

Fernanda Rodrigues Guedes

**Citotoxicidade e alteração da composição dentinária
promovida por diferentes removedores químico-
mecânicos de cárie: um estudo preliminar in vitro**

*Cytotoxicity and dentin composition alteration promoted
by different chemical mechanical caries removal agents:
a preliminary in vitro study*

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do Título de Mestre em Odontologia na Área de Clínica Odontológica Integrada.

Uberlândia, 2020

Fernanda Rodrigues Guedes

**Citotoxicidade e alteração da composição dentinária
promovida por diferentes removedores químico-
mecânicos de cárie: um estudo preliminar in vitro**

*Cytotoxicity and dentin composition alteration promoted
by different chemical mechanical caries removal agents:
a preliminary in vitro study*

Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia da Universidade Federal de
Uberlândia, para obtenção do Título de
Mestre em Odontologia na Área de Clínica
Odontológica Integrada.

Orientadora: Ana Paula Turrioni Hidalgo
Co-orientador: Luiz Renato Paranhos

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Ana Paula Turrioni Hidalgo

Profa. Dra. Priscilla Barbosa Ferreira Soares

Profa. Dra. Fernanda Gonçalves Basso Lombardi

Uberlândia, 2020

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

G924 2020	<p>Guedes, Fernanda Rodrigues, 1993- Avaliação de diferentes removedores químico mecânicos de cárie sobre o complexo dentino-pulpar: um estudo preliminar in vitro [recurso eletrônico] / Fernanda Rodrigues Guedes. - 2020.</p> <p>Orientadora: Ana Paula Turrioni Hidalgo. Coorientador: Luiz Renato Paranhos. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Odontologia. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.di.2020.623 Inclui bibliografia. Inclui ilustrações.</p> <p>1. Odontologia. I. Hidalgo, Ana Paula Turrioni, 1985-, (Orient.). II. Paranhos, Luiz Renato, 1975-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Odontologia. IV. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU: 616.314</p>
--------------	---

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Odontologia
 Av. Pará, 1720, Bloco 4L, Anexo B, Sala 35 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
 Telefone: (34) 3225-8115/8108 - www.ppgoufu.com - copod@umuarama.ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Odontologia				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado, número 379, PPGO				
Data:	Vinte e cinco de Agosto de Dois Mil e Vinte	Hora de início:	14:00	Hora de encerramento:	[16:20]
Matrícula do Discente:	11812ODO007				
Nome do Discente:	Fernanda Rodrigues Guedes				
Título do Trabalho:	Avaliação de diferentes removedores químico mecânicos de cárie sobre o complexo dentino-pulpar: um estudo preliminar in vitro				
Área de concentração:	Clínica Odontológica Integrada				
Linha de pesquisa:	Propriedades Físicas e Biológicas dos materiais Odontológicos e das estruturas dentais				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Propriedades Físicas e Biológicas dos materiais Odontológicos e das estruturas dentais				

Reuniu-se em Web Conferência pela plataforma MConf - RNP, em conformidade com a PORTARIA Nº 36, DE 19 DE MARÇO DE 2020 da COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR - CAPES, pela Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Odontologia, assim composta: Professores Doutores: Priscilla Barbosa Ferreira Soares (UFU); Fernanda Gonçalves Basso Lombardi (UNAERP) e Ana Paula Turrioni Hidalgo(UFU) orientador(a) do(a) candidato(a).

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, Dr(a). Ana Paula Turrioni Hidalgo, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

[A]provado(a).

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Ana Paula Turrioni Hidalgo, Professor(a) do Magistério Superior**, em 25/08/2020, às 16:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fernanda Gonçalves Basso, Usuário Externo**, em 25/08/2020, às 16:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Priscilla Barbosa Ferreira Soares, Professor(a) do Magistério Superior**, em 25/08/2020, às 16:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2172889** e o código CRC **0D73221A**.

Dedicatória

DEUS é o maior responsável por tudo na minha vida, por isso sempre dedicarei as minhas conquistas ao nosso Pai Maior. Por ser meu guia e me direcionar sempre para os melhores caminhos. A fé sempre irá me mover e nunca me deixará desistir.

Aos meus queridos pais, **Jesus e Neide**, por sempre acreditarem em mim e não medirem esforços para me apoiar. Sei que tudo que fizeram por mim foi através de muita luta e garra, por isso minha eterna admiração e gratidão pelas melhores referências que eu poderia ter. Vocês são minha base, meu espelho e meu norte. Sem a ajuda de vocês, em todos os momentos, eu nada seria. Amo vocês infinitamente. Obrigada por toda dedicação e amor.

Aos meus irmãos, **Leonardo e Nathássia**, por sempre estarem ao meu lado e serem exemplos para mim. Juntos, sempre somos melhores. Não há nada mais importante que a família. Obrigada pela paciência e pelo companheirismo em todos os momentos. Indubitavelmente, cada um teve um papel importantíssimo nessa conquista. Sou muito privilegiada por ter uma família tão abençoada. Amo muito vocês.

Ao meu marido, **Vithor**, por todo amor e companheirismo. Sou muito feliz e realizada com o relacionamento que construímos a cada dia e isso me dá forças para buscar o melhor para nossa família. Obrigada pela paciência em todos os momentos, por trazer leveza em momentos de tensão e luz em momentos escuros. Juntos iremos longe. Eu te amo muito, amor da minha vida.

A minha filha, **Mariana**, que representa a minha maior inspiração. Desde que descobri que seria sua mãe, minhas forças triplicaram. Toda a minha vida sempre será dedicada a você. Obrigada por ser luz e alegria na nossa família. Sua doçura e bondade me motivam a ser sempre uma pessoa melhor. Papai e mãe são muito abençoados por ter uma filha tão especial e amada. Luz da minha vida, eu te amo por toda eternidade. Nosso amor é de outras vidas.

A minha “mãedrinha”, **Bibinha**, por vibrar com minhas conquistas e estar sempre disposta a me ajudar. Não sei o que seria de mim sem suas orações e suas palavras de motivação. Essa conquista também é sua. Jamais deixarei de ser grata por cuidar de nós. Me orgulho por ter alguém tão forte e cheia de fé em minha vida. Eu te amo muito.

A toda a minha **família**, que, mesmo distante, sempre se faz presente. Obrigada por brindarem todas as minhas conquistas. Que Deus sempre esteja no comando da nossa família, mantendo a paz e a união.

Aos meus sogros, **Cássia e Humberto**, por serem tão importantes na minha vida. Obrigada por terem embarcado comigo nessa jornada, acreditando em mim e não medindo esforços para me ajudar a chegar até aqui. Saibam que vocês, assim como meus cunhados, **Matheus e Bruno**, são a família que Deus me presenteou. Serei eternamente grata por Ele ter colocado pessoas tão maravilhosas na minha vida, trazendo mais amor e alegria aos meus dias. Gratidão eterna. Amo vocês.

A minha orientadora, **Ana Paula**, por ter acreditado em mim desde o início e por ter me orientado nessa jornada. Admiro muito a dedicação e a determinação que você tem em tudo que faz. Todo esse caminho foi mais leve por ter uma orientadora com tanta delicadeza e que sempre demonstra compreensão. Obrigada por transmitir tanta sabedoria ao longo dessa trajetória. É muito bonito te ver trabalhar e lutar por seus ideais. Te admiro muito como orientadora, professora, amiga, mãe, esposa e filha. Você sempre será uma referência não só de orientadora, mas de ser humano para mim.

Aos meus **amigos**, pela lealdade e por compartilhar tantas confidências. Preservarei sempre a amizade de vocês. Que nossas conquistas sejam sempre comemoradas com muita felicidade e irmandade.

Agradecimentos

A todos que participaram da execução desse trabalho, tendo cada pessoa um papel importantíssimo para realização do mesmo. Obrigada por se dedicarem e acreditarem nos objetivos dessa pesquisa, somando esforços e conhecimentos de pessoas tão inspiradoras para mim.

A toda minha equipe que me acompanhou por esse caminho: a minha orientadora Ana Paula, Nilson, Jéssica, Kamilla, Washington, Layane e Gabriela. Meu eterno obrigada! Sem vocês esse trabalho não existiria. Cada um contribuiu e muito para a minha jornada ser tão enriquecedora. Agradeço a todas experiências que vivi com vocês, sempre com muito companheirismo e otimismo. Com certeza fiz grandes amigos que levarei para minha vida. As palavras de apoio sempre presentes me fez acreditar ainda mais nesse sonho.

Ao meu co-orientador, Luiz Renato Paranhos, por todo conhecimento compartilhado. Obrigada por ter feito considerações tão importantes durante todo o trabalho e ter sido essencial na execução do mesmo. Admiro muito toda a sua jornada.

Ao Programa de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia, pela oportunidade de realizar o mestrado em um programa de excelência. Agradeço a todos os momentos vividos e pessoas que conheci nessa jornada, me fazendo sentir ainda mais orgulho de fazer parte desse programa.

Aos professores da graduação e da pós graduação, pelos ensinamentos ao longo desses anos. Com certeza todos foram importantes na lapidação do meu conhecimento e contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional.

Aos colegas de mestrado, por todos os momentos vividos e lanches compartilhados. Com certeza cada um fez essa trajetória ser mais leve e ter mais alegria. Obrigada pela enriquecedora convivência.

A Dra Priscilla Soares, Dra Alessandra Maia e Dra Camilla Moura, membros da banca de qualificação, pelos conselhos e sugestões tão bem colocados. Sem dúvidas, foram importantes para enriquecer nosso trabalho. Obrigada pelo interesse em contribuir.

Aos órgãos de apoio: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro que permitiu a realização do presente estudo.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para que esse trabalho se realizasse.

SUMÁRIO

RESUMO/PALAVRAS-CHAVE	11
ABSTRACT/KEYWORDS	13
1. Introdução e Referencial Teórico	15
2. Capítulo 1: Cytotoxicity and dentin composition alteration promoted by different chemical mechanical caries removal agents: a preliminary in vitro study	17
Abstract	19
Background	21
Methods	23
Results	28
Discussion	30
Conclusions	34
Ethics Declarations	34
Abbreviations	35
References	36
Tables	42
Figures	44
REFERÊNCIAS	46
ANEXO	48

Resumo

O objetivo da pesquisa foi avaliar a citotoxicidade de dois removedores químico-mecânicos (Brix 3000[®] - BX e Papacárie Duo[®] - PD), quando aplicados em diferentes diluições, diretamente sobre células pulpares de dentes decíduos, bem como avaliar a morfologia e composição química do tecido dentinário após a aplicação destes materiais. As células pulpares foram cultivadas (20.000 células/cm²) utilizando meio de cultura (DMEM com 10% de Soro Fetal Bovino - SFB). Após 24 horas, os materiais BX e PD, nas diluições de 1:20, 1:100 e 1:1000, foram adicionados. Células em contato com apenas meio de cultura sem SFB foram consideradas como grupo controle. Foram realizados os testes de viabilidade (MTT), ensaio de azul de tripano (TB) e morfologia celular (Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV) após 24 horas de contato com os agentes. Para a análise morfológica (MEV) e química da dentina (espectrometria dispersiva de raios X- EDS), discos dentinários de 0,3 mm de espessura foram confeccionados, sendo divididos nos seguintes grupos: controle (sem tratamento) e superfície coberta com ácido fosfórico, BX ou PD, no tempo mínimo indicado pelo fabricante. A análise estatística foi realizada aplicando os testes one-way ANOVA e Tukey ($p < 0,05$). Os resultados de MTT apontaram diminuição da viabilidade de 47,5%, 28,7% e 18,9% para BX e de 80,2%, 55,3% e 25,3% para PD, nas diluições de 1:20, 1:100 e 1:1000, respectivamente, com relação ao grupo controle ($p < 0,05$). Da mesma forma, o número de células viváveis diminuiu em 42,2%, 36,0% e 17,2% para BX e em 64,1%, 53,2% e 40,7% para PD nas diluições de 1:20, 1:100 e 1:1000, respectivamente, com relação ao grupo controle ($p < 0,05$). As imagens em MEV demonstraram um menor número de células e alteração morfológica para ambos os agentes, principalmente para as diluições de 1:20 e 1:100. Os materiais BX e PD não provocaram alterações visualmente perceptíveis por MEV na superfície dos discos dentinários. A análise química (EDS), indicou que não há diferença estatística dos níveis de cálcio e fósforo entre os materiais e o grupo controle ($P < 0,05$). Pôde-se concluir que

ambos os materiais apresentaram citotoxicidade no contato direto com células pulpares de dentes decíduos, sendo que o material BX apresentou menor citotoxicidade quando comparado ao material PD. Além disso, ambos os materiais não foram capazes de alterar significativamente a estrutura dentinária.

Palavras-chave: papacárie, citotoxicidade, polpa dental, microscopia eletrônica de varredura, cultura celular, dente decíduo.

Abstract

This study aimed to assess the cytotoxicity of chemomechanical caries removal agents (Brix 3000™ - BX and Papacarie Duo™ - PD) when applied at different dilutions directly to the pulp cells from deciduous teeth, as well as to assess the morphology and chemical compositions of the dentin surface after applying these materials. The cells from dental pulp were seeded (20,000 cells/cm²) using a culture medium (DMEM with 10% bovine fetal serum - BFS). After 24 hours, the BX and PD materials were added to dilutions of 1:20, 1:100, and 1:1000. The cells that only contacted the culture medium without BFS were considered the control group. The viability test (MTT), trypan blue assay (TB), and cell morphology test (Scanning Electron Microscopy - SEM) were performed after 24 hours of contact with the agents. For the morphological (SEM) and chemical (energy-dispersive X-ray spectrometry - EDS) dentin analyses, 0.3-mm-thick dentin discs were obtained and divided into the following groups: control (no treatment) and surface covered with phosphoric acid, BX, or PD. The statistical analysis was performed using one-way ANOVA and Tukey's test ($p < 0.05$). The MTT results indicated a viability decrease of 47.5%, 28.7%, and 18.9% for BX and 80.2%, 55.3%, and 25.3% for PD, at dilutions of 1:20, 1:100, and 1:1000 respectively, compared to the control group ($p < 0.05$). Similarly, the number of viable cells decreased 42.2%, 36.0% and 17.2% for BX and 64.1%, 53.2% and 40.7% for PD, at dilutions of 1:20, 1:100, and 1:1000 respectively, compared to the control group ($p < 0.05$). The SEM images showed a lower number of cells and morphological changes for both agents, especially at dilutions of 1:20 and 1:100. The BX and PD materials did not cause visually perceptible changes by SEM on the surface of dentinal discs. The chemical analysis (EDS) did not indicate a statistical difference in the levels of calcium (Ca) and phosphorus (P) between the materials and the control group ($P < 0.05$). Both materials presented cytotoxicity in direct contact with the pulp cells from deciduous teeth, and

the BX material presented lower cytotoxicity than the PD material. Moreover, both materials could not change significantly the dentinal structure.

Keywords: papacarie, cytotoxicity, dental pulp, microscopy eletronic scanning, cell culture, primary teeh

Introdução e Referencial Teórico

O método convencional de remoção de tecido cariado está associado a uma percepção desagradável por parte do paciente, que muitas vezes pode apresentar dor, necessidade de técnica anestésica e presença de ruídos pelo uso de brocas¹. Apresenta também um maior risco de exposição pulpar e uma maior dificuldade do cirurgião-dentista em avaliar uma quantidade exata de dentina a ser removida².

A abordagem minimamente invasiva da doença cárie e o aprimoramento de protocolos restauradores têm possibilitado a remoção seletiva do tecido cariado². Com isso, há uma redução da carga bacteriana no interior da cavidade, sem retirar o tecido passível de mineralização^{3,4}. Essa técnica foi estabelecida a partir da diferenciação de duas camadas presentes na lesão cariada, a dentina infectada e a dentina afetada⁵.

A mais superficial, chamada dentina infectada, possui uma perda de integridade estrutural devido a degeneração do colágeno provocada por microorganismos, acarretando em um tecido mais amolecido e úmido. Essa camada deve ser removida, mantendo apenas a dentina afetada, que apresenta ter uma característica mais rígida e com capacidade de remineralização^{6,7}.

Para isso, alguns métodos tem sido desenvolvidos, preservando, ao máximo, a estrutura dental⁸. A utilização de removedores químico-mecânicos de cárie é um método conservador e eficaz nesse tipo de tratamento, pois eles atuarão apenas no colágeno desnaturado presente na dentina infectada, ajudando o cirurgião-dentista na preservação da dentina afetada⁹.

Há diversos removedores químico-mecânicos de cárie no mercado, entre eles o Papacárie Duo e o Brix 3000. Ambos têm na sua composição a enzima papaína, extraída da casca do mamão, a qual possui a capacidade de quebrar as fibras de colágeno desnaturadas, propiciando a remoção do tecido com instrumentos manuais¹⁰. Alguns estudos foram realizados para analisar sua eficácia clínica, além da promoção de um menor desconforto para o paciente^{11,12,13}. Um dos estudos teve como objetivo avaliar a eficácia e a aceitação do Papacárie em comparação à remoção convencional de tecido cariado. 25 crianças participaram desse estudo, tendo pelo menos duas lesões de cárie na cavidade bucal para receberem os dois tratamentos. Observou-se que o tempo para a técnica que utilizava o Papacárie foi maior, comparado à técnica convencional. Porém, o método Papacárie levou à redução da dor e ansiedade do paciente, além de uma maior aceitabilidade desse método. O número de bactérias foi significativamente reduzido nas duas técnicas utilizadas¹¹.

Em estudo semelhante, comparou-se a técnica utilizando Papacárie com a remoção convencional de cárie utilizando apenas motor baixa rotação. Foi observado que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos quanto ao tempo necessário para realização dos procedimentos e acompanhamento radiográfico¹². Em um outro estudo foi realizada a comparação entre dois diferentes removedores químico-mecânicos de cárie (Carisolv e Papacárie), além da técnica convencional. O método mais eficiente e com menor tempo de execução foi o método de remoção convencional. Porém, apresentou maior percepção de dor. Em relação aos dois removedores químico-mecânicos, o Papacárie foi o mais aceito e necessitou de um menor número de aplicações para uma remoção efetiva do tecido cariado¹³.

Apesar de muitos estudos com os removedores químico-mecânicos de cárie, são escassos, na literatura, pesquisas abordando os efeitos desses materiais para as células pulpares, visto que são introduzidos em cavidades muito profundas para a remoção da cárie. Por esta razão, o objetivo do presente estudo foi avaliar a citotoxicidade de dois removedores químico-mecânicos (Brix 3000[®] e Papacárie Duo[®]), quando aplicados em diferentes diluições, diretamente sobre células pulpares de dentes decíduos, bem como avaliar a morfologia e composição química elementar do tecido dentinário após a aplicação destes materiais. As hipóteses nulas foram: 1) Os materiais testados não apresentam citotoxicidade para células pulpares de dentes decíduos humanos quando colocados diretamente sobre as células, na forma diluída; 2) Os materiais testados não são capazes de alterar a estrutura e composição química elementar da superfície dentinária, após formação *in vitro* de *smear layer*.

Capítulo 1:

Cytotoxicity and dentin composition alteration promoted by different chemical mechanical caries removal agents: a preliminary in vitro study

Guedes FR, Bonvicini JFS, Souza GL, Moura CCG, Paranhos LR, Turrioni AP

**Cytotoxicity and dentin composition alteration promoted by different chemical
mechanical caries removal agents: a preliminary in vitro study**

Fernanda Rodrigues Guedes¹, Jéssica Fernanda Sena Bonvicini¹, Gabriela Leite de Souza²,
Camilla Christian Gomes Moura², Luiz Renato Paranhos³ & Ana Paula Turrioni Hidalgo¹

¹Department of Pediatric Dentistry, School of Dentistry, Federal University of Uberlândia,
UFU, Uberlândia, MG, Brazil

² Department of Endodontics, School of Dentistry, Federal University of Uberlândia, UFU,
Uberlândia, MG, Brazil

³ Department of Preventive and Community Dentistry, School of Dentistry, Federal
University of Uberlândia, UFU, MG, Brazil

Corresponding Author

Dr. Ana Paula Turrioni Hidalgo

DDS, MSc, PhD, Cell Biology Research Group, Department of Pediatric Dentistry, School of
Dentistry, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil.

Av. Pará 1720, Umuarama.

CEP: 38400902, Uberlândia, MG, Brasil

E-mail: apturrioni@ufu.br

Tel: +55-16-3301-64

Abstract

Background: This study aimed to assess the cytotoxicity of chemomechanical caries removal agents (Brix 3000™ - BX and Papacarie Duo™ - PD) when applied at different dilutions directly to the pulp cells from deciduous teeth, as well as to assess the morphology and chemical compositions of the dentin surface after applying these materials.

Methods: The cells from dental pulp were seeded (20,000 cells/cm²) using a culture medium (DMEM with 10% bovine fetal serum - BFS). After 24 hours, the BX and PD materials were added to dilutions of 1:20, 1:100, and 1:1000. The cells that only contacted the culture medium without BFS were considered the control group. The viability test (MTT), trypan blue assay (TB), and cell morphology test (Scanning Electron Microscopy - SEM) were performed after 24 hours of contact with the agents. For the morphological (SEM) and chemical (energy-dispersive X-ray spectrometry - EDS) dentin analyses, 0.3-mm-thick dentin discs were obtained and divided into the following groups: control (no treatment) and surface covered with phosphoric acid, BX, or PD. The statistical analysis was performed using one-way ANOVA and Tukey's test ($p < 0.05$).

Results: The MTT results indicated a viability decrease of 47.5%, 28.7%, and 18.9% for BX and 80.2%, 55.3%, and 25.3% for PD, at dilutions of 1:20, 1:100, and 1:1000 respectively, compared to the control group ($p < 0.05$). Similarly, the number of viable cells decreased 42.2%, 36.0% and 17.2% for BX and 64.1%, 53.2% and 40.7% for PD, at dilutions of 1:20, 1:100, and 1:1000 respectively, compared to the control group ($p < 0.05$). The SEM images showed a lower number of cells and morphological changes for both agents, especially at dilutions of 1:20 and 1:100. The BX and PD materials did not cause visually perceptible changes by SEM on the surface of dentinal discs. The chemical analysis (EDS) did not indicate a statistical difference

in the levels of calcium (Ca) and phosphorus (P) between the materials and the control group (P<0.05).

Conclusions: Both materials presented cytotoxicity in direct contact with the pulp cells from deciduous teeth, and the BX material presented lower cytotoxicity than the PD material. Moreover, both materials could not change significantly the dentinal structure.

Keywords: papacarie, cytotoxicity, dental pulp, microscopy eletronic scanning, cell culture, primary teeh

Background

Caries is a multifactorial disease caused by an imbalance in the demineralization and remineralization processes of hard dental tissues, causing progressive destruction [1]. Regarding the formation of the carious lesion, dentin is classified into two layers, which are differentiated macroscopically by the properties of resistance to cutting and staining [2]. The most superficial dentin, called infected, has a loss of integrity due to collagen degeneration caused by microorganisms, resulting in a more soft and moist tissue. This layer must be removed, keeping only the affected dentin, which has a more rigid characteristic and is capable of remineralization [3,4].

In clinical practice, it is difficult to distinguish them [5], considering there is not a precise technique to recognize the exact limit between both layers [6]. However, it is known that in order to obtain a good tissue repair and decrease the risk of exposure requires the dentist to maintain the dentin affected [7, 8], justifying the need to standardize the best technique for carious tissue removal.

Removing caries by the conventional method usually causes discomfort, anxiety, and pain to the patient because it requires high-rotation burs and it does not remove selectively carious and healthy tissues, meaning it removes both infected and affected dentin [9]. In most cases, this procedure requires local anesthesia, which also decreases patient acceptance [10]. Dentistry is constantly searching for treatments that cause less discomfort to patients. It is also important for dentists dealing with the pandemic context, which requires professional preventive and minimally invasive approaches to the management of caries [11]

New technologies such as cavity preparation by oscillation (ultrasound) [12], the use of laser [13], ozone [14], and chemomechanical caries removal agents [15] have been used. Most of these methods involve a high cost and may lead to tooth hypersensitivity, contributing to painful sensation especially in children, and the chemomechanical method is an excellent

alternative to conventional removal [16, 17]. The chemomechanical caries removal is a non-invasive technique that aims to dissolve necrotic tissues, facilitating the removal of the tissue softened later with manual blunt-tip instruments [18, 19, 20].

The chemomechanical caries removal agents, initially based on n-monochloroglycine and sodium hypochlorite, appeared in 1972, but they removed the carious tissue slowly [21]. In the 1990s, Carisolv™ was introduced, consisting of a gel with two components: one based on 0.5 % sodium hypochlorite and the other based on amino acids (glutamic acid, leucine, and lysine), sodium chloride, erythrosine, and distilled water [22]. Although it was considered effective and easy to handle, the product was expensive and required customized tools [23].

In 2003, needing to promote the use of the chemomechanical removal method in the Brazilian public health system, a gel (Papacarie™) was developed, which the main component was papain - an enzyme similar to human pepsin, extracted from the papaya peel. This enzyme breaks the denatured collagen fibers, allowing easy removal with handpieces [24]. The agent is also composed of chloramine, which chemically softens the carious dentin and connects to the degraded collagen portion and toluidine blue, with antimicrobial action [25]. Its use presented satisfactory results when compared to the atraumatic restorative treatment [18] and other chemomechanical removal agents, in permanent [26] and deciduous teeth [27]. More recently, a new papain-based agent (Brix 3000™) was introduced in the market in 2017, with major differences in composition. It presents a higher papain concentration and the material is suggested to have anti-inflammatory properties, which may favor the recovery of pulp tissue [28].

Besides the different options for the chemomechanical removal of the carious tissue, the information regarding pulp cytotoxicity from using this type of technique is scarce, especially when the materials are applied in deep cavities presenting risk of pulp exposition. This study aimed to assess the cytotoxicity of two chemomechanical caries removal agents

(Brix 3000™ and Papacarie Duo™) when applied at different dilutions directly to the pulp cells of deciduous teeth, as well as to assess the morphology and chemical composition of the dentin surface after applying these materials. The null hypotheses were: 1) The materials tested did not present cytotoxicity for the pulp cells of human deciduous teeth when placed directly on the cells in diluted form; 2) The materials tested cannot change the elementary structure and chemical composition of the dentin surface after the *in vitro* smear layer formation.

Methods

The local ethics committee approved the study (Certificate of Presentation for Ethical Consideration: 07067018.4.0000.5152). The CRIS (Checklist for Reporting *In vitro* Studies) tool [28] was used for designing and writing the results according to the recommendations for *in vitro* studies. Moreover, the entire method of the present *in vitro* study was performed according to the International Organization for Standardization (ISO) guidelines 10993-5: 2009.

Obtaining pulp cells from deciduous teeth (PCDD)

Pulp cells from deciduous teeth (PCDD) were obtained from three healthy teeth collected at the School of Dentistry of the Federal University of Uberlândia (UFU), Brazil. The pulp tissue was immersed for 1 h at 37°C in tissue digestion solution (3 mg/mL of collagenase type I, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA, and 4 mg/mL of dispase, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). The cells obtained were seeded in 25 cm² flasks and incubated for four days at 37°C, with 5% CO₂ [30].

Experimental protocol for cell culture

The experimental protocol was performed with cells from the 4th to 6th passage. The pulp cells were seeded (20,000) in 24-well plates (Costar Corp., Cambridge, MA, USA) using DMEM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) supplemented at 10% with bovine fetal serum (Gibco, Grand Island, NY, USA), with 100 UI/mL of penicillin, 100 µg/ml of streptomycin, and 2 mmol/L of glutamine (Gibco, Grand Island, New York, USA). They were maintained in an incubator with 5% CO₂ at 37°C and, after 24 hours, the materials were added. Two gels were used for the cytotoxicity analysis: the first one, Papacarie DuoTM - PD (Fórmula e Ação F&A, Laboratório Farmacêutico Ltda, São Paulo, SP, Brazil) and the second one, Brix 3000TM - BX (BRIX S.R.L., Província de Santa Fé, Argentina).

The experimental and control groups were distributed as follows for the metabolism analysis and the number of viable cells (n=8): G1- Control (DMEM), G2 –BX 1:20, G3 – BX 1:100, G4 – BX 1:1000, G5 – PD 1:20, G6 – PD 1:100, and G7 – PD 1:1000.

The materials were diluted in DMEM, according with each concentration. The samples were homogenized with a pipette and standardized. To justify the dilutions used in the present study, it stands out that a previous pilot study developed by the research group showed that the IC₅₀ (half of the maximum inhibitory concentration) of the BX material was the 1:20 dilution (data not presented). From this dilution, two higher ones were selected (1:100 and 1:1000) for the comparison between groups. The tests were performed 24 hours after the contact with the materials [30].

Cell viability (MTT assay)

Cell viability was assessed with the methyl-tetrazolium assay (MTT). This analysis allows determining the activity of the succinic dehydrogenase enzyme connected to the internal mitochondrial membrane, which intervenes in cell respiration and may be considered the cell metabolic rate. Each well of the culture medium received 900 µL of DMEM without bovine

fetal serum and 100 μ L of MTT solution (5 mg/mL in PBS -Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). After four hours in the incubator at 37°C, the solution was replaced with 700 μ L of acidified isopropanol (0.04 N of HCL), aiming to dissolve the formazan crystals resulting from the methyl-tetrazolium salt cleavage by the succinic dehydrogenase enzyme in the viable cells, producing a homogeneous bluish solution. Three parts of 100 μ L of each sample were transferred to a 96-well plate (Costar Corp, Cambridge, MA, USA) and analyzed in a spectrophotometer (Thermo Plate, Shenzhen, China) using a 570-nm filter.

Viable cell count (Trypan Blue assay)

The trypan blue assay (TB) was used to assess the number of viable cells after applying the chemical removers. This test assesses directly the total number of viable cells in the samples because the TB dye can penetrate only in porous and permeable membranes of damaged dead cells, which is detectable in the microscope analysis. The culture medium was removed and the cells were trypsinized with 300 μ L of 0.25% Trypsin (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) for 10 minutes.

After this time, 50 μ L of the cell suspension and 50 μ L of 0.04% Trypan Blue solution (Sigma–Aldrich, St Louis, MO, USA) were transferred to a 96-compartment plate and incubated for two minutes at room temperature. Ten microliters of each sample were transferred to a hemocytometer that, aided by a manual counter, allowed counting the total number of viable and non-viable cells with an inverted light microscope (Nikon Eclipse TS 100, Nikon Corporation, Tokyo, Japan). Non-viable cells presented the blue-stained cytoplasm due to the penetration of the TB solution within the cells that presented a rupture of the plasma membrane. The number of viable cells was determined by subtracting the number of non-viable cells from the total number of cells.

Morphological analysis by Scanning Electron Microscopy (SEM)

A qualitative analysis of the cell culture was performed to assess cell morphology after the contact with the chemical removers, allowing to complement the cell viability analysis.

The cells were seeded in coverslips and fixed for one hour in 2.5% glutaraldehyde (Sigma–Aldrich, St Louis, MO, USA). After fixation, each well was washed three times with 1 ml of PBS (five minutes per wash) and the cells were post-fixed for 60 minutes in 200 µL of 1% osmium tetroxide (Sigma–Aldrich, St Louis, MO, USA). The samples were dehydrated in ascending exchanges of ethanol (30%, 50%, and 70%, 2x 95% and 2x 100% - 30 minutes in each solution), then dried with the 1,1,1,3,3,3-hexamethyldisilazane solvent (HMDS - ACROS Organics, Rutherford, NJ, USA) and maintained in a desiccator for one week. The samples were fixed in stubs, metalized with gold, and analyzed in a scanning electron microscope (SEM, JEOL-JMS-T33A Scanning Microscope, JEOL – EUA Inc., Peabody, MA, USA).

Analysis of morphology and elementary chemical composition of dentinal discs by energy-dispersive X-ray spectrometry (EDS)

From 8 human permanent teeth (third molar), eight 0.3-mm-thick dentin discs were obtained through a diamond disc (11-4254, 4"x 0.012"/ 15LC series, Diamond Wafering blade, Buehler Ltda., Lake Bluf, IL, USA) coupled to the appliance for serial cutting (ISOMET 1000, Buehler Ltda., Lake Bluf, IL, USA) for the chemical composition analysis. The discs were removed close to the pulp and the thickness of 0.3mm was used in order to simulate a greater challenge of the pulp tissue, simulating an extremely deep cavity. The dentin disc surfaces were sanded and leveled with 400- and 600-granulation sandpapers (T469-SF- Noton, Saint-Gobam Abrasivos Ltda., Jundiai, SP, Brazil), and during this procedure, the discs were often assessed with the help of a digital caliper (Model 500-144B, Mitutoyo Sul America Ltda. SP, Brazil) to make sure the final thickness would reach 0.3 mm [32]. The discs were divided into four groups

and placed on a 24-well plate (Costar Corp., Cambridge, MA, USA) for the direct application of the product. Aided by an insulin syringe, 270 mg of the material were applied to the occlusal surface of the dentin discs until filling them homogeneously [32]. In group 1, there was no agent application (control); in group 2, 37% phosphoric acid was applied (Condac 37, FGM, Joinville – SC, Brazil) for 15 s; in group 3, Papacarie Duo™ was applied for 30 s; and in group 4, Brix 3000™ was applied for two minutes. These times are the minimum recommended by the manufacturers. After the applications, the discs were washed (three times with distilled water) and subjected to the SEM analysis protocol described previously, except for the fixation phase in 1% osmium tetroxide.

Besides the images produced, there was a chemical analysis produced by SEM with EDS detector (energy-dispersive X-ray detector, Oxford, 51-ADD0048, Cambridge, England), which separates the characteristic X-rays from the different elements in an energy spectrum and allows elementary microanalyses of the sample. The elements considered for the statistical analysis were calcium and phosphorus. For each dentin disc, four different points of the dentin surface were assessed, resulting in a total n of eight per group. The points were standardized, including the central and peripheral region of the dentinal tissue.

Statistical analysis

The data were tabulated in spreadsheets and subjected to analysis in the SPSS version 18.0 statistical software. Respecting the distribution of data, the statistical tests one-way ANOVA complemented by Tukey's test (5% significance) were used for cell cytotoxicity analysis and EDS, and the cytotoxicity data were transformed into a percentage, considering the control group 100%.

Results

Cell cytotoxicity

Cell viability by the methyl-tetrazolium assay - MTT

The results showed that all the dilutions of the different materials differed from the DMEM control group ($p < 0.05$). It was observed that the concentration increase resulted in viability decrease, showing the highest cytotoxicity in the different materials at the 1:20 dilution. However, the viability of cells exposed to the Papacarie Duo material diluted at 1:20 was considerably lower when compared with the Brix 3000 group at the same dilution, with values of 19.8% and 52.5% respectively ($p < 0.05$). The material that came closer to the control was Brix 3000 and the highest viability was obtained at the 1:1000 dilution (81.1%), and there was not a considerable value range. At the highest concentration of the material, viability was 52.5%. In contrast, the Papacarie Duo group showed a higher variation, and the 1:1000 and 1:20 dilutions presented values of 74.7% and 19.8%, respectively (Table 1).

Number of viable cells by the trypan blue assay

As for the trypan blue results, there was a similarity of results in comparison to MTT. Both tests showed that the higher the concentration, the lower the number of viable cells. Moreover, the Brix 3000 material also presented less discrepant values relative to the control group. The 1:1000 dilution of the Brix 3000 material did not show a statistical difference with the control group ($p > 0.05$). The group with the highest concentration of the Papacarie Duo material (1:20) presented the lowest number of viable cells (35.9%), following the pattern of results found in the MTT assay. For each material, there was no statistical difference between the 1:1000 and 1:100 dilutions ($p > 0.05$). The statistical difference only occurred when comparing the material with the lowest and highest concentrations (1:1000 and 1:20, $p < 0.05$) (Table 2).

Morphology of pulp cells by Scanning Electron Microscopy (SEM)

The SEM images of the control group showed normal appearance of primary pulp culture, with a large number of fusiform cells (elongated shape) and cytoplasmic filaments covering the coverslips. In the 1: 1000 dilution for both materials, the images indicated a reduction in the number of cells and the cytoplasmic extensions, in addition to a cellular contraction. These changes are even more evident in the highest concentrations, both of Brix and Papacárie, with an exacerbated decrease in the number of cells and an increase in these morphological changes (Fig. 1).

Elementary analysis by energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS)

It could be observed that for the Ca and P elements in isolation and the Ca/P ratio, there was no difference between the control group and both chemomechanical caries removal agents tested ($p>0.05$). The group treated with acid presented the lowest values of Ca, P, and Ca/P, differing statistically from the other groups ($p<0.05$) (Table 3),

Morphology of dentinal discs by Scanning Electron Microscopy (SEM)

The images obtained for the discs showed a difference in the removal of the smear layer of the Brix 3000 and Papacarie Duo materials compared to the positive control (phosphoric acid), but there was no difference with the negative control (without material application). That is, the phosphoric acid was able to remove a great portion of the smear layer in the dentinal tubules, while the Brix 3000 and Papacarie Duo materials did not present such ability, showing the tubules completely or partially obliterated (Fig. 2).

Discussion

The present study assessed the cytotoxicity of two chemomechanical caries removal agents (Brix 3000™ and Papacarie Duo™) when applied at different dilutions directly to the pulp cells of deciduous teeth, as well as the morphology and chemical composition of the dentin tissue after applying these materials. It has been confirmed that the chemomechanical removal of caries is considered one of the most conservative and effective methods in certain treatments [33] and extensive research has been performed on these removers regarding their clinical efficacy, decrease in patient discomfort, and the long-term success of the procedure [9,10]. However, the presence of studies assessing the effect of chemomechanical caries removal agents on the dentin-pulp complex, especially in deciduous teeth, is still scarce in the literature. Thus, for the safe clinical use of these materials, previous assessments regarding their efficacy in tissue removal and information on the potential effects on pulp tissue become relevant. As for the cytotoxicity of the materials, the null hypothesis was rejected, considering that both materials present cytotoxicity in direct contact. Regarding the dentinal composition after applying the materials, the null hypothesis was accepted because the dentinal structure was not changed by any of the materials tested.

The results of the cytotoxicity tests (MTT and TB) showed that both materials reduced the metabolism and the number of viable cells compared to the control group and that the lower the dilution, the higher the cytotoxicity. These data agree with the study performed by [34], which tested two chemomechanical caries removal agents (Papacarie Duo and Carisolv) in normal and cancerous oral cells. Moreover, it is worth noting that the dilutions used were similar to the dilutions assessed in the present study. Papacarie Duo reduced significantly the number of viable cells, especially at the lowest dilutions. However, even at high dilutions, Papacarie Duo indicated cytotoxicity, differing from Carisolv, which presented low or no reduction of viable cells. In the present study, the Brix 3000 material presented lower

cytotoxicity than Papacarie Duo at all dilutions, which also agrees with a recent study published [28] that performed the MTT assay for the same materials (BX and PD).

Clinically, these data are important because it is known that the cytotoxicity of the material may lead to postoperative sensitivity and pulp necrosis. It is worth noting that dentin permeability and thickness are relevant factors at the moment of application [35]. However, the dentist should use the material with caution to prevent damages to the dentin-pulp complex. Further *in vitro* studies are still required, assessing the transdental action of these materials, as well as clinical studies to understand more precisely the amount of material to be used per session, time of application, and whether the indication should relate to cavity depth. The minimum time of action of the materials for clinical practice is a limiting factor for BX, in which 2 minutes can difficult the management of the patient, especially pediatric, requiring studies evaluating its effectiveness in less time.

Additionally, regarding cytotoxicity in the direct contact of materials, another study showed that chemomechanical caries removal agents such as Papacarie™ may present cytotoxicity for pulp cells [31]. The authors observed that the Papacarie™ material presented cytotoxicity only 50s after application, while after 24 h it was not cytotoxic. It was suggested that the gel presents cytotoxicity only at first, when it is more active, with no ability to damage the pulp tissue after 24 hours.

Regarding the indirect contact of chemomechanical caries removal agents with the pulp tissue, there are still no transdental studies with these materials that provide data for comparison in the current literature. Another observation is that several materials from the clinical practice are not considered cytotoxic for the pulp when analyzed indirectly, as in a study assessing transdental cytotoxicity for three different resin cement on pulp cells. The result showed a decrease in viable cells but it was not sufficient to characterize the material as cytotoxic [36], which according to the safety recommendations of the ISO 10993-5: 1999 (E),

to be considered cytotoxic, there must be a reduction of at least 30% of viable cells. Transdental studies with materials used for pulp capping have shown that there is also no decrease in cell viability, as seen in the study by Cavalcanti et al. (2005) [37], concluding that the materials would not be able to release cytotoxic substances to the pulp tissue. The cytotoxicity assessment in bleaching agents is also performed often because these materials present high diffusion in the dental tissue. A recent study showed cytotoxicity for some bleaching agents even with the dentin barrier of 2 mm, but it did not present a correlation between the amount of peroxide disseminated and the product concentration [38]. That is, a certain bleaching gel assessed, even at equal concentrations of the others, presented higher diffusion in the dentinal tissue and therefore higher cytotoxicity for pulp cells. In the same study, the gel that presented a higher decrease in cell viability when tested *in vivo* (rats), presented severe necrosis of the crown and root pulp [38].

For an analysis of the morphological aspect of pulp cells obtained by SEM, there were no differences between both materials but the morphological difference of the cells compared to the control group is evident. After the contact with both materials, there is a decrease in the number of cells and changes in the morphology, confirming the presence of cell stress. The SEM, in this case, is a complementary test to the cell cytotoxicity tests. Despite the lack of similar studies performed with chemomechanical caries removal agents in the literature, it is of utmost importance to perform these tests in combination because they make the results related to cytotoxicity more real and representative.

At MEV evaluating dentinal discs, the phosphoric acid was used as a positive control because it is known that acid-etching promotes great smear layer removal from the dentinal tubules and dentinal demineralization [39]. The present study assessed whether the smear layer removal would be similar to the positive control. The images produced when the cells were exposed to the materials, following the minimum time recommended by the manufacturer,

showed no differences between the chemomechanical caries removal agents and the negative control group (absence of material). That is, the removers were not able to unblock the dentinal tubules. A strong similarity is observed for the dentin treated with Papacarie Duo and Brix 3000 to the untreated dentin, showing that the materials tested do not interfere significantly with the tubular dentin surface.

The assessments of Ca and P, as well as the Ca/P ratio allows establishing a reliable pattern of behavior of the chemical elements in the dentin, regardless of the variation of the other elements [40]. The values of the ratio found in the present study agree with other studies performed [41, 42]. As for the Ca/P ratio to acid, it was observed a decrease of this ratio compared to the healthy dentin, which is probably due to the composition of the material itself. This has also been evidenced in a recent study but the methodology is not similar to the one used in this study [39].

It was observed that the levels of calcium and phosphorus, for both materials, did not differ statistically from the control group (untreated dentin). This shows that current chemomechanical caries removal agents cannot change the dentin structure, which agrees with studies in the literature performed with other chemomechanical caries removal agents [10, 43, 44].

Considering several methodologies, the EDS presents some limitations. First, there may occur false-positive results from the high penetration of energy, but precision may reach 91-95%. Moreover, the radiation absorbed is only around 1% but increasing this dose may result in damages to the sample [45]. Additionally, because it is a laboratory study, the data presented cannot be extrapolated directly to the dental clinic and further laboratory and clinical studies are required aiming at the production of a usage protocol for chemomechanical caries removal agents able to remove effectively the carious tissue without damaging the pulp tissue, considering the principles of minimally invasive caries excavation techniques.

Conclusion

The Papacarie Duo and Brix 3000 chemomechanical caries removal agents presented cytotoxicity in the direct contact with the pulp cells from deciduous teeth. The Brix 3000 material presented less cytotoxicity than Papacarie Duo. Both materials could not change significantly the dentinal structure.

Ethics declarations

Ethics approval

The local ethics committee approved the study (Certificate of Presentation for Ethical Consideration: 07067018.4.0000.5152).

Consent for publication

Not applicable.

Availability of data and materials

The datasets of this article are available from the corresponding author on reasonable request.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Funding

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001 and CNPq.

Abbreviations

BX	Brix 3000
PD	Papacarie Duo
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
MTT	Methyl-tetrazolium assay
TB	Trypan blue
SEM	Scanning Electron Microscopy
EDX	Energy dispersive X-ray spectrometry
CRIS	Checklist for Reporting <i>In vitro</i> Studies
ISO	International Organization Standardization
CPDDs	Pulp cells of deciduous teeth
TB	Trypan Blue
PBS	Phosphate buffered saline
HMDS	Hexamethyldisilazane

Authors' contributions

FRG, JFSB and **GLS**: Methodology, Investigation., Writing- Original draft preparation. **CCGM**: Methodology and Writing - Reviewing and Editing. **LRP**: Methodology and Writing - Reviewing and Editing. **APTH**: Conceptualization, Visualization, Data curation, Formal analysis, Supervision, Writing- Original draft preparation. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This project was developed on CPBio - Biomechanics, Biomaterials and Cell Biology Research Center, Multiuser laboratory of the Institute of Chemistry and Faculty of Chemical Engineering, both of the Federal University of Uberlândia. The research was financed in part

by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001 and CNPq.

References

1. Richards D. Oral diseases affect some 3.9 billion people. *Evid Based Dent.* 2013; 14(2):35. <https://doi.org/10.1038/sj.ebd.6400925>
2. Fusayama, T. Two layers of carious dentin: diagnosis and treatment. *Oper. Dent.*, Seattle, v. 4, n. 2, p. 63 -70, Spring 1979.
3. L. Bjørndal, E. Kidd, The treatment of deep dentine caries lesions, *Dental Update* 32 (2005) 402-04, 07-10, 13. <https://doi.org/10.12968/denu.2005.32.7.402>
4. L. Bjørndal, H. Fransson, G. Bruun, M. Markvart, M. Kjaeldgaard, P. Nasman, et al., Randomized clinical trials on deep carious lesions: 5-year follow-up, *J. Dent Res.* 96 (2017) 747–753. <https://doi.org/10.1177/0022034517702620>
5. Iwami Y, Shimizu A, Narimatsu M, Hayashi M, Takeshige F, Ebisu S. Relationship between bacterial infection and evaluation using a laser fluorescence device, *DIAGNOdent. Eur J Oral Sci.* 2004;112(5):419-23. doi: 10.1111/j.1600-0722.2004.00161.x.
6. Ngo HC, Mount G, Mc Intyre J, Tuisuva J, Von Doussa RJ. Chemical Exchange between glass-ionomer restorations and residual carious dentine in permanent molars: an in vivo study. *J Dent.* 2006;34(8):608-13. doi: 10.1016/j.jdent.2005.12.012
7. Beeley JA, Yip HK, Stevenson AG. Chemochemical caries removal: a review of the techniques and latest developments. *Br Dent J.* 2000;188(8):427-30.doi: 10.1038/sj.bdj.4800501
8. Maltz M, de Oliveira EF, Fontanella V, Bianchi R. A clinical, microbiologic, and radiographic study of deep caries lesions after incomplete caries removal. *Quintessence Int.* 2002;33(2):151-9.

9. Bussadori SK, Castro LC, Galvão AC. Papain gel: a new chemomechanical caries removal agent. *J Clin Pediatr Dent.* 2005;30(2):115-9.doi: 10.17796/jcpd.30.2.xq641w720u101048.
10. Bittencourt ST, Pereira JR, Rosa AW, Oliveira KS, Ghizoni JS, Oliveira MT. Mineral content removal after Papacarie application in primary teeth: a quantitative analysis. *J Clin Pediatr Dent.* 2010;34(3):229-31.doi: 10.17796/jcpd.34.3.k15t8q1805538524.
11. Halabi M, Salami A, Alnuaimi E, Kowash M, Hussein I. Assessment of paediatric dental guidelines and caries management alternatives in the post COVID-19 period. A critical review and clinical recommendations [published online ahead of print, 2020 Jun 16]. *Eur Arch Paediatr Dent.* 2020;1-14.
12. Decup F, Lasfargues JJ. Minimal intervention dentistry II: part 4. Minimal intervention techniques of preparation and adhesive restorations. The contribution of the sono-abrasive techniques. *Br Dent J.* 2014;216(7):393-400.doi: 10.1038/sj.bdj.2014.246
13. Jew J, Chan KH, Darling CL, Fried D. Selective removal of natural caries lesions from dentin and tooth occlusal surfaces using a diode-pumped Er:YAGlaser. *Proc SPIE Int Soc Opt Eng.* 2017;10044:100440I. doi: 10.1117/12.2256728
14. Safwat O, Elkateb M, Dowidar K, Salam HA, El Meligy O. Microbiological Evaluation of Ozone on Dentinal Lesions in Young Permanent Molars using the Stepwise Excavation. *J Clin Pediatr Dent.* 2018;42(1):11-20.doi: 10.17796/1053-4628-42.1.3
15. Deng Y, Feng G, Hu B, Kuang Y, Song J. Effects of Papacarie on children with dental caries in primary teeth: a systematic review and meta-analysis. *Int J Paediatr Dent.* 2018;28(4):361-72. doi: 10.1111/ipd.12364
16. Anusavice KJ, Kincheloe JE. Comparison of pain associated with mechanical and chemomechanical removal of caries. *J Dent Res* 1987;66(11):1680-3.
doi: 10.1177/00220345870660111501

17. Pandit IK, Srivastava N, Gugnani N, Gupta M, Verma L. Various methods of caries removal in children: a comparative clinical study. *J Indian Soc Pedod Prev Dent* 2007;25(2):93-6
doi: 10.4103/0970-4388.33456.
18. Abdul Khalek AMG, Elkateb MA, Abdel Aziz WE, El Tantawi M. Effect of Papacarie and Alternative Restorative Treatment on Pain Reaction during Caries Removal among Children: A Randomized Controlled Clinical Trial. *J Clin Pediatr Dent*. 2017;41(3):219-24. doi: 10.17796/1053-4628-41.3.219.
19. Boob AR, Manjula M, Reddy ER, Srilaxmi N, Rani T. Evaluation of the Efficiency and Effectiveness of Three Minimally Invasive Methods of Caries Removal: An in vitro Study. *Int J Clin Pediatr Dent*. 2014;7(1):11-8. doi: 10.5005/jp-journals-10005-1226
20. Hamama HH, Yiu CK, Burrow MF, King NM. Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Clinical Trials on Chemomechanical Caries Removal.
Oper Dent. 2015;40(4):167-78. doi: 10.2341/14-021-lit
21. Habib CM, Kronman J, Goldman MA. A chemical evaluation of collagen and hydroxyproline alter treatment with GK-101(Nchloroglycine). *Pharmacol Ther Dent* 1975;2(3-4):209–15.
22. Cecchin D, Farina AP, Orlando F, Brusco EH, Carlini B. Effect of carisolv and papacarie on the resin-dentin bond strength in sound and caries-affected primary molars. *Braz J Oral Sci*. 2010;9(1):25-9.
23. Ricketts DNJ, Pitts NB. Novel operative treatment options. *Monogr Oral Sci*. 2009;21:174-87.
doi:10.1159/000224222
24. Motta LJ, Martins MD, Porta KP, Bussadori SK. Aesthetic restoration of deciduous anterior teeth after removal of carious tissue with Papacárie. *Indian J Dent Res*. 2009;20(1):117-20.
doi: 10.4103/0970-9290.49060

25. Bussadori SK, Guedes CC, Bachiega JC, Santis TO, Motta LJ. Clinical and radiographic study of chemical-mechanical removal of caries using Papacárie: 24-month follow up. *J Clin Pediatr Dent.* 2011;35(3):251-4. doi: 10.17796/jcpd.35.3.75803m02524625h5
26. Alhumaid J, Al-Harbi F, El Tantawi M, Elembaby A. X-ray microtomography assessment of Carisolv and Papacarie effect on dentin mineral density and amount of removed tissue. *Acta Odontol Scand.* 2018;76(4):236-40. doi: 10.1080/00016357.2017.1406614.
27. Hegde S, Kakti A, Bolar DR, Bhaskar SA. Clinical Efficiency of Three Craies Removal Systems: Rotary Excavation, Carisolv and Papacarie. *J Dent Child (Chic).* 2016;83(1):22-8.
28. Santos TML, Bresciani E, Matos FS, Camargo SEA, Hidalgo APT, Rivera LML, Bernardino IM, Paranhos LR. Comparison between conventional and chemomechanical approaches for the removal of carious dentin: an in vitro study. *Sci Rep.* 2020;10(1):8127. doi: 10.1038/s41598-020-65159-x.
29. Krithikadatta J, Gopikrishna V, Datta, M. CRIS guidelines (checklist for reporting in-vitro studies): a concept note on the need for standardized guidelines for improving quality and transparency in reporting in-vitro studies in experimental dental research. *J Conserv Dent.* 2014;17(4):301-4. <https://doi.org/10.4103/0972-0707.136338>
30. S. Gronthos, M. Mankani, J. Brahim, P.G. Robey, S. Shi, Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(25):13625-30. doi:10.1073/pnas.240309797.
31. Miyagi SPH, Mello I, Bussadori SK, Marques MM. Resposta de fibroblastos pulpares humanos em cultura ao gel de papacárie®. *Revista de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo.* 2006;18(3):245-9.
32. Huck C. Efeito citotóxico transdentinário do peróxido de hidrogênio em diferentes concentrações sobre células de linhagem odontoblástica MDPC-23. 2005. 167 f. Dissertação

(mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2005.
Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/89642>>.

33. Bohari MR, Chunawalla YK, Ahmed BM. Clinical evaluation of caries removal in primary teeth using conventional, chemomechanical and laser technique: an in vivo study. *J Contemp Dent Pract.* 2012;13(1):40-7. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10024-1093>
34. Garcia-Contreras R, Scougall-Vilchis RJ, Contreras-Bulnes R, Kanda Y, Nakajima H, Sakagami H. Cytotoxicity and pro-inflammatory action of chemomechanical caries-removal agents against oral cells. *In Vivo.* 2014;28(4):549-56.
35. Costa CA, Ribeiro AP, Giro EM, Randall RC, Hebling J. Pulp response after application of two resin modified glass ionomer cements (RMGICs) in deep cavities of prepared human teeth. *Dent Mater* 2011;27(7):e158-70. doi: 10.1016/j.dental.2011.04.002
36. da Fonseca Roberti Garcia L, Pontes EC, Basso FG, Hebling J, de Souza Costa CA, Soares DG. Transdentinal cytotoxicity of resin-based luting cements to pulp cells. *Clin Oral Investig.* 2016; 20(7):1559-66. doi: 10.1007/s00784-015-1630-1
37. Cavalcanti BN, Rode SM, Marques MM. Cytotoxicity of substances leached from pulp capping materials. *Int Endod J.* 2005;38(8):505-9. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2005.00967.x>
38. Llena C, Collado-González M, García-Bernal D, et al. Comparison of diffusion, cytotoxicity and tissue inflammatory reactions of four commercial bleaching products against human dental pulp stem cells. *Sci Rep.* 2019;9(1):7743. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44223-1>
39. de Los Angeles Moyaho-Bernal M, Contreras-Bulnes R, Rodríguez-Vilchis LE, Rubio-Rosas E, Scougall-Vilchis RJ, Centeno-Pedraza C. Morphological and chemical changes in human deciduous dentin after phosphoric acid, self-etching adhesive and Er: YAG laser conditioning. *Microsc Res Tech.* 2018;81(5):494-501. <https://doi.org/10.1002/jemt.23003>
40. Zamudio-Ortega, C. M., Contreras-Bulnes, R., Scougall-Vilchis, R. J., Morales-Luckie, R. A., Olea-Mejía, O. F., Rodríguez-Vilchis, L. E., & García-Fabila, M. M. (2014). Morphological

and Chemical Changes of Deciduous Enamel Produced by Er:YAG Laser, Fluoride, and Combined Treatment. *Photomed Laser Surg.* 2004;32(5):252-9 doi: 10.1089/pho.2013.3622

41. Arnold WH, Gaengler P. Quantitative analysis of the calcium and phosphorus content of developing and permanent human teeth. *Ann Anat* 2007;189:183-90. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2006.09.008>
42. Hossain M, Nakamura Y, Tamaki Y, Yamada Y, Jayawardena JA, Matsumoto K. Dentinal composition and Knoop hardness measurements of cavity floor following carious dentin removal with Carisolv. *Oper Dent* 2003;28:346-51.
43. Yip HK, Beeley JA, Stevenson AG. Mineral content of the dentine remaining after chemomechanical caries removal. *Caries Res.* 1995;29:111–117. <https://doi.org/10.1159/000262051>
44. Arvidsson A, Liedberg B, Moller K, Lyven B, Sellen A, Wennerberg A. Chemical and topographical analyses of dentine surfaces after Carisolv treatment. *J Dent* 2002;30:67-75. [https://doi.org/10.1016/S0300-5712\(01\)00051-3](https://doi.org/10.1016/S0300-5712(01)00051-3)
45. Zierold K. Limitations and prospects of biological electron probe X-ray microanalysis. *J Trace Microprobe T.* 2002;20:181-196. <https://doi.org/10.1081/TMA-120003723>

Tables

Table 1: Cell viability (MTT) presented by the pulp cells of deciduous teeth, considering the different dilutions and materials used

Dilution (in DMEM)	Material		
	Control (DMEM)	BX	PD
1:1000	100.00 (6.1) A a*	81.1 (9.3) B a	74.7 (3.6) C a
1:100	100.00 (6.1) A a	71.3 (5.9) B b	44.7 (8.0) C b
1:20	100.00 (6.1) A a	52.5 (5.8) B c	19.8 (6.3) C c

* Values represent mean and standard deviation. Capital letters allow comparisons in the rows and lower-case letters allow comparisons in the columns. One-way ANOVA ($p < 0.05$), $n=8$. BX - Brix 3000, PD - Papacarie Duo.

Table 2: Number of viable cells by the trypan blue assay presented by the pulp cells of deciduous teeth, considering the different dilutions and materials used

Dilution (in DMEM)	Material		
	Control (DMEM)	BX	PD
1:1000	100.00 (16.1) A a	82.8 (9.3) A a	59.3 (3.6) B a
1:100	100.00 (16.1) A a	64.0 (5.9) B ab	46.8 (8.0) B ab
1:20	100.00 (16.1) A a	57.8 (5.9) B b	35.9 (9.3) C b

* Values represent mean and standard deviation. Capital letters allow comparisons in the rows and lower-case letters allow comparisons in the columns. One-way ANOVA ($p < 0.05$), $n=8$. BX - Brix 3000, PD - Papacarie Duo.

Table 3: Rates of the specific elements (calcium, phosphorus, and Ca/P ratio) found in the dentinal discs through the EDS analysis, at the minimum time recommended by the manufacturer

Groups	Ca	P	Ca/P
Control	31.01 (0.89) A	15.39 (0.57) A	2.02 (0.10) A
Papacarie manufacturer	31.39 (1.76) A	15.76 (0.88) A	1.99 (0.05) A
Brix manufacturer	30.63 (1.92) A	14.81 (0.52) A	2.07 (0.09) A
37% phosphoric acid	10.31 (2.88) B	10.43 (1.58) B	1.00 (0.28) B

* Values represent mean and standard deviation. Different letters represent statistically different values and allow comparisons in the columns. One-way ANOVA, Tukey, n=8.

Figures

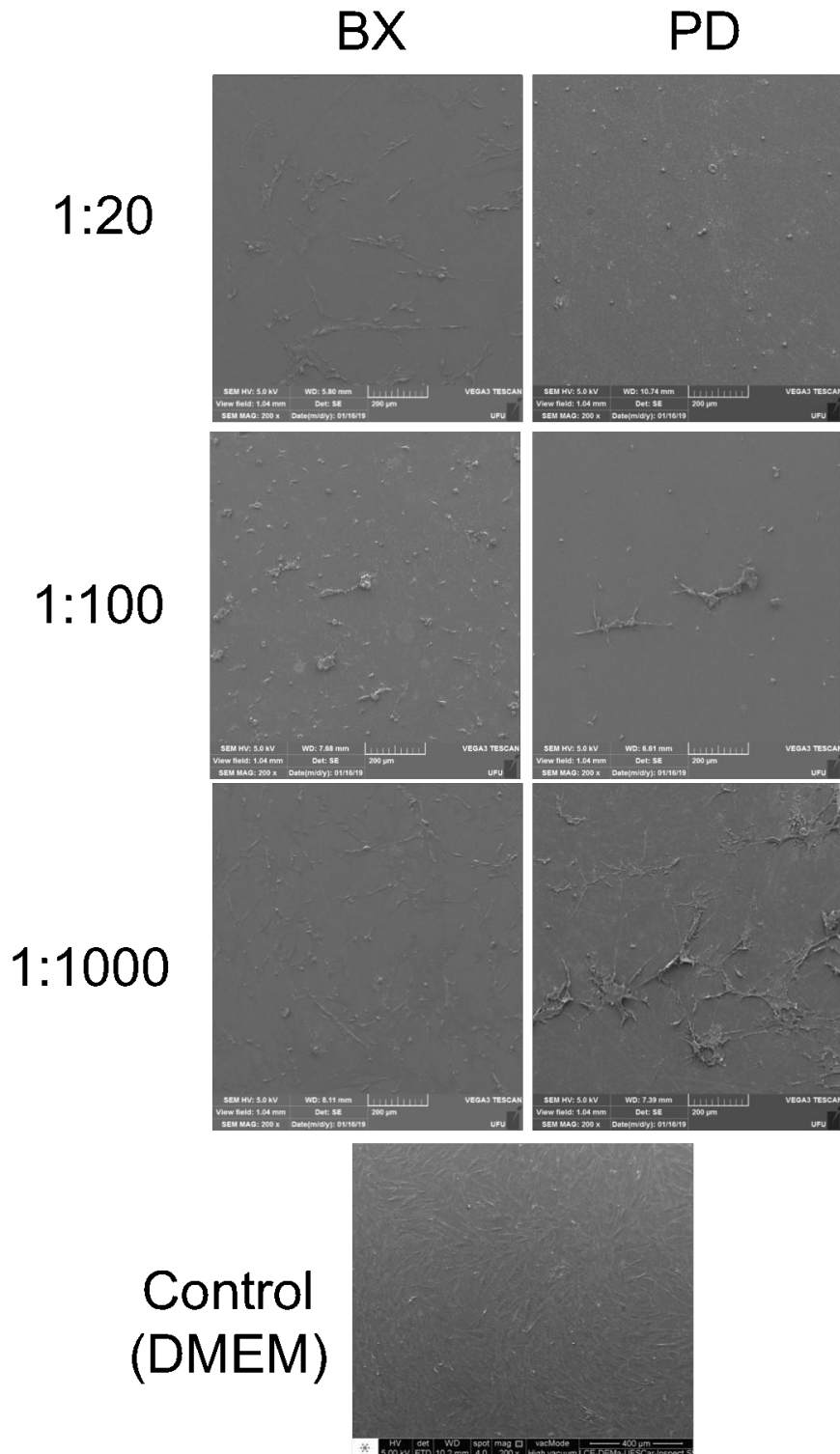


Fig.1 Images representative of pulp cells obtained by scanning electron microscopy after applying the different materials (Brix 3000 - BX and Papacarie Duo - PD) and there concentrations (1:20, 1:100 and 1:1000) in comparison with the control group. (500x magnification and 5.0 kV).

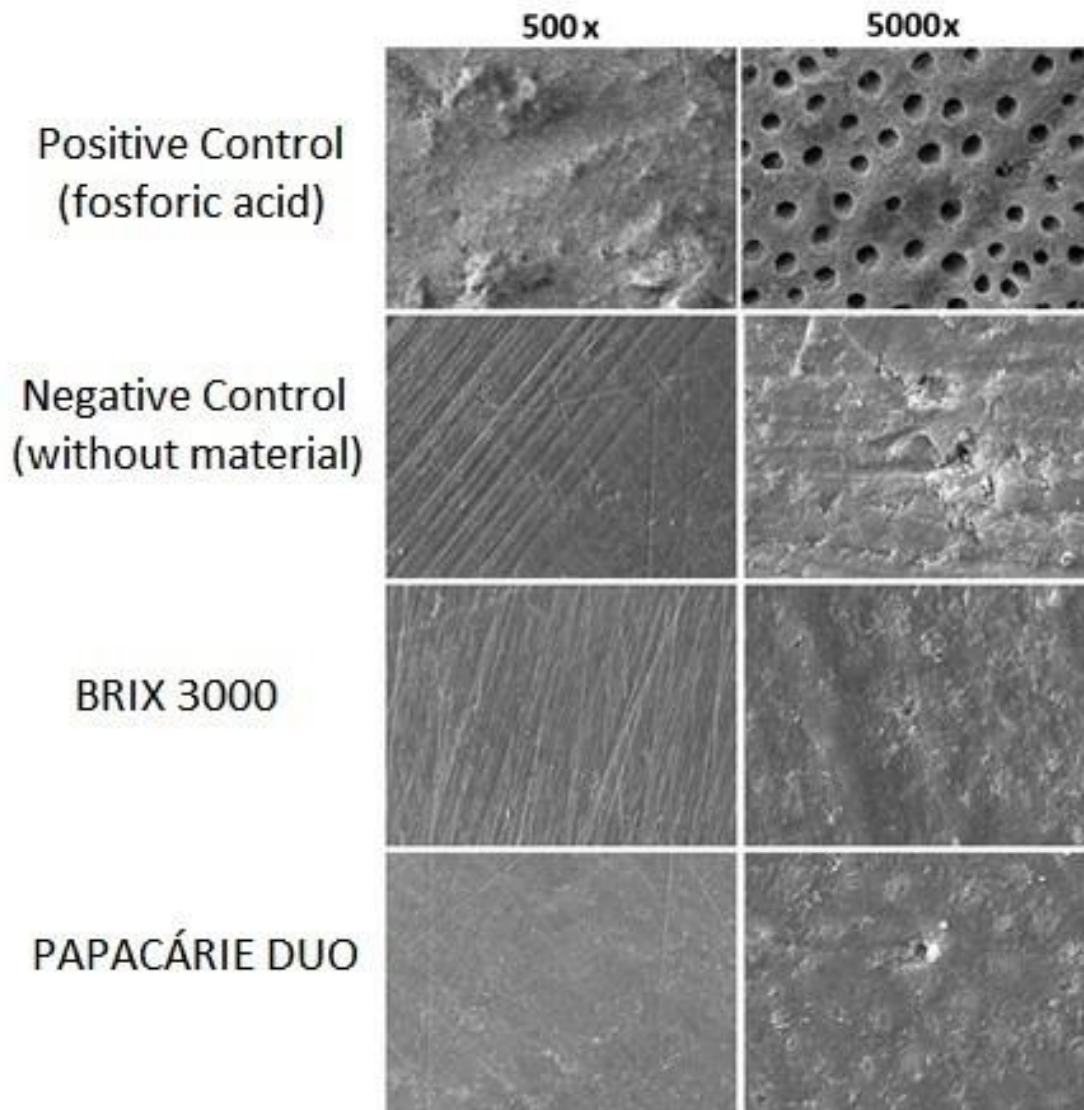


Fig.2 Morphological aspect of the dentinal tubules in the discs obtained by scanning electron microscopy after applying the different materials (Brix 3000, Papacarie Duo, and phosphoric acid), at the minimum times indicated by the manufacturers and the negative control group (without material application), magnifications of 500x and 5000x.

Referências

1. Bussadori SK, Castro LC, Galvão AC. Papain gel: a new chemomechanical caries removal agent. *J Clin Pediatr Dent.* 2005;30(2):115-9. <https://doi.org/10.17796/jcpd.30.2.xq641w720u101048>
2. Araújo NC, Oliveira APB, Rodrigues VMS, Andrade PMMS. Avaliação do selamento marginal de Restaurações adesivas após o uso de gel de papaína. *Pesq Bras Odontoped Clín Integr.* 2007; 1(7): 67-73. <https://doi.org/10.4034/1519.0501.2007.0071.0010>
3. Fusayama, T. Two layers of carious dentin; diagnosis and treatment. *Oper Dent* 1979;4:63-70.
4. Martins, MD; Fernandes, KP; Motta, LJ; Santos, EM; Pavesi, VC; Bussadori, SK. Biocompatibility analysis of chemomechanical caries removal material Papacárie on cultured fibroblasts and subcutaneous tissue. *J Dent Child (Chic)* 2009;76:123-129.
5. Croft K, Kervanto-Seppälä S, Stangvaltaite L, Kerosuo E. Management of deep carious lesions and pulps exposed during carious tissue removal in adults: a questionnaire study among dentists in Finland. *Clin Oral Investig.* 2019; 23(3): 1271-80. <https://doi.org/10.1007/s00784-018-2556-1>
6. L. Bjørndal, E. Kidd, The treatment of deep dentine caries lesions, *Dental Update* 32 (2005) 402-04, 07-10, 13. <https://doi.org/10.12968/denu.2005.32.7.402>
7. L. Bjorndal, H. Fransson, G. Bruun, M. Markvart, M. Kjaeldgaard, P. Nasman, et al., Randomized clinical trials on deep carious lesions: 5-year follow-up, *J. Dent Res.* 96 (2017) 747–753. <https://doi.org/10.1177/0022034517702620>
8. Hamama, H; You, C; Burrow, MF; King, NM. Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Clinical Trials on Chemomechanical Caries Removal. *Oper Dent.* 2015;40:e167-178. <https://doi.org/10.2341/14-021-LIT>
9. Santos TML, Bresciani E, Matos FS, Camargo SEA, Hidalgo APT, Rivera LML, Bernardino IM, Paranhos LR. Comparison between conventional and chemomechanical approaches for the removal of carious dentin: an in vitro study. *Sci Rep.* 2020;10(1):8127. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65159-x>
10. Motta LJ, Martins MD, Porta KP, Bussadori SK. Aesthetic restoration of deciduous anterior teeth after removal of carious tissue with Papacárie. *Indian J Dent Res.* 2009 Jan-Mar;20(1):117-20. <https://doi.org/10.4103/0970-9290.49060>

11. Goyal, PA; Kumari, R; Kannan, VP; Madhu, S. Efficacy and tolerance of papain gel with conventional drilling method: a clinico-microbiological study. *J Clin Pediatr Dent* 2015;39:109-112. <https://doi.org/10.17796/jcpd.39.2.n25754863557k727>
12. Motta, LJ; Bussadori, SK; Campanelli, AP; Silva, AL; Alfaya, TA; Godoy, CH; et al Randomized controlled clinical trial of long-term chemo-mechanical caries removal using Papacarie™ gel. *J Appl Oral Sci* 2014;22:307-313. <https://doi.org/10.1590/1678-775720130488>
13. Hegde S, Kakti A, Bolar DR, Bhaskar SA. Clinical Efficiency of Three Caries Removal Systems: Rotary Excavation, Carisolv, and Papacarie. *J Dent Child (Chic)*. 2016;83(1):22-28

ANEXO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação in vitro da citotoxicidade e da modulação inflamatória de diferentes removedores químico-mecânicos de tecido cariado sobre células pulpares de dentes decíduos humanos

Pesquisador: Ana Paula Turrioni Hidalgo

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 07067018.4.0000.5152

Instituição Proponente: FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.221.249

Apresentação do Projeto:

Trata-se de análise de respostas às pendências apontadas no parecer consubstanciado número 3.151.210, de 18 de Fevereiro de 2019.

Diversos materiais têm sido propostos para a remoção químico-mecânica do tecido cariado. avaliar in vitro a citotoxicidade e a modulação inflamatória de dois diferentes removedores quimicomecânicos de tecido cariado, Papacárie® e Brix 3000®, sobre células pulpares de dentes decíduos humanos. Os grupo experimentais e controle serão distribuídos da seguinte maneira: Controle (DMEM), Brix..10% (original), Brix..10% (1:1), Brix..10% (1:2), Brix..10% (1:4), Papacarie 3% (original), Papacarie 3% (1:1), Papacarie 3% (1:2), Papacarie 3% (1:4), Controle positivo (LPS).

Forma de abordagem e recrutamento dos participantes: Na Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia são realizados procedimentos odontopediátricos, dentre eles a extração indicada de dentes decíduos próximos ao período de esfoliação. A partir desses pacientes, três dentes hígidos serão coletados. Os dentes serão doados pelos responsáveis dos pacientes que assinarão um termo de doação e consentimento. Essa quantidade de dentes é considerada representativa de acordo com a literatura (Turrioni et.al., 2017). Logo após a extração, os dentes serão colocados dentro de um tubo Falcon contendo meio

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica **CEP:** 38.408-144
UF: MG **Município:** UBERLANDIA
Telefone: (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4335 **E-mail:** cep@propp.ufu.br

Continuação do Parecer: 3.221.249

de cultura e instantaneamente levados para o LABIOCEL - Laboratório de Biomateriais e Biomimetismo celular.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

O objetivo da presente pesquisa será avaliar o efeito no uso dos agentes Brix 3000® e Papacárie® para remoção químico-mecânica do tecido cariado em dentes decíduos.

Objetivos Secundários:

- Avaliar a citotoxicidade dos agentes Brix 3000® e Papacárie® para células pulpares de dentes decíduos através dos testes de MTT, Trypan Blue e Microscopia Eletrônica de Varredura.
- Avaliar as propriedades antiinflamatórias dos agentes Brix 3000 e Papacárie® sobre células pulpares através da quantificação de óxido nítrico e de espécie reativa de oxigênio, bem como a expressão gênica por PCR em tempo real das citosinas IL6, IL 8 e IL1-b.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo os pesquisadores:

Os riscos que o menor irá correr serão os mesmos decorrentes da cirurgia para extração de dentes decíduos. Os riscos decorrentes do procedimento de extração do dente decíduo envolvem: sangramento, dor localizada, formação de edema, inflamação gengival e danos ao germe do dente permanente sucessor. Para que estes riscos sejam minimizados, a técnica cirúrgica será realizada de forma minuciosa, evitando a dilaceração dos tecidos e um longo período de exposição ao procedimento cirúrgico. Caso alguma das complicações citadas ocorra, os pesquisadores se responsabilizarão pelo atendimento e acompanhamento do caso até que o quadro do participante apresente melhoras.

Além disso, como em toda a pesquisa, existe o risco da identificação do participante.

Com o objetivo de minimizar o risco de identificação dos pacientes, será atribuído um código numérico para cada participante/dente, o qual será utilizado para anotações nos instrumentos de coleta de dados e para controle no armazenamento das células. Além disso, nenhum dado que favoreça a identificação do paciente será coletado (ex: nome, número de documento, endereço).

Não há benefício direto ao participante da pesquisa, porém os testes realizados irão aprimorar os procedimentos para remoção químico-mecânica da cárie, beneficiando assim futuros pacientes

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica **CEP:** 38.408-144
UF: MG **Município:** UBERLÂNDIA
Telefone: (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4335 **E-mail:** cep@propp.ufu.br

Continuação do Parecer: 3.221.249

que terão a lesão cariiosa diagnosticada. Além disso, essa pesquisa possui uma importância de cunho sócio-econômico, visto que haverá mais opções de tratamento no mercado para remoção seletiva da cárie de forma menos invasiva e traumática.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa acadêmica para avaliar os efeitos citotóxicos de materiais utilizados para remoção do tecido cariado.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências apontadas no parecer consubstanciado número 3.151.210, de 18 de Fevereiro de 2019, foram atendidas.

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/12, o CEP manifesta-se pela aprovação do protocolo de pesquisa proposto.

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com seres humanos, nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

Considerações Finais a critério do CEP:

Data para entrega de Relatório Parcial ao CEP/UFU: Maio de 2020.

Data para entrega de Relatório Final ao CEP/UFU: Maio de 2021.

OBS.: O CEP/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEP PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

O CEP/UFU lembra que:

a- segundo a Resolução 466/12, o pesquisador deverá arquivar por 5 anos o relatório da pesquisa e os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, assinados pelo sujeito de pesquisa.

b- poderá, por escolha aleatória, visitar o pesquisador para conferência do relatório e documentação pertinente ao projeto.

c- a aprovação do protocolo de pesquisa pelo CEP/UFU dá-se em decorrência do atendimento a

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica **CEP:** 38.408-144
UF: MG **Município:** UBERLÂNDIA
Telefone: (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4335 **E-mail:** cep@propp.ufu.br

Continuação do Parecer: 3.221.249

Resolução CNS 466/12, não implicando na qualidade científica do mesmo.

Orientações ao pesquisador :

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 466/12) e deve receber uma via original do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado.
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS 466/12), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa que requeiram ação imediata.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS 466/12). É papel de o pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprobatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res.251/97, item III.2.e).

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_1228991.pdf	11/03/2019 15:58:02		Aceito
Outros	carta_resposta_CEP.docx	11/03/2019 15:56:57	Ana Paula Turrioni Hidalgo	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	termo_de_consentimento_alterado.docx	11/03/2019 15:56:26	Ana Paula Turrioni Hidalgo	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento /	termo_de_assentimento.doc	11/03/2019 15:56:17	Ana Paula Turrioni Hidalgo	Aceito

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica **CEP:** 38.408-144
UF: MG **Município:** UBERLÂNDIA
Telefone: (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4335 **E-mail:** cep@propp.ufu.br

Continuação do Parecer: 3.221.249

Justificativa de Ausência	termo_de_assentimento.doc	11/03/2019 15:56:17	Ana Paula Turrioni Hidalgo	Aceitc
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_FINAL_APOS_CEP_2.docx	11/03/2019 15:56:04	Ana Paula Turrioni Hidalgo	Aceitc
Outros	COLETA_DE_DADOS.pdf	04/02/2019 17:06:15	Ana Paula Turrioni Hidalgo	Aceitc
Outros	Lattes.pdf	01/10/2018 09:23:12	Ana Paula Turrioni Hidalgo	Aceitc
Declaração de Pesquisadores	equipe.pdf	01/10/2018 09:22:18	Ana Paula Turrioni Hidalgo	Aceitc
Declaração de Instituição e Infraestrutura	instituicao.pdf	01/10/2018 09:22:00	Ana Paula Turrioni Hidalgo	Aceitc
Folha de Rosto	folha_de_rosto.pdf	01/10/2018 09:20:51	Ana Paula Turrioni Hidalgo	Aceitc

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

UBERLANDIA, 25 de Março de 2019

Assinado por:

Karine Rezende de Oliveira
(Coordenador(a))

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica **CEP:** 38.408-144
UF: MG **Município:** UBERLANDIA
Telefone: (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4335 **E-mail:** cep@propp.ufu.br