinfecção. A eliminação de todos os detritos e bactérias é impossível devido à complexidade anatômica do sistema de canais radiculares. (TUNCER et al., 2015). Microorganismos são fatores potenciais para o desenvolvimento e progressão das alterações patológicas que acometem a polpa e os tecidos periapicais (KAKEHASHI

1965). Após a preparação biomecânica, uma camada irregular amorfa conhecida como "camada de smear" é formada nas paredes do canal radicular (TANEJA et al., 2015), composta por detritos orgânicos que adere a superfície dentinária (TORABINEJAD et al., 2002).

Como consequência, ocorre a obliteração dos túbulos dentinários, promovendo a redução da resistência de união do material obturador à dentina radicular e a redução da resistência à fratura do elemento dentário (SHAHRAVAN et al., 2007). Diante dessas razões, a camada de smear layer precisa ser removida por meio de protocolos de irrigação final. Agentes quelantes têm sido sugeridos para remoção da smear layer, bem como para desmineralização e amolecimento da dentina radicular. No entanto, a desmineralização pode influenciar negativamente a composição química e estrutural da dentina (BALDASSO et al., 2017). Embora uma redução da microdureza facilite a instrumentação em todo o canal radicular, pode também enfraquecer a estrutura da raiz (RAPGAY et al., 2018).

O tempo de ação dos protocolos finais de irrigação no interior dos canais tem sido uma variável questionável na literatura (DE-DEUS et al., 2011) limitou o tempo de contato de três soluções quelantes (EDTA, EDTAC e ácido cítrico) a 5 minutos, afirmando que essa duração é mais realista em termos de prática clínica. ARI et al., em 2004, promoveu a imersão das amostras nas substâncias testadas pelo período de 15 minutos. Ainda, YAMADA, et al., em 1983 promoveu a imersão das amostras por 1 minuto com EDTA 17% , alegando ser suficiente. O tempo de ação dos protocolos finais de irrigação foi estabelecido em 1 minuto no presente estudo. Este tempo foi baseado em um estudo prévio onde os resultados mostraram que, após 1 minuto de permanência no interior do canal

radicular, os protocolos finais de irrigação removeram significativamente a camada de smear layer, e não demonstraram melhora nos resultados após aumentar o tempo de permanência dos irrigantes finais no interior do canal radicular (YAMADA et al., 1983). Além disso, a permanência de irrigantes finais com propriedades quelantes por um período de tempo excessivo no interior dos canais radiculares pode ocasionar erosão da dentina peritubular e intertubular, promovendo danos às propriedades mecânicas e diminuindo a resistência à fratura da dentina radicular (ÇALT et al., 2002).

O estudo da microdureza dentinária é de fundamental importância quando se refere a Odontologia Restauradora, principalmente porque sua redução produz um efeito negativo sobre os componentes minerais da dentina, afetando a adesão e a capacidade de selamento de materiais dentários (DOGAN et al., 2001). Com o emprego de cimentos endodônticos resinosos, o conhecimento do assunto se torna fundamental também para a Endodontia. Também, estudos relatam que a redução da microdureza da camada mais superficial da dentina radicular é desejável durante a terapia endodôntica, uma vez que aumenta a penetração da substância química auxiliar no interior dos túbulos dentinários e facilita a instrumentação do canal radicular, especialmente nos casos de canais achatados e/ou calcificados e também aumenta a penetração da substância química auxiliar facilitando a instrumentação do canal radicular (Cruz-Filho et al., 2011; TAFFAREL *et al.*, 2018) Neste estudo em cada amostra foi realizada três endentações conforme descrito por Cruz-Filho et al., em 2011. A primeira endentação feita a uma distância de 1.000 µm da entrada do canal radicular, e duas outras endentações foram feitas a uma distância de 200 µm uma da outra. Estudos relataram que a microdureza da dentina

declinou quando testada de regiões superficiais a profundas. (SALEH et al., 1999). Assim como relatado por DE-DEUS et al.(2006) , os resultados deste estudo demonstraram que estatisticamente não houve diferença entre os grupos II (EDTA 17%) e III (Qmix). Isso pode ser explicado pelo tempo da exposição dos agentes irrigantes aos canais dentinários e as diversas formas de contato das soluções com a dentina. ARI et al., em 2004 mergulharam as amostras de dentina nas soluções testadas por 15 min, e Cruz-Filho et al. (2011) levaram as soluções diretamente sobre as amostras com micropipetas.

Embora alguns estudos sugiram menor sensibilidade da dureza Vickers às condições superficiais, comparado a dureza Knoop, (Cruz-Filho et al., 2011), este método tem amparo na literatura (Ari et al., 2004) quando a proposta é comparar a redução da microdureza dentinária superficial com áreas mais profundas. Por essa razão o Teste de Dureza Vickers foi selecionado para o estudo, devido praticidade e análise da mudança de superfície de tecidos duros dentais mais profundos , programado com força de 300 g por 20 s, perpendicular à edentação.

A água destilada foi utilizada inicialmente como solução irrigante para espécimes de microdureza, pois não tem efeito sobre a superfície dentinária, portanto, não é considerada como uma variável que pode afetar os resultados. Isto é seguido pela aplicação de soluções de irrigação endodôntica na superfície da dentina do canal radicular por 5 minutos, de acordo com o estudo anterior (DE-DEUS et al., 2011). Uma possível limitação do presente estudo é que os testes foram realizados em temperatura ambiente, diferente da temperatura corporal. Além disso, o volume do irrigante em um canal radicular clinicamente é muito pequeno

em comparação com a dentina radicular imersa nas soluções irrigadoras, como realizado.

A escolha do EDTA 17% como uma das soluções a serem avaliadas deu-se a comprovada capacidade desse agente quelante em reduzir a microdureza da dentina, tornando-se solução referencial nos estudos das soluções desmineralizantes (SALEH et al, 1999; ARI, et al., 2004; ELDENIZ, et al.; 2005.; DE-DEUS, et al.,2006; SAYIN, et al., 2007). O presente estudo revelou que o EDTA 17% e QMIX não obtiveram diferença estatística entre eles. Esse achado esta de acordo com Oliveira et al (2007).

O QMIX, por sua vez, contém EDTA 17%, clorexidina e um agente surfactante em sua composição (STOJICIC et al., 2012). O EDTA 17% possui como função promover a remoção de smear layer (PEREZ-HEREDIA et al., 2008), a clorexidina promover a ação antimicrobiana (FERRAZ et al., 2001) e o agente surfactante reduzir a tensão superficial, melhorando a molhabilidade e penetração do produto nas paredes do canal radicular (STOJICIC et al., 2012). O EDTA de forma isolada foi capazes de reduzir as propriedades mecânicas da dentina (SAGHIRI et al., 2009; CRUZ-FILHO et al., 2011). Assim, o uso combinado desses componentes no QMIX não fornece efeitos deletérios nas propriedades mecânicas da dentina radicular, possivelmente devido à menor concentração de cada componente.

O estudo de citotoxicidade dos irrigantes utilizados em endodontia se faz necessário para poder habilitar o uso clínico de novas substâncias, onde podemos citar o Ácido Glicólico, que vem como uma nova substância irrigadora dos canais radiculares, foi previamente testado no condicionamento ácido de substrato dentinário, utilizado como substituto

do ácido fosfórico, se mostrando efetivo no condicionamento e resistência de união semelhante ao ácido fosfórico. Em estudos mais recentes mostrou-se também com excelente capacidade de remoção de smear layer, mostrando seu potencial para ser utilizado como um irrigante endodôntico (CECCHIN et al.,2018; DAL BELLO et al., 2019).

O método para realizar o ensaio de genotoxicidade foi escolhido por esse modelo de linfócitos ser mais rápido e mais barato do que linhagem celular que é uma linha imortalizada, já a cultura de linfócitos com células sanguíneas é a célula como ela é no ser humano e não foi modificada, sendo o modelo mais aceito para ver dano no ciclo celular, apresentando então um efeito mais direto na célula, porém este é um sistema isolado, pois no paciente não é essa concentração que chega até as células, mas em estudos toxicológicos e in vitro é realizado dessa forma (PRICA et al., 2013; RAJIC et al., 2018)

Para avaliar a genotoxicidade através da presença de micronúcleos, foi realizado um primeiro ensaio (PRICA et al., 2013; RAJIC et al., 2018) onde os irrigantes finais permaneceram incubados durante um período de 24 horas com o meio de cultura, porém as substâncias se mostraram altamente citotóxicas, levando a morte celular de todas as células, e impossibilitando a quantificação dos micronúcleos e a avaliação da genotoxicidade. Entretanto, optou-se por representar a realidade de clínica, ou seja a permanência dos irrigantes finais em contato com o meio de cultura foi de 3 minutos, que é um dos protocolos utilizados durante a irrigação final do tratamento endodôntico (DE-DEUS et al.,2011), neste último ensaio também tivemos uma elevada citotoxicidade, então foi quantificado através da contagem de células totais, vivas e mortas , para avaliar então qual dos irrigantes utilizados teria apresentado uma maior

citotoxicidade. A água destilada foi utilizada como grupo controle negativo, por ser uma substância inerte e não seria capaz de causar dano as células.

O EDTA 17% como já relatado em muitos estudos na literatura se mostrou uma substância irrigadora altamente citotóxica , juntamente com o QMix, resultados estes que se assemelham ao estudo de FHARHAD em 2016, que comparou através do teste MTT a citotoxicidade de EDTA, MTAD, QMix e NaOCl , apresentando como material mais citotóxico o MTAD seguido de EDTA e QMix, e por último e sem nenhum potencial citotóxico o grupo controle solução salina estéril (KOLAOUZIDOU, et al.,1999; SERPER, et al, em 2001 ZHANG, et al., em 2003, MALHEIROS, et al, 2005; PRADO, et al, 2015; VOUZARA, et al., 2015; FHARHAD, et al.,2016.)

O QMIX causou morte celular, porem com um número menor de células mortas, possui em sua composição materiais já comprovados quanto a sua citotoxicidade que são eles, EDTA 17% e clorexidina 2% (STOJICIC et al., 2012;VOUZARA, et al., 2015) possuindo a capacidade de causar os mesmos danos causados por seus componentes, resultado este que se comprapõe através do estudo realizado por ALKAHTANI, et al, em 2014 que após um período de incubação de 2 e 4 horas pode concluir que as soluções de Qmix e NaOCl foram tóxicos e capazes de induzir a morte celular.

A nova substância para uso durante a irrigação final, ácido Glicólico , por sua vez, foi avaliada em 3 diferentes concentrações, que foram elas 10%,17% e 25%. As duas maiores concentrações obtiveram resultados estatisticamente semelhantes entre si e ao EDTA 17% e Qmix, em contrapartida o ácido glicólico na concentração de 10% foi o que

apresentou os melhores resultados, sendo a substância irrigadora que apresentou a menor capacidade de morte celular, o que coincide com o estudo de DAL BELLO, et al. de 2019 que após avaliar a citotoxicidade de ácido glicólico 5%,10% e 17% pode concluir também que o potencial citotóxico dessa substância é dose dependente.

7. CONCLUSÃO

Apesar das limitações do presente estudo, pode-se concluir que as soluções irrigantes testadas não apresentaram capacidade de modificar a microdureza da dentina radicular, e mesmo que utilizadas em pequena quantidade e em pequenos intervalos de tempo, nos testes realizados foram capazes de induzir a morte celular, possuindo então potencial citotóxico, e sendo dependente da dose.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHIR, B; PAREKH, V; KATYAYAN, MK; KATYAYAN, PA. Smear layer removal efficacy of different irrigating solutions: a comparative scanning electron microscope evaluation. *Indian Journal of Dentistry Research*. v.25, n.5, p.617-22, 2014.

ALKAHTANI, A.; ALKAHTANY, A.; MAHMOOD, A; ELSAFADI, M.; ALDAHMAH, A.; ANIL, S. Cytotoxicity of Qmix endodontic irrigating solution on human bone marrow mesenchymal stem cells. *BMC Oral Health*, v.14, n.27,p. 14- 27, 2014.

AMARAL, K.; ROGERO, M.; FOCK, R.; BORELLI, P.; GAVINI, G. Cytotoxicity analysis of EDTA and citric acid applied on murine resident macrophages culture. *International Endodontic Journal*, v.40, n.5, p. 338-343, 2007.

ARI, H.; ERDEMIR, A.; BELLI, S.; Evaluation of the effect of endodontic irrigation solutions on the microhardness and the roughness of the root canal dentin. *J Endod*, v.30, n.11, p.792-795, 2004.

ASHOFTEH, K.; SABETI, M.; MOTAHHARY, P.; KOLAHDOUZAN, A.; SHAYESTEH, M.; SHOKOUHINEJAD, N. Subcutaneous tissue responses to three endodontic irrigants: a

comparative study. *Iranian Endodontic Journal*, v.7, n.3, p. 144-148, 2012

ASLANTAS, E.E.; BUZOGLU, H.D.; ALTUNDASAR, E.; SERPER, A. Effect of EDTA, sodium hypochlorite, and chlorhexidine gluconate with or without surface modifiers on dentin microhardness. *J Endod*, v.40, n.6, p.876-879, 2014.

ASLANTAS, E.E.; BUZOGLU, H.D.; ALTUNDASAR, E.; SERPER, A. Effect of EDTA, sodium hypochlorite, and chlorhexidine gluconate with or without surface modifiers on dentin microhardness. *Journal Endodontics*. v. 40, n. 6, p. 876-879, 2014.

BALDASSO, F.; ROLETO, L.; SILVA, V.; MORGENTAL, R.; KOPPER, P. Effect of final irrigation protocols on microhardness reduction and erosion of root canal dentin. *Braz Oral Res*, v.31, n.40, p.1-8, 2017.

BALLAL, N.; RAO, B.; MALA, K.; BHAT, K.; RAO, B. Assessment of genotoxic effect of maleic acid and EDTA: a comparative in vitro experimental study. *Clinical Oral Investigations*, v.17, n.5, p. 1319-1327, 2013.

BERNSTEIN,E.F;LEE,J;BROWN,D.B;YU,R;VAN SCOTT,E. Glycolic acid treatment increases type I collagen mRNA and hyaluronic

acid content of human skin. *Dermatologic Surgery*, v.27,n.5,p.429-433,2001.

BOTTON G.; PIRES C.; CADONÁ F.; MACHADO A.; AZZOLIN V.; CRUZ I. ; SAGRILLO M.; PRAETZEL J. Toxicity of irrigating solutions and pharmacological associations used in pulpectomy of primary teeth. *International Endodontic Journal*, v.49, n.8, p. 746-754, 2016.

CALT S, SERPER A. Time-Dependent effects of EDTA on dentin structures, *J Endod*, v. 28, p. 17-9, 2002.

CECCHIN, D.; FARINA, A.P.; VIDAL, C.; BEDRAN-RUSSO, A.K. A Novel Enamel and Dentin Etching Protocol Using α -hydroxy Glycolic Acid: Surface Property, Etching Pattern, and Bond Strength Studies. *Operative Dentistry*, v.43, n.1, p.101-110, 2018.

CRUZ-FILHO A. M.; SOUSA-NETO, M. D.; SAVIOLI, R. N.; SILVA, R. G.; VANSAN, L. P.; PÉCORÁ, J. D. Effect of chelating solutions on the microhardness of root canal lumen dentin. *J Endod*, v.37, n.3, p.358-362, 2011.

DAI, L.; KHECHEN, K.; KHAN, S.; GILLEN, B.; LOUSHINE, B. A.; WIMMER, C. E.; et al.; The Effect of QMix, na Experimental Antibacterial Root Canal Irrigant, on Removal of Canal Wall Smear Layer and Debris. *J Endod*, v.37, n.1, p.80-84, 2011.

DAL BELLO, Y.; PORSCH, H.F.; FARINA, A.P.; SOUZA, M.A.; DA SILVA, E.J.N.L.; BEDRAN-RUSSO, A.K.; CECCHIN, D. Glycolic acid as the final irrigant in endodontics: Mechanical and citotoxic effects. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.*, v.100, p.323-329, 2019.

DE ALMEIDA, J.; HOOGENKAMP, M.; FELIPPE, W.T.; CRIELAARD, W.; VAN DER WAAL, S.V. Effectiveness of EDTA and Modified Salt Solution to Detach and Kill Cells from *Enterococcus faecalis* Biofilm. *Journal Endodontic*, v.42, n.2, p.320-323, 2016.

DE-DEUS, G.; PACIORNIK, S.; MAURICIO, M. Evaluation of the effect of EDTA, EDTAC and citric acid on the microhardness of root dentine. *Int Endod J*, v.39, n. 5, p.401-407, 2006.

DE-DEUS, L.; SOUZA, E.; MARINS, J.; REIS, C.; PACIORNIK, S.; ZEHNDER, M. Smear layer dissolution by peracetic acid of low concentration. *Int Endod J*, v. 44, n.6, p. 485-490, 2011.

DOGAN, H.; ÇALT, S. Effects of Chelating Agents and Sodium Hypochlorite on Mineral Content of Root Dentin. *J Endod*, v. 27, p. 578-580, 2001.

ELDENIZ, A.; ERDEMIR, A.; BELLI, S. Effect of EDTA and citric acid solutions on the microhardness and the roughness of human root canal dentin. *J Endod*, v.31, n.2, p.107-110, 2005.

ERMOLAEVA, M.A.; SCHUMACHER, B. Systemic DNA damage responses: organismal adaptations to genome instability. *Trends in Genetics*, v.30, n.3, p.95-2012, 2014.

FARHAD, M.N.; SABERI, E.; KARKEHABADI, H. Evaluation of Cytotoxic Effects of Various Endodontic Irrigation Solutions on the Survival of Stem Cell of Human Apical Papilla. *Iran Endodontic Journal*, v.11, n.4, p.293-297, 2016.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. *Mutation research*, v.455, n.1-2, p.81-95, 2000.

FERRAZ, CC.; GOMES, BP.; ZAIA, AA.; TEIXEIRA, FB.; SOUZA-FILHO, FJ. In vitro assessment of the antimicrobial action and the mechanical ability of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant. *J Endod*, v.27, n.7 p. 452-455, 2001.

FICANHA, N.; STELLA, J. P. F.; SILVA, G. S.; ZOEHLER, B.; BUSIN, C. S.; TEIXEIRA, L.; FREITAS, M. Avaliação da genotoxicidade das resinas utilizadas na fase de contenção ortodôntica: Estudo in vivo. *SEMINA. CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE (ONLINE)*, v. 38 n 1, p. 97, 2017.

GAMBARINI, G.; PLOTINO, G.; GRANDE, N.; NOCCA, G.; LUPI, A.; GIARDINA, B.; DE LUCA, M.; TESTARELLI, L. In vitro evaluation of the cytotoxicity of FotoSan™ light-activated disinfection on

human fibroblasts. *Medical Science Monitor: Internatinal Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, n. 17, v.3, p. 21-25, 2011.

KAKEHASHI, S.; STANLEY, HR.; FITZGERALD, RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, v. 20, p. 340-349, 1965.

KIM,S.J; PARK, J.H; KIM, D.H; WON, Y. H; MAIBACH, H. I. Increased in vivo collagen synthesis and in vitro cell proliferative effect of glycolic acid. *Dermatologic Surgery*, v.24,n.10,p.1054-1058,1998.

KOULAOUZIDOU, E.; MARGELOS, J.; BELTES, P.; KORTSARIS, A. Cytotoxic Effects of Different Concentrations of Neutral and Alkaline EDTA Solutions Used as Root Canal Irrigants. *Journal of Endodontics*, v.25, n. 1, p. 21-23, 1999.

KURUVILLA, A; JAGANATH, BM; KRISHNEGOWDA, SC; RAMACHANDRA, PK; JOHNS, DA; ABRAHAM, A. A comparative evaluation of smear layer removal by using EDTA, etidronic acid, and maleic acid as root canal irrigants: An in vitro scanning electron microscopic study. *Journal of Conservative Dentistry*, v.18, n.3, p.247-51, 2015.

LEE, T.K.; O'BRIEN, K.; EAVES, G.; CHRISTIE, K.I.; VARGA, L. Effect of blood storage on radiation-induced micronuclei in human lymphocytes. *Mutation research*, v.444, n.1, p.201-216, 1999.

LUZHNA, L., KATHIRIA,P.; KOVALCHUK,O. Micronuclei in genotoxicity assessment: from genetics to epigenetics and beyond. *Frontiers in genetic*,v.34,n.131,p.1-17,2013.

MALHEIROS, C.; MARQUES, M.; Gavini, G. In Vitro Evaluation of the Cytotoxic Effects of Acid Solutions Used as Canal Irrigants. *Journal of Endodontics*, v.31, n. 10, p.746-748, 2005.

MALUF, S.W.; RIEGEL, M. Citogenética humana. Porto alegre: Artmed,2011.

MARINS, J. S. R., SASSONE, L. M., FIDEL S. R., & RIBEIRO, D. A. In vitro genotoxicity and cytotoxicity in murine fibroblasts exposed to EDTA, NaOCL, MTAD and citric acid. *Brazilian Dental Journal*, v.23, n.5, p.527–533, 2012.

MATEUCA,R.; LOMBAERT, N.; AKA.P.V.; DECORDER, I.; KIRSCH-VOLDERS,M. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. *Biochimie*,v.88, n.11,p.1515-1531,2006.

MOORHEAD, P.S.; NOWELL, P.C.; MELLMAN, W.J.; BATTIPS, D.M.; HUNGUERFORD, D.A. Chromosome preparation of leukocytes cultered from human peripheral blood. *Experimental cell research*, v.20, p.613-616, 1960.

OLIVEIRA, L.; CARVALHO, C.; NUNES, W.; VALERA, M.; CAMARGO, C.; JORGE, A.; Effects of chlorhexidine and sodium hypochlorite on the microhardness of root canal dentin. *Oral surg, Oral Med, Oral Pathol, Oral Radiol Endod*, v. 4, n. 104, p. 125-128, 2007.

PAPPEN, F. G., SOUZA, E. M., GIARDINO, L., CARLOS, I. Z., LEONARDO, M. R., DE TOLEDO LEONARDO, R. Endodontic Chelators Induce Nitric Oxide Expression by Murine-cultured Macrophages. *Journal of Endodontics*, v.35, n.6, p.824–828, 2009.

PEREZ-HEREDIA, M.; FERRER-LUQUE, CM.; GONZALEZ-RODRIGUEZ, MP.; MARTIN-PEINADO, FJ.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, S. Decalcifying effect of 15% EDTA, 15% citric acid, 5% phosphoric acid and 2.5% sodium hypochlorite on root canal dentine. *Int Endod J*, v.41, n.5, p.418–423, 2008.

PRADO, M.; SILVA, E.; DUQUE, T.; ZAIA, A.; FERRAZ, C.; ALMEIDA, J.; GOMES, B. Antimicrobial and cytotoxic effects of phosphoric acid solution compared to other root canal irrigants. *Journal of Applied Oral Science: revista FOB*, v.23, n.2, p. 158-163, 2015.

PRICA, D.; TADIN, A.; MAROVIC, D., KATUNARIC, M.; PRICA, A.; GALIC, N. Effects of dental adhesives on micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes in vitro. *Acta Clin Croat*, v.52, n.3, p. 309-315, 2013.

RAJARATNAM, R; HELPERN, J; SALIM, A; EMMETT, C.
Interventions for melasma Cochrane Database of Systematic Reviews,
2010.

RAJIC, V.B.; ZELJEZIC, D.; IVANISEVIC, A.M.; VERZAK, Z.;
BARABA, A.; MILETIC, I. Citotoxicity and genotoxicity of resin based
dental materials in human lymphocytes in vitro. *Acta Clin Croat*, v.57,
n.2, p. 278-285,2018.

RAPGAY, T.; GUPTA, P.; GUPTA, H.; SINGH, A.; JAIN, A.
Effect of Different Irrigant Solutions on Root Dentine Microhardness: An
In Vitro Study. *Act Scientific Dental Sciences*, v.2, n.8, p.03-08, 2018.

RING, K.; MURRY, P.; NAMEROW, K.; KUTTLER, S.;
GARCIA, F. The comparison of the effect of endodontic irrigation on cell
adherence to root canal dentin. *Journal of Endodontics*, v. 12, n. 24, p.
1474-1479, 2008.

ROGERO, S.O.; LUGÃO, A.B.; IKEDA, T.I.; CRUZ, A.S. Teste
in vitro de Citotoxicidade: Estudo Comparativo entre Duas Metodologias.
Materials Research, v.6,n.3, p.317-320,2003.

SABERI, E. A., KARKEHABADI, H., MOLLASHAHI, N. F.
Cytotoxicity of various endodontic materials on stem cells of human
apical papilla. *Iranian Endodontic Journal*, v.11, n.1, p. 17–22, 2016.

SAGHIRI, M.; DELVARANI, A.; MEHVARZFAR, P.; MALGANJI, G.; LOTFI, M.; DADRESANFAR, B.; SAGHIRI, A.; DADVAND, S. A study of the relation between erosion and microhardness of root canal dentin. *Oral Surg, Oral Med, Oral pathol, Oral Radiol Endod*, v.108, n.6, p.29-34, 2009.

SALEH, A.; ETTMAN, W. Effect of endodontic irrigation solutions on microhardness of root canal dentine. *J Dent*, v.27, n.1, p.43-46, 1999.

SAYIN, T.; SERPER, A.; CEHRELI, Z. OTLU, H. The effect of EDTA, EGTA, EDTAC, and tetracycline-HCl with and without subsequent NaOCl treatment on the microhardness of root canal dentin. *Oral Surg, Oral Med, Oral pathol, Oral Radiol Endod*, v.104, n.3, p.418-424, 2007.

SCEIZA, M. F., DANIEL, R. L., SANTOS, E. M., JAEGER, M. M. Cytotoxic effects of 10% citric acid and EDTA-T used as root canal irrigants: an in vitro analysis. *Journal of Endodontics*, v.27, n.12, p. 741–743, 2001.

SHAHRAVAN, A; HAGHDOOST, AA; ADL A. Effect of smear layer on sealing ability of canal obturation: a systematic review and meta-analysis. *Journal Endodontic*, v. 33, p. 96–105, 2007.

SILLANPÄÄ M. Environmental fate of EDTA and DTPA. *Rev Environ Contam Toxicol*, v. 152, p. 152-185, 1997.

SILVA, J.; ERDTMANN, B.; PÊGAS – HENRIQUES, J.A.
Genética toxicológica. Porto alegre: Alcance, 2003.

STOJICIC, S; SHEN, Y; QIAN, W; JOHNSON, B;
HAAPASALO, M. Antibacterial and smear layer removal ability of a
novel irrigant QMiX. *International Endodontic Journal*, v.45, n 4, p.363-
71, 2012.

SWAPAN, S.; PRANAB,D. Micronucleus and Its applications.
Diagnotic Cytopathology,v.40,n.1,p.84-90,2010.

TANEJA, S.; KUMARI, M.; ANAND, S. Effect of QMix,
peracetic acid and ethylenediaminetetraacetic acid on calcium loss
and microhardness of root dentine. *J Conserv Dent*, v.17, n.2, p.155-158,
2014.

THIBAUT, P.K; WLODARCZYK, J; WENCK A. A
doubleblind randomized clinical trial on the effectiveness of a daily
glycolic acid 5% formulation in the treatment of photoaging.
Dermatologic Surgery, v. 24 ,n.5 , p.573-577,1998.

TORABINEJAD, M; HANDYSIDES, R; KHADEMI, AA; et al.
Clinical implications of the smear layer in endodontics: a review. *Oral
Surg Oral Med Oral Pathol Oral Rad and Endod*, v.94, p.658-666, 2002.

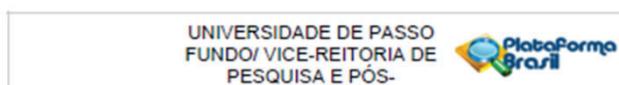
TUNCER, K.; TUNCER, S.; SISO, S. Effect of QMix irrigant on the microhardness of root canal dentine. *Aust Dent J*, v.60, n.2, p.163-168, 2015.

VOUZARA, T., KOULAOUZIDOU, E., ZIOUTI, F., ECONOMIDES, N. Combined and independent cytotoxicity of sodium hypochlorite, ethylenediaminetetraacetic acid and chlorhexidine. *International Endodontic Journal*, v.49,n.8,p. 764–773, 2016

YAMADA, RS.; ARMAS, A.; GOLDAM, M.; LIN, P. A scanning electron microscopic part of a high final volume with various irrigating solutions: Part 3. *J Endo*, v. 9, n.4, p.137-42, 1983.

ZHANG, W., TORABINEJAD, M; LI, Y. Evaluation of cytotoxicity of MTAD using the MTT-tetrazolium method. *Journal of Endodontics*, v.29,n.10,p. 654–657, 2003.

9. ANEXOS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Influência da ativação ultrassônica nas propriedades de diferentes irrigantes finais e estudo in vitro.

Pesquisador: Hurlei Scartazzini Pathano

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 04702618.9.0000.5342

Instituição Proponente: Universidade de Passo Fundo/Vice-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.110.552

Apresentação do Projeto:

O projeto foi apresentado na íntegra pelos pesquisadores

Objetivo da Pesquisa:

Avaiar, por meio da contagem de unidades formadoras de colônias e microscopia confocal, a influência da ativação ultrassônica na ação antimicrobiana do EDTA 17%, QMix e ácido glicólico, em um modelo de canais radiculares infectados com *Enterococcus faecalis*. Avaiar, por meio da microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo, a influência da ativação ultrassônica na capacidade de remoção de smear layer do EDTA 17%, QMix e ácido glicólico. Avaiar, por meio da microscopia eletrônica de transmissão, a influência da ativação ultrassônica sobre o EDTA 17%, QMix e ácido glicólico, na alteração da ultra-estrutura dentinária. Avaiar, por meio do teste de push-out, a influência da ativação ultrassônica sobre o EDTA 17%, QMix e ácido glicólico, na resistência de união do material obturador e restaurador a dentina radicular.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Não se aplica por se tratar de dentes humanos extraídos provenientes de banco de dentes.

Benefícios: Testar diferentes soluções com melhor potencial de remoção de smear layer, baixa citotoxicidade para o paciente e toxicidade para o meio ambiente frente ao EDTA 17%.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Este estudo tem como objetivo avaiar a influência da ativação ultrassônica nas propriedades de

Endereço: BR 285- Km 292 Campus I - Centro Administrativo
Bairro: Divisão de Pesquisa / São José CEP: 99.052-900
UF: RS Município: PASSO FUNDO E-mail: cep@upf.br
Telefone: (54)3316-8157

Continuação do Parecer 3.110.002

diferentes irrigantes finais. Serão selecionados 336 dentes humanos unirradiculares extraídos que aleatoriamente serão utilizados para a realização de 6 diferentes avaliações: ação antimicrobiana (contagem de unidades formadoras de colônias), ação antimicrobiana (microscopia confocal), remoção de smear layer (microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo), alteração da ultra-estrutura dentinária (microscopia de transmissão), resistência de união (push-out da gutapercha + cimento epóxico) e resistência de união (push-out de pinos de fibra de vidro + cimento resinoso). Em todas as avaliações as amostras selecionadas serão divididas em 7 grupos, de acordo com o protocolo de irrigação final: G1 – água destilada + ultrassom (controle negativo); G2 – EDTA; G3 – QMix; G4 – Ácido Glucônico; G5 – EDTA + ultrassom; G6 – QMix + ultrassom; G7 – Ácido Glucônico + ultrassom. Os dados obtidos serão submetidos a análise estatística, utilizando testes específicos para cada avaliação.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os direitos fundamentais dos participantes foram garantidos no projeto e no TCLE. O protocolo foi instruído e apresentado de maneira completa e adequada. Os compromissos do pesquisador e das Instituições estavam presentes. O projeto foi considerado claro em seus aspectos científicos, metodológicos e éticos.

Recomendações:

Após o término da pesquisa, o CEP UPF solicita:

- A devolução dos resultados do estudo aos sujeitos da pesquisa ou a instituição que forneceu os dados;
- Enviar o relatório final da pesquisa, pela plataforma, utilizando a opção, no final da página, "Enviar Notificação" + relatório final.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto, este Comitê, de acordo com as atribuições definidas na Resolução n. 466/12, do Conselho Nacional da Saúde, Ministério da Saúde, Brasil, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa na forma como foi proposto.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PE_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_1261624.pdf	11/12/2018 15:57:59		Aceto

Endereço: BR 285- Km 292 Campus I - Centro Administrativo
Bairro: Divisão de Pesquisa / São José CEP: 99.052-900
UF: RS Município: PASSO FUNDO
Telefone: (54)3318-8157 E-mail: cep@upf.br

UNIVERSIDADE DE PASSO
FUNDO/ VICE-REITORIA DE
PESQUISA E PÓS-



Continuação do Parecer 3.110.002

Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Tese.pdf	11/12/2018 15:57:31	Hurlei Scartazzini Palhano	Acerto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	concentimento.pdf	11/12/2018 15:56:38	Hurlei Scartazzini Palhano	Acerto
Cronograma	Cronograma.pdf	11/12/2018 15:55:40	Hurlei Scartazzini Palhano	Acerto
Orçamento	Orçamento.pdf	11/12/2018 15:55:11	Hurlei Scartazzini Palhano	Acerto
Declaração de Pesquisadores	declaracao.pdf	11/12/2018 15:54:53	Hurlei Scartazzini Palhano	Acerto
Declaração de Instituição e Infraestrutura	realizacaopesquisa.pdf	11/12/2018 15:50:06	Hurlei Scartazzini Palhano	Acerto
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	declaracaobiobanco.pdf	11/12/2018 15:46:59	Hurlei Scartazzini Palhano	Acerto
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	11/12/2018 15:42:58	Hurlei Scartazzini Palhano	Acerto

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

PASSO FUNDO, 10 de Janeiro de 2019

Assinado por:
Felipe Cittolin Abal
(Coordenador(a))

Endereço: BR 285- Km 292 Campus I - Centro Administrativo
Bairro: Divisão de Pesquisa / São José CEP: 99.052-900
UF: RS Município: PASSO FUNDO
Telefone: (54)3318-8157 E-mail: cnp@upf.br

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da genotoxicidade de diferentes irrigantes finais em modelo de cultura primário de linfócitos humanos

Pesquisador: Karolina Frick Bischoff

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 99901118.5.0000.5342

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.055.221

Apresentação do Projeto:

Este estudo tem como objetivo avaliar, in vitro, a genotoxicidade de diferentes irrigantes finais usados em endodontia. A genotoxicidade será avaliada através do teste de micronúcleos, para esse estudo será realizada a cultura de linfócitos humanos a partir de doadores de sangue, não expostos a agentes cancerígenos. Os linfócitos serão lançados em meio próprio para cariótipo contendo fito-hemaglutina para estimular mitoses. Serão incubados a 37°C por um tempo total de 72 horas. Após as primeiras 24 horas, serão incubados os tratamentos e divididos nos seguintes grupos de tratamento: G1 – água destilada (controle negativo), G2 – QMix, G3 – EDTA 17%, G4 – Ácido Glicólico 10%, G5 – Ácido Glicólico 17% e G6 – Ácido Glicólico 25%. Através da técnica de detecção de micronúcleos, para determinação sua frequência, serão analisadas 1000 células com membranas íntactas, por lâmina e quantificado o índice de divisão nuclear (IDN), o número de células binucleadas, o número de células com um, dois, três ou quatro micronúcleos, o número de células em metáfase (índice mitótico) e o número de células com pontes nucleoplasmáticas. O IDN será calculado por $IDN = \frac{M1 + 2(M2) + 3(M3) + 4(M4)}{N}$ em que M1 a M4 = número de células com 1, 2, 3 ou 4 núcleos, respectivamente e N = número total de células viáveis.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a genotoxicidade de EDTA 17%, do QMix e ácido glicólico 10%, 17% e 25%

Endereço: BR 285- Km 292 Campus I - Centro Administrativo
Bairro: Divisão de Pesquisa / São José CEP: 99.052-000
UF: RS Município: PASSO FUNDO
Telefone: (54)3316-0157 E-mail: cep@ufjf.br

Continuação de Protocolo 3.055.221

em modelo de cultura primária de linfócitos humanos, cidade de diferentes irrigantes finais.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Este projeto apresenta risco mínimo, riscos estes que são inerentes ao processo de coleta de sangue, como desconforto, irritabilidade e reações de hipersensibilidade da pele, formação de êmbolos ou hemorragia, porém para minimizar tais riscos a coleta será realizada por profissional apto e com experiência. O pesquisador compromete-se a orientar o paciente sobre medidas preventivas para evitar ou minimizar tais desconfortos e no caso de acontecimento dessas reações adversas, irá orientar maneiras de manejo (utilização de compressas, não pressionar o braço, não realizar exercício físico no dia da coleta de sangue). Benefícios: Utilização de uma solução irrigante com menor potencial genotóxico para os tecidos periaxiais do paciente

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A genotoxicidade será avaliada por meio do teste de detecção dos micronúcleos. Obtenção de doadores voluntários de sangue para a cultura primária de linfócitos. Para esse estudo, in vitro, será realizada a cultura de linfócitos humanos a partir de doadores de sangue saudáveis da Faculdade de Odontologia da Universidade de Passo Fundo. Os doadores serão informados sobre o projeto e será solicitado um consentimento por escrito. Será realizado um questionário de saúde para selecionar os doadores, e previamente a coleta para cultura será realizado exames de sangue de rotina para confirmar o bom estado de saúde geral. Pacientes não expostos a agentes carcinogênicos como álcool e fumo, bem como não fazendo uso de medicamentos sistêmicos de uso contínuo, serão incluídos na amostra.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os direitos fundamentais dos participantes foram garantidos no projeto e no TCLE. O protocolo foi instruído e apresentado de maneira completa e adequada. Os compromissos do pesquisador e das instituições estavam presentes. O projeto foi considerado claro em seus aspectos científicos, metodológicos e éticos.

Recomendações:

Após o término da pesquisa, o CEP UPF solicita: a) A devolução dos resultados do estudo aos sujeitos da pesquisa ou a instituição que forneceu os dados; b) Enviar o relatório final da pesquisa, pela plataforma, utilizando a opção, no final da página, "Enviar Notificação" + relatório final.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto, este Comitê, de acordo com as atribuições definidas na Resolução n. 466/12,

Endereço: BR 285- Km 292 Campus I - Centro Administrativo
Bairro: Divisão de Pesquisa / São José CEP: 99.052-900
UF: RS Município: PASSO FUNDO
Telefone: (54)3315-8157 E-mail: cep@upf.br

UNIVERSIDADE DE PASSO
FUNDO/ VICE-REITORIA DE
PESQUISA E PÓS-



Continuação do Parecer: 3.055.321

do Conselho Nacional da Saúde, Ministério da Saúde, Brasil, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa na forma como foi proposto.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_P ROJETO_1221465.pdf	28/11/2018 18:23:22		Acelto
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	28/11/2018 18:21:24	karolina frick bischoff	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle.docx	28/11/2018 18:19:34	karolina frick bischoff	Acelto
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	24/09/2018 15:20:00	karolina frick bischoff	Acelto
Outros	autorizacaoerealizacaoPesquisa.pdf	24/09/2018 15:19:34	karolina frick bischoff	Acelto
Outros	autorizacaoPreviapesquisa.pdf	24/09/2018 15:19:03	karolina frick bischoff	Acelto
Declaração de Pesquisadores	declaracao.pdf	18/09/2018 15:12:09	karolina frick bischoff	Acelto
Orçamento	orcamento.pdf	17/09/2018 20:23:09	karolina frick bischoff	Acelto
Cronograma	cronograma.pdf	17/09/2018 20:22:36	karolina frick bischoff	Acelto

Situação do Parecer:

Aprovado

Neecessita Apreciação da CONEP:

Não

PASSO FUNDO, 04 de Dezembro de 2018

Assinado por:
Felipe Cittolin Abal
(Coordenador(a))

Endereço: BR 285- Km 292 Campus I - Centro Administrativo
Bairro: Divisão de Pesquisa / São José CEP: 99.050-000
UF: RS Município: PASSO FUNDO
Telefone: (54)3315-8157 E-mail: cep@ufpr

Página 03 de 04

