

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO

Gabriele Nichetti Vanin

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIMICROBIANA E
CITOTOXICIDADE DE SOLUÇÃO DE ÁCIDO HIPOCLOROSO
OBTIDA A PARTIR DE DISPOSITIVO ELETROLÍTICO EM
COMPARAÇÃO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE
HIPOCLORITO DE SÓDIO**

Passo Fundo

2023

Gabriele Nichetti Vanin

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIMICROBIANA E CITOTOXICIDADE
DE SOLUÇÃO DE ÁCIDO HIPOCLOROSO OBTIDA A PARTIR DE
DISPOSITIVO ELETROLÍTICO EM COMPARAÇÃO COM
DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE HIPOCLORITO DE SÓDIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade de Passo Fundo, para obtenção do título de Mestre em Odontologia – área de Concentração em Clínica Odontológica, sob orientação do prof. Dr. Matheus Albino Souza e coorientação do prof. Dr. Liviu Steier.

Passo Fundo

2023

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

Gabriele Nichetti Vanin

Nascida em 08 de abril de 1998, na cidade de Passo Fundo/RS, a autora deste trabalho é cirurgiã-dentista formada pela Universidade de Passo Fundo (UPF) em 15 de janeiro de 2021, e realizou seu trabalho de conclusão de curso intitulado “Avaliação da capacidade de remoção de *smear layer* de um novo irrigante final por meio da microscopia eletrônica de varredura – estudo *in vitro*”, sob orientação do Prof. Dr. Matheus Albino Souza. Dentre todas as atividades realizadas no período de graduação, atuou como bolsista no Programa de Educação pelo Trabalho para Saúde (PET-Saúde) do governo federal em parceria com a UPF, desenvolvendo trabalhos multiprofissionais em uma Unidade Básica de Saúde da cidade de Passo Fundo. Também fez parte do grupo de pesquisa do Prof. Dr. Matheus Albino Souza, realizando trabalhos na área da endodontia. Alcançou o seu título de Especialista em Endodontia pela UPF em 24 de fevereiro de 2023. Atualmente realiza, em consultório privado, atendimentos clínicos referentes à terapia endodôntica.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Elisete Nichetti Vanin e Vanderlei Luís Vanin, e meu irmão Luís Eduardo Vanin, por todo apoio e suporte durante estes dois anos de mestrado. Esta conquista só foi possível graças a toda ajuda que recebi deles, abdicando de seus sonhos para se dedicarem aos meus. Obrigada por terem despertado em mim a sede pelo conhecimento e pela evolução constante, sem vocês nada disso teria sido possível.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Matheus Albino Souza, por todas as oportunidades e as portas que abriu durante minha jornada acadêmica, confiando em meu trabalho e me ensinando tanto sobre endodontia e docência desde a graduação até a especialização e mestrado. Desejo um dia conseguir ser pelo menos um pouco do profissional que és e espero poder retribuir o tanto que fizestes por mim nesses anos. Serei eternamente grata pelo apoio e confiança.

Aos meus colegas, que dividiram comigo momentos felizes e tristes, que compartilharam seus conhecimentos sobre a odontologia e também sobre a vida, e que me ensinaram tanto nesses últimos dois anos. Agradeço sempre por ter conhecido cada um de vocês e todos de alguma forma contribuíram para que eu pudesse chegar até aqui. Uma turma excepcional, com pessoas muito competentes e que terão um futuro brilhante pela frente. Foi um prazer imenso dividir estes dois anos de mestrado com vocês, levarei todos sempre em meu coração e sentirei muita saudade.

À minha amiga e colega, Mylena Lazareti Zanella, minha companheira desde a graduação e que compartilhou este projeto comigo. Palavras não são capazes de expressar o quanto sou grata por tudo que vivemos juntas nos últimos sete anos, e em especial nestes dois anos de mestrado onde vivemos momentos incríveis e também angustiantes, mas sempre uma apoiando a outra, o que tornou o processo muito mais leve. Formamos um time incrível e o resultado desse projeto não poderia ser diferente. Obrigada por estar ao meu lado em todas as etapas, essa conquista é nossa e nós somos merecedoras.

À Universidade de Passo Fundo por ser meu lugar e fazer parte da minha rotina nos últimos dez anos, desde o ensino médio até a pós-graduação, sendo responsável por grande parte da pessoa que me tornei. E em especial à Faculdade de Odontologia, por ser a minha segunda casa, agradeço a todos os colaboradores, funcionários, alunos e professores da instituição os quais tenho imenso carinho, sinto enorme alegria e gratidão por terem participado da minha trajetória.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de uma bolsa de estudos, que me permitiu realizar a presente pesquisa e concluir o meu curso de mestrado.

SUMÁRIO

BIOGRAFIA DO AUTOR	5
AGRADECIMENTOS.....	6
SUMÁRIO.....	7
LISTA DE TABELAS.....	8
LISTA DE FIGURAS.....	9
LISTA DE ABREVIATURAS.....	10
RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	12
1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1 Hipoclorito de sódio e ação antimicrobiana.....	15
2.2 Hipoclorito de sódio e toxicidade.....	17
2.3 Ácido hipocloroso.....	19
2.4 Ácido hipocloroso e ação antimicrobiana.....	20
2.5 Ácido hipocloroso e toxicidade.....	22
3. PROPOSIÇÃO.....	25
4. MATERIAL E MÉTODO.....	26
4.1 Ação antimicrobiana.....	46
4.2 Ação antimicrobiana.....	46
4.3 Citotoxicidade.....	53
5. RESULTADOS.....	35
6. DISCUSSÃO.....	36
7. CONCLUSÕES.....	39
8. REFERÊNCIAS.....	40
9. ANEXOS.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição dos grupos de acordo com o protocolo de descontaminação testado.....31

Tabela 2 - Média e desvio padrão (\pm) para a porcentagem de redução bacteriana (%) e células viáveis (%) após o tratamento com as substâncias químicas testadas.....35

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Equipamento Dentaqua®.....	26
Figura 2 – Solução salina manipulada (brine).....	26
Figura 3 – Seleção de sessenta dentes humanos extraídos.....	27
Figura 4 – Secção na junção amelocementária.....	27
Figura 5 – Padronização em 15mm.....	27
Figura 6A – Broca Largo nº 3 para o preparo cervical.....	28
Figura 6B – Sistema ProTaper Universal para ampliação apical.....	28
Figura 6C – Motor X-Smart Plus.....	28
Figura 7A – Vedamento apical com resina fotopolimerizável.....	28
Figura 7B – Impermeabilização das raízes com cianocrilato.....	28
Figura 7C – Amostras fixadas em microtubos plásticos.....	28
Figura 8 – Disposição das amostras em caixas de polipropileno.....	29
Figura 9A – Dente selecionado aleatoriamente preenchido com solução salina estéril.....	29
Figura 9B – Cone de papel estéril em contato com o canal.....	29
Figura 9C – Homogeneização da solução.....	29
Figura 9C – Semeadura em placa de petri.....	29
Figura 10A – Contaminação dos canais radiculares.....	30
Figura 10B – Câmara de fluxo laminar.....	30
Figura 10C – Cone de papel em contato com as paredes do canal	30
Figura 10D – Técnica de gotas.....	30
Figura 10E – Análise da morfologia.....	30
Figura 11 – Esquema de diluição dos materiais homogeneizados em placas de petri.....	31
Figura 12 – Semeadura no local correspondente à diluição.....	32
Figura 13 – Contagem de UFCs após 24 horas de incubação das placas em estufa bacteriológica.....	32
Figura 14 – Placa de 96 poços para distribuição das células.....	33
Figura 15 – Microscópio invertido.....	33
Figura 16 – Adição de 50ml de solução de MTT.....	34
Figura 17 – Adição de 100ml de solução de DMSO.....	34

LISTA DE ABREVIATURAS

°C – Graus Celsius

% – Porcentagem

– Diâmetro

BHI – Caldo de infusão cérebro-coração

CHX – Clorexidina

DW – Água destilada

E. faecalis – *Enterococcus faecalis*

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

h – Hora

HOCl – Ácido hipocloroso

min – Minuto

ml – Mililitro

mm – Milímetro

MTT – Metil tiazol tetrazólio

N – Newton

NaOCl – Hipoclorito de sódio

nm – Nanômetro

ppm – Partes por milhão

PUI – Irrigação ultrassônica passiva

rpm – Rotações por minuto

S1 – Primeira coleta

S2 – Segunda coleta

uL – Microlitros

µm – Micrômetro

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar, *in vitro*, a ação antimicrobiana e a citotoxicidade de solução de ácido hipocloroso obtido a partir de dispositivo eletrolítico, em comparação com diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. Para o teste de ação antimicrobiana, sessenta dentes unirradiculares humanos extraídos foram inoculados, por 14 dias, com 100 µl de cultura de *Enterococcus faecalis*. Em seguida, as amostras foram divididas aleatoriamente em 6 grupos (n=10) de acordo com o protocolo testado: G1 – água deionizada (controle); G2 – hipoclorito de sódio 1% (NaOCl 1%); G3 – hipoclorito de sódio 2,5% (NaOCl 2,5%); G4 – hipoclorito de sódio 5,25% (NaOCl 5,25%); G5 – ácido hipocloroso 250ppm (HClO 250ppm); G6 – ácido hipocloroso 500ppm (HClO 500ppm). A contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) foi realizada para avaliar a eficácia dos tratamentos propostos. O teste de citotoxicidade foi realizado por meio do ensaio MTT. Após preparo do meio de cultura celular, 100 uL dos mesmos grupos de tratamento já citados foram adicionados individualmente aos poços contendo o meio, sendo incubados no período de tempo de 3 minutos. O percentual de redução bacteriana e a citotoxicidade foram analisados pelo teste de one-way ANOVA seguido por post-hoc de Tukey ($\alpha=0,05$). Os resultados de ação antimicrobiana revelaram que todas as substâncias testadas foram efetivas na redução bacteriana, quando comparadas ao grupo controle, sem diferença estatística entre eles ($p<0,05$). Para citotoxicidade, todas as substâncias químicas testadas foram diferentes estatisticamente quando comparadas ao grupo controle, sendo que os grupos G2, G3 e G4 foram semelhantes entre si e os grupos G5 e G6 mostraram-se menos citotóxicos ($p<0,05$). Pode-se concluir que o ácido hipocloroso foi tão efetivo quanto o hipoclorito de sódio na redução bacteriana e se apresentou menos citotóxico.

Palavras-chave: ação antimicrobiana, ácido hipocloroso, citotoxicidade, *E. faecalis*, hipoclorito de sódio.

ABSTRACT¹

The aim of the present study was to evaluate, in vitro, the antimicrobial action and cytotoxicity of a hypochlorous acid solution obtained from an electrolytic device, in comparison with different concentrations of sodium hypochlorite. For the antimicrobial action test, sixty extracted human single-rooted teeth were inoculated for 14 days with 100 µl of *Enterococcus faecalis* culture. Then, the samples were randomly divided into 6 groups (n=10) according to the protocol tested: G1 – deionized water (control); G2 – 1% sodium hypochlorite (1% NaOCl); G3 – 2.5% sodium hypochlorite (2.5% NaOCl); G4 – 5.25% sodium hypochlorite (5.25% NaOCl); G5 – hypochlorous acid 250ppm (HClO 250ppm); G6 – hypochlorous acid 500ppm (HClO 500ppm). The colony forming units (CFU) count was performed to evaluate the effectiveness of the proposed treatments. The cytotoxicity test was performed using the MTT assay. After preparing the cell culture medium, 100 uL of the same treatment groups mentioned above were individually added to the wells containing the medium, being incubated for a period of 3 minutes. Bacterial reduction percentage and cytotoxicity were analyzed by the one-way ANOVA test followed by Tukey's post-hoc test ($\alpha=0.05$). The antimicrobial action results revealed that all tested substances were effective in bacterial reduction, when compared to the control group, with no statistical difference between them ($p<0.05$). For cytotoxicity, all chemical substances tested were statistically different when compared to the control group, and groups G2, G3 and G4 were similar to each other and groups G5 and G6 were less cytotoxic ($p<0.05$). It can be concluded that hypochlorous acid was as effective as sodium hypochlorite in bacterial reduction and was less cytotoxic.

Key words: antimicrobial action, hypochlorous acid, cytotoxicity, *E. faecalis*, sodium hypochlorite.

¹ Evaluation of the antimicrobial action and cytotoxicity of hypochlorous acid solution obtained from electrolyte device in comparison with different concentrations of sodium hypochlorite

1. INTRODUÇÃO

Os microorganismos desempenham um papel fundamental na indução e, principalmente, na perpetuação das alterações patológicas que acometem a polpa e os tecidos periapicais (KAKEHASHI, 1965). Sendo assim, o uso de substâncias químicas e recursos auxiliares se torna necessário, pois visa contribuir no processo de descontaminação do sistema de canais radiculares.

O hipoclorito de sódio (NaOCl) é a solução irrigante mais utilizada na endodontia para a realização do preparo químico-mecânico. Esta substância apresenta atividade antimicrobiana de amplo espectro (DU *et al.*, 2014) e capacidade de promover a dissolução da matéria orgânica (OKINO *et al.*, 2004). Porém, é citotóxico quando utilizado em elevadas concentrações (MARINS *et al.*, 2012), instável quimicamente (LEONARDO *et al.*, 2016) e interfere negativamente na adesão do material restaurador à dentina (FARINA; CECCHIN, 2011). Além disso, para eliminar bactérias persistentes do canal radicular são necessárias alta concentração, grande volume e longa exposição ao NaOCl, e com o advento da instrumentação reciprocante, a técnica de preparo se tornou mais rápida, reduzindo o tempo de contato das soluções de hipoclorito com as paredes do canal radicular. Como consequência, uma redução da atividade antimicrobiana foi observada quando o preparo químico-mecânico foi realizado com instrumento reciprocante e soluções de hipoclorito de sódio em baixas concentrações (SOUZA *et al.*, 2018). Também tem sido demonstrado que o NaOCl promove desintegração do colágeno dentinário (MOREIRA *et al.*, 2009), reduz a resistência flexural e o módulo de elasticidade da dentina (MARENDING *et al.*, 2007), e promove alterações na microdureza da estrutura dentinária (ASLANTAS; BUZOGLU; ALTUNDASAR, 2014), podendo trazer como consequência o aparecimento de trincas em raízes fragilizadas após a realização do tratamento endodôntico.

Por sua vez, o ácido hipocloroso (HOCl) é uma substância endógena de todos os mamíferos e é eficaz contra uma ampla gama de microorganismos (WANG *et al.*, 2007), sendo gerado pelas células imunológicas do corpo para combater patógenos invasores e infecções (LAPENNA; CUCCURULLO, 1996). Não é uma substância irritante e não sensibiliza células devido a sua baixa citotoxicidade quando comparado com NaOCl (WANG *et al.*, 2007). Seu uso na odontologia passou a ser pesquisado recentemente, visto que o HOCl é responsável pela ação desinfetante de soluções de cloro (FAIR *et al.*, 1948) e possui estabilidade química ao armazenamento se manuseado de maneira adequada, sendo um irrigante antibacteriano durável no uso clínico diário (CHEN, C.; CHEN; DING, 2016). Além disso, mostrou-se eficaz na limpeza de superfícies de implantes contaminadas por biofilme, possui potencial para ser um antisséptico utilizado no tratamento de periimplantite (CHEN, C.; CHEN; DING, 2016), assim como, para o tratamento da periodontite (MAINNEMARE *et al.*, 2004).

Em relação a área da endodontia, não existem muitos estudos relacionados ao uso do ácido hipocloroso. No entanto, foi demonstrado que substâncias com a presença deste ácido podem ser utilizadas como uma solução de irrigação endodôntica (ROSSI-FEDELE *et al.*, 2010). O ácido hipocloroso é um desinfetante eficaz que pode representar uma alternativa ao uso hipoclorito de sódio (CHEN *et al.*, 2019). Este ácido é obtido através de um dispositivo eletrolítico (Dentaqua®), que transforma uma substância conhecida como “brine”, contendo na sua composição água deionizada, cloreto de sódio e ácido hidrolórico, em ácido hipocloroso. Porém, ainda não existem estudos sobre o uso deste equipamento na odontologia.

Diante dos problemas expostos, faz-se necessária a busca de novas alternativas no que diz respeito a substâncias químicas e recursos auxiliares de descontaminação, que promovam uma adequada neutralização de microorganismos do sistema de canais radiculares, ao mesmo tempo em que alterações estruturais da dentina não sejam promovidas. Torna-se justificável a realização do presente estudo no intuito de elucidar o real potencial do ácido hipocloroso no combate ao *Enterococcus faecalis* em canais radiculares e sua consequência em contato com células humanas

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Hipoclorito de sódio e Ação Antimicrobiana

ROSSI-FEDELE *et al.*, em 2010, compararam a ação antimicrobiana de hipoclorito de sódio (NaOCl), Optident Sterilox Electrolyte Solution[®] e Sterilox's Aquatine Alpha Electrolyte[®] contra *Enterococcus faecalis* quando utilizados como soluções irrigantes em canal radicular bovino. Porções radiculares foram preparadas e inoculadas com *Enterococcus faecalis*. Após 10 dias de incubação, os canais radiculares foram irrigados com uma das três soluções (NaOCl, Optident Sterilox Electrolyte Solution[®] e Sterilox's Aquatine Alpha Electrolyte[®]) e posteriormente amostrados por trituração de dentina com brocas. Os detritos foram colocados em caldo BHI e as diluições foram colocadas em placas de ágar frescas para quantificar o crescimento. O hipoclorito de sódio foi o único irrigante a eliminar todas as bactérias. Quando as diluições foram feitas, embora o NaOCl ainda fosse estatisticamente superior, a solução Aquatine Alpha Electrolyte[®] da Sterilox foi superior à solução Optident Sterilox Electrolyte[®]. Nas condições deste estudo, o Aquatine Alpha Electrolyte[®] da Sterilox pareceu ter significativamente mais ação antimicrobiana em comparação com o Optident Sterilox Electrolyte Solution[®] sozinho. No entanto, NaOCl foi a única solução capaz de erradicar consistentemente *E. faecalis* no modelo.

BACA *et al.*, em 2011, investigaram a atividade antimicrobiana residual e a capacidade de eliminação do biofilme de *Enterococcus faecalis* de diferentes soluções irrigantes, isoladas e em combinação, em um teste dentinário volumétrico. Para determinar a atividade residual, as soluções de hipoclorito de sódio 2,5% (NaOCl), clorexidina 2% (CHX), cetrimida 0,2% (CTR), 17% etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido maleico 7% (MA) e regimes de NaOCl 2,5% seguido por 17% EDTA ou 7% MA e 0,2% CTR ou 2% CHX foram expostas a blocos de dentina contendo *E. faecalis* por 24 horas. A atividade antimicrobiana foi avaliada através do biofilme formado em blocos de dentina em 3 semanas. Os resultados da atividade residual e da atividade antimicrobiana foram expressos, respectivamente, como a porcentagem de inibição da formação de biofilme e a porcentagem de eliminação do biofilme. A solução contendo CHX 2% e CTR 0,2% mostrou 100% de inibição do biofilme, enquanto NaOCl 2,5% apresentou a menor atividade residual (18,10%). A porcentagem de eliminação das bactérias de NaOCl 2,5% e CTR 0,2% foi 100%, seguido por MA 7% e CHX 2%, enquanto EDTA 17% foi o menos eficaz (44%). Soluções de MA 7% ou EDTA 17% seguidas por CTR 0,2% e CHX 2% mostraram 100% de atividade residual e antimicrobiana. De acordo com os resultados, a solução de CTR 0,2% sozinha e as combinações nas quais CHX 2% ou CTR 0,2% faziam parte, foram as soluções de irrigação final que alcançaram a atividade residual e antimicrobiana máxima.

MORAGO *et al.*, em 2016, avaliaram a influência da *smear layer* na atividade antimicrobiana de uma solução irrigante de NaOCl 2,5% e ácido etidrônico 9% (HEBP) contra bactérias presentes nos túbulos dentinários. Foram utilizados 15 dentes unirradiculares humanos extraídos que foram seccionados, totalizando em 30 amostras, que foram infectados com *Enterococcus faecalis* por centrifugação. Após 5 dias de incubação, a *smear layer* se formou nas amostras, que foram então tratadas por 3 minutos seguindo os grupos (n=5) de acordo com as soluções irrigantes e a ausência ou presença de *smear layer*: G1 - NaOCl 2,5% sem *smear layer*; G2 - NaOCl 2,5% + 9%

HEBP sem *smear layer*; G3 - NaOCl 2,5% com *smear layer*; G4 - NaOCl 2,5% + 9% HEBP com *smear layer*; G5 - água destilada; G6 - água destilada com *smear layer*. A porcentagem de células mortas em túbulos dentinários infectados foi medida usando microscopia confocal de varredura a laser e a técnica de vivo/morto. A *smear layer* na superfície da parede do canal radicular também foi observada por microscopia eletrônica de varredura. Sem a presença de *smear layer* o NaOCl 2,5% sozinho e combinado com 9% HEBP mostrou alta atividade antimicrobiana sem diferenças significativas entre os 2. A *smear layer* reduziu significativamente a atividade antimicrobiana de NaOCl 2,5%, enquanto a solução com HEBP não foi afetada. A presença da *smear layer* reduziu a atividade antimicrobiana do NaOCl 2,5%. A combinação de NaOCl 2,5% + HEBP 9% exerceu atividade antimicrobiana que não foi reduzida pela *smear layer*.

PLUTZER *et al.*, em 2018, compararam a eficácia do hipoclorito de sódio com medicamentos endodônticos comumente usados contra *Enterococcus faecalis*. Um biofilme de *E. faecalis* foi cultivado em amostras de dentina que foram produzidas a partir de dentes extraídos. Cada medicamento testado (Ledermix, Ca(OH)₂, Odontopaste, Clorexidina 0,2% e combinações 50:50 de Ledermix/Ca(OH)₂ e Odontopaste/Ca (OH)₂) foi introduzido na célula de fluxo e os biofilmes foram colhidos e quantificado por determinação da proteína celular. A viabilidade celular foi determinada usando placas em série e o número de unidades formadoras de colônias foi normalizado contra a proteína celular para permitir que os protocolos de tratamento fossem comparados. As análises qualitativas de microscopia eletrônica de varredura do biofilme foram realizadas após uma exposição de 48 horas a cada agente de teste. Para o tratamento com hipoclorito de sódio, as amostras foram removidas da célula de fluxo e submersas em solução de hipoclorito de sódio 4% por 1, 10, 30 ou 60 min. O hipoclorito de sódio atingiu a eliminação bacteriana total. Ledermix e Odontopaste não tiveram efeito significativo no biofilme. As combinações de Ca(OH)₂ e 50:50 de Ca (OH)₂/Ledermix ou Ca(OH)₂/Odontopaste reduziram a viabilidade em mais de 99%, enquanto Clorexidina 0,2% reduziu o número de bactérias em 97%. Conclui-se assim, que o hipoclorito de sódio continua sendo o padrão ouro para eliminação bacteriana na terapia de canal radicular. No entanto, o Ca(OH)₂ isolado e combinado com Ledermix e Odontopaste foi altamente eficaz na redução da viabilidade bacteriana.

HSIEH *et al.*, em 2020, analisaram *in vivo* a eficácia antibacteriana e a toxicidade das soluções de irrigação do canal radicular hipoclorito de sódio (NaOCl) e água oxidante eletrolisada (EO) - contendo ácido hipocloroso (HOCl) – utilizando ensaios de peixe-zebra embrionário. Para analisar a eficácia antibacteriana, culturas de *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus mutans* foram inoculadas na superfície de ágar soja tríplica a 37°C por 48–72 h. Foram utilizados 100 mL de contagem microbiana de 1×10^8 cfu / mL de *Enterococcus faecalis* para misturar com cada amostra de 10 mL de NaOCl ou HOCl por períodos de tempo designados. Este protocolo também foi repetido para *Streptococcus mutans*. A concentração de microrganismos viáveis foi estimada com base em cada inóculo padronizado usando um método de contagem em placa. Para a avaliação da toxicidade, cento e cinquenta embriões de peixe-zebra foram expostos a NaOCl 1,5% por 5 minutos, bem como água EO 0,0125% e 0,0250% por 0,5 e 1 min. A capacidade de sobrevivência e as condições dos embriões foram capturadas sob um microscópio de luz e uma câmera digital. A porcentagem de sobrevivência dos embriões foi avaliada e pontuada para efeitos letais ou teratogênicos. Todos os grupos de tratamento com HOCl ou NaOCl mostraram eficácia antibacteriana contra *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus mutans*. Embriões de peixe-zebra mostraram dissolução quase completa em NaOCl a 1,5% em 5 min. Já em HOCl 0,0125% e 0,0250% por 0,5 min ou 1 min ambas as taxas de sobrevivência foram semelhantes às do meio dos embriões. Sendo assim, tanto o

NaOCl quanto o HOCl revelaram eficácia antibacteriana semelhante (> 99,9%) contra *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus mutans*. Enquanto NaOCl 1,5% dissolveu totalmente os embriões de peixe-zebra, o HOCl mostrou pouca toxicidade *in vivo*, afirmando seu potencial como uma solução de irrigação alternativa para terapia de polpa vital.

KARATAŞ *et al.*, em 2021, avaliaram o efeito da irrigação final dos canais radiculares com solução de NaOCl a 1% em diferentes temperaturas sobre o nível de dor pós-operatória e atividade antimicrobiana. Para isso 45 pacientes foram divididos aleatoriamente em três grupos de irrigantes serem testados: NaOCl 1% 2°C, NaOCl 1% 25°C e NaOCl 1% 45°C. As primeiras amostras do canal radicular foram coletadas antes do tratamento (S1). Após o preparo químico-mecânico, a irrigação final foi realizada com o irrigante selecionado e uma segunda amostra foi coletada (S2). As amostras foram submetidas à reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real para avaliar os níveis de bactérias totais. Os tratamentos de canal radicular foram concluídos e os participantes receberam instruções para registrar os níveis de dor pós-operatória em 24, 48 e 72 horas, 5 dias e 1 semana após o tratamento usando uma escala visual analógica (VAS). A redução no número de bactérias totais de S1 para S2 foi estatisticamente significativa em todos os grupos ($p < 0,001$). O grupo NaOCl 1% 2°C relatou significativamente menos dor pós-operatória do que o grupo NaOCl 45°C ($p < 0,05$). A ingestão de analgésico pós-operatório foi significativamente maior no grupo NaOCl 1% 45°C do que no grupo NaOCl 1% 2°C ($p < 0,05$). Concluiu-se que a irrigação final com NaOCl em diferentes temperaturas resulta em eficácia antibacteriana semelhante. A irrigação final com NaOCl 1% frio (2°C) é melhor do que NaOCl 1% 45°C na comparação dos níveis de dor pós-operatória.

2.2 Hipoclorito de sódio e Toxicidade

SIMBULA *et al.*, em 2010, mediram a citotoxicidade do EDTA + perborato de sódio em fibroblastos L929 e compararam com a do hipoclorito de sódio (NaOCl). Foram cultivados fibroblastos L929 em meio de Eagle modificado por Dulbecco contendo 10% de soro fetal de vitela (FCS) a 37°C e 5% de CO². Na confluência, as células foram divididas, plaqueadas em uma placa de 96 poços e incubadas por 24h para permitir a fixação. Os dois desinfetantes EDTA + P e NaOCl foram testados em várias concentrações. Os ensaios de captação de vermelho neutro e brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5 difeniltetrazólio foram usados para avaliar a viabilidade celular. Os valores da dose inibitória de 50% para ambos os desinfetantes foram calculados e analisados estatisticamente. O efeito de ambos os desinfetantes na viabilidade dos fibroblastos também foi determinado na presença de várias concentrações de FCS. A análise de variância unilateral com análise post hoc usando o teste de comparação múltipla de Tukey foi usada para dados paramétricos. Ambos os desinfetantes induziram uma perda de viabilidade celular relacionada à dose; EDTA + P resultou menos citototoxicidade do que NaOCl em todas as condições experimentais examinadas. Esses dados apoiam o possível uso de EDTA + P como irrigante endodôntico. Mais estudos são necessários para analisar sua atividade antibacteriana contra patógenos endodônticos.

BOTTON *et al.*, em 2016, avaliaram a toxicidade *in vitro* de soluções irrigantes e associações farmacológicas utilizadas na pulpectomia de dentes decíduos. A viabilidade celular (MTT), peroxidação lipídica (TBARS), ensaio do cometa alcalino e testes GEMO foram realizados para avaliar a citotoxicidade e genotoxicidade das soluções: NaOCl (1% e 2,5%), clorexidina 2% (CHX), ácido cítrico 6% e EDTA 17%, que

foram testados, individualmente e em associação, expondo células mononucleares de sangue periférico humano (MTT, TBARS e ensaio de cometa alcalino), às 24 e 72h, e dsDNA (GEMO). 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 pelo teste post hoc de Dunn. O nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$. Todas as soluções de irrigação e associações farmacológicas reduziram a viabilidade celular em 24h ($p < 0,05$). Essas reduções foram mantidas após 72h, exceto para EDTA e associações de NaOCl (1% e 2,5%) com EDTA e de CHX com EDTA. A peroxidação lipídica em 24h foi causada por EDTA e por NaOCl 2,5% com EDTA; também foi causado em 72h por NaOCl (1% e 2,5%) e as três associações com ácido cítrico ($p < 0,05$). Todos os grupos causaram danos ao DNA quando avaliados pelo ensaio do cometa alcalino, em 24h e 72h ($p < 0,05$). No ensaio GEMO, todos os grupos causaram danos ao dsDNA ($p < 0,05$), exceto CHX com EDTA. Todos os grupos apresentaram algum nível de toxicidade. Dentre as principais soluções, a CHX apresentou menor potencial citotóxico. O EDTA foi o menos citotóxico das soluções irrigantes auxiliares, e a associação dessas duas soluções apresentou o menor potencial de toxicidade entre todos os grupos.

VOUZARA *et al.*, em 2016, avaliaram a capacidade de irrigantes de canal radicular comumente usados em induzir efeitos citotóxicos, quando aplicados isoladamente ou em combinação. A hipótese testada foi que os irrigantes eram menos citotóxicos quando aplicados em combinação do que independentemente. As células MRC5 foram cultivadas como culturas em monocamada a 37°C em uma atmosfera contendo 5% de CO₂ no ar e 100% de umidade relativa. As células foram expostas a NaOCl, EDTA, CHX e suas combinações (NaOCl + EDTA, NaOCl + CHX, EDTA + CHX) em diluições em série. O meio de crescimento foi o meio de Eagle modificado por Dulbecco suplementado com 10% de soro fetal bovino e antibióticos e foi usado como controle. O efeito na sobrevivência celular foi estimado após 6 e 24h de exposição por meio do ensaio sulforhodamina B, em referência aos controles. Curvas de dose-resposta foram traçadas, e 50% das doses inibitórias foram submetidas à 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. CHX foi o irrigante mais citotóxico testado, seguido de NaOCl, enquanto o EDTA foi o irrigante menos citotóxico testado. A diferença entre CHX e NaOCl foi significativa ($p < 0,05$), assim como entre NaOCl e EDTA ($p < 0,05$). Com base na modelagem CalcuSyn, um efeito principalmente antagonístico foi registrado com combinações de NaOCl + CHX e NaOCl + EDTA. A combinação EDTA + CHX teve um efeito aditivo ao antagonista. A CHX foi significativamente mais citotóxico do que NaOCl e EDTA. O NaOCl foi significativamente mais citotóxico do que o EDTA. A ação combinada dos irrigantes não produziu aumento significativo em sua citotoxicidade.

NOCCA *et al.*, em 2017, investigou a estabilidade da formação do paracloroanilina (PCA) na presença de NaOCl e examinou os efeitos citotóxicos *in vitro* das misturas de reação da CHX com NaOCl. Diferentes volumes de NaOCl foram adicionados a CHX ou PCA. Após a centrifugação, o precipitado coletado das amostras foi analisado por meio de cromatografia líquida de alta eficiência. Os efeitos citotóxicos de ambas as frações foram examinados no ligamento periodontal humano e nas linhas de células de fibroblastos 3T3. A análise por cromatografia líquida de alto desempenho não mostrou nenhum sinal de PCA quando NaOCl foi misturado com CHX. Na mistura 2, a intensidade do PCA foi diminuída quando NaOCl foi adicionado ao PCA, e sinais cromatográficos, semelhantes ao de CHX com NaOCl, também foram observados. A discrepância nos dados da literatura pode ser causada pela instabilidade do PCA na presença de NaOCl. A mistura de reação CHX com NaOCl exibe uma ampla gama de efeitos citotóxicos.

AYDIN *et al.*, em 2018, avaliou e comparou a citotoxicidade e genotoxicidade em linhagens celulares de fibroblastos humanos de NaOCl, quitosana e própolis como soluções irrigadoras de canais radiculares. Células de fibroblastos humanos foram expostas a quitosana, própolis e NaOCl por 4 e 24h. A viabilidade celular foi avaliada por 2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfonil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida e o dano oxidativo ao DNA foi avaliado pela determinação de 8-hidroxidesoxiguanosina(8-OHdG) nível com um kit ELISA. Os dados de citotoxicidade celular foram analisados estatisticamente usando um teste de análise de variância unilateral a um nível de significância de $p < 0,05$. No grupo NaOCl, o nível de 8-OHdG foi maior do que no grupo quitosana, mas não houve diferença estatística quando comparado com os outros grupos ($p < 0,05$). Determinou-se que as soluções de irrigação eram citotóxicas, dependendo da dose e do tempo. NaOCl foi a solução mais tóxica após 4 e 24h de exposição ($p < 0,05$). A quitosana e a própolis podem ser alternativas ao NaOCl para soluções de irrigação, pois são menos tóxicas e produzem menos danos oxidativos ao DNA.

2.3 Ácido Hipocloroso

ROSSI-FEDELE *et al.*, em 2011, investigaram o efeito das condições de armazenamento na estabilidade do Sterilox (®). Oito frascos (quatro completamente cheios, quatro meios cheios) de solução recém-preparada foram divididos em quatro grupos e armazenados sendo expostos ou protegidos da luz solar. A concentração de cloro foi monitorada por meio de tiras-teste de cloro até a concentração chegar a zero, ou até a décima terceira semana. Foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos expostos ao sol e os não expostos ($p < 0,001$). A perda média de cloro por dia para as amostras não expostas foi de 1,01 mg/L, enquanto a média para as amostras expostas foi de 2,42 mg/L. A presença de ar não afetou a decomposição do cloro nas garrafas. Os resultados desta investigação indicam que quando a solução é exposta à luz solar, a diminuição do cloro começa no dia 4, enquanto para os grupos protegidos da luz solar, o processo começou após o dia 14. Portanto, as soluções de Sterilox (®) parecem ser mais estáveis do que se supunha anteriormente.

GHISI *et al.*, em 2014, avaliaram a influência de diferentes soluções irrigantes na microdureza da dentina do canal radicular: hipoclorito de sódio 2% (2NaOCl), hipoclorito de sódio 5% (5NaOCl), água superoxidada (400 ppm Sterilox - Sx) e 17 % EDTA (E). Para realização do estudo, oitenta raízes de incisivos bovinos foram divididas aleatoriamente em 8 grupos ($n = 10$): G1- 2NaOCl, G2- 5NaOCl, G3- Sx, e G4- 2NaOCl + E, G5- 5NaOCl + E, G6- Sx + E (associado com EDTA como irrigante final por 5 min), G7- EDTA somente e G8- água destilada (controle negativo). O canal radicular foi preparado com instrumentos manuais e utilizando um dos protocolos de irrigação por 30 minutos. Em seguida, 5 mm do terço cervical da raiz de cada amostra foram cortados e submetidos ao teste de microdureza Vickers, em dois pontos, um a aproximadamente 500-1000 μm do lúmen do canal radicular (distância 1) e o outro a aproximadamente 500-1000 μm da superfície externa da raiz (distância 2). Os valores de microdureza na distância 1 foram significativamente menores do que na distância 2 para todos os grupos, exceto os grupos 5NaOCl e 5NaOCl + E ($p > 0,05$). O EDTA apresentou os menores valores de microdureza. No entanto, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi detectada entre os grupos na distância 1 e o EDTA foi significativamente diferente apenas de Sx na distância 2. Em conclusão, todas as soluções testadas apresentaram menor microdureza na camada mais superficial de dentina do canal radicular em comparação com a encontrada próximo à superfície externa da raiz, exceto 5NaOCl e 5NaOCl + E; e o EDTA promoveu menores valores de microdureza em comparação ao Sterilox neste local.

GHISI *et al.*, em 2015, analisaram os efeitos do Sterilox (Sx), água superoxidada, hipoclorito de sódio 5% e 2% (5NaOCl e 2NaOCl) e EDTA 17% (E) sobre os componentes orgânicos e inorgânicos da dentina bovina. Oitenta incisivos bovinos foram divididos aleatoriamente em 8 grupos (n = 10): G1- 5NaOCl, G2- 5NaOCl + E, G3- 2NaOCl, G4- 2NaOCl + E, G5- Sx, G6- Sx + E, G7- EDTA sozinho e G8- água destilada (H₂O). A instrumentação do canal radicular foi realizada com o irrigante correspondente. A amostra de 15 mm foi seccionada longitudinalmente em 2 fragmentos, um para análise em microscopia de luz em lâminas coradas com picrossirius red (componente orgânico) e outro para análise em microscopia eletrônica de varredura (componente inorgânico). Os dados dos escores obtidos na análise de microscopia de luz foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparações múltiplas (P <0,05). As imagens de microscopia eletrônica de varredura foram analisadas descritivamente. Os resultados obtidos demonstraram que a solução 5NaOCl teve maior efeito sobre o componente orgânico da dentina em área e profundidade do que 2NaOCl. As soluções químicas 5NaOCl + E, 5NaOCl e 2NaOCl + E causaram a maior alteração na matriz orgânica colágena próxima ao lúmen do canal radicular. A solução química 2NaOCl apresentou comportamento semelhante ao Sx, associado ou não ao E, promovendo uma desorganização mais superficial do colágeno em uma área menor. A desmineralização foi observada em todos os grupos nos quais E foi usado. No entanto, áreas de erosão e túbulos dentinários abertos foram detectados apenas quando combinado com NaOCl. Concluiu-se assim que NaOCl 5% promoveu dano mais extenso ao componente orgânico da dentina e, quando associado ao EDTA, foi observada erosão dentinária. Considerando esses aspectos específicos, NaOCl 2% e Sx tiveram efeitos mais brandos na dentina radicular bovina.

2.4 Ácido Hipocloroso e Ação Antimicrobiana

MARAIS, em 2000, comparou um novo produto conhecido por água eletroquimicamente ativada com o hipoclorito de sódio (NaOCl) para avaliar seu efeito de limpeza nas paredes do canal radicular. Foram utilizados vinte e três dentes humanos unirradulares extraídos, nos quais realizou-se o preparo do canal radicular. Vinte dentes foram divididos aleatoriamente em dois grupos (n=10) e três dentes foram selecionados para o controle. O tratamento do canal radicular foi realizado nos dois grupos, com um dos irrigantes sendo usado em cada grupo. O grupo controle não recebeu tratamento. Todos os dentes foram divididos e as paredes do canal vistas em um microscópio eletrônico de varredura. As paredes do canal do grupo controle estavam cobertas por detritos e bactérias. O hipoclorito de sódio produziu superfícies limpas com os túbulos dentinários abertos em algumas áreas e ocluídos por *smear layer* em outras, em algumas áreas as bactérias eram visíveis dentro ou sob a *smear layer*. A água ativada eletroquimicamente produziu superfícies mais limpas, removendo a *smear layer* em grandes áreas. A partir destes resultados, concluiu-se que a eficácia de limpeza da água eletroquimicamente ativada em canais radiculares foi considerada superior ao NaOCl.

CASTILLO *et al.*, em 2015, investigaram o efeito do enxágue com ácido hipocloroso (HOCl) e clorexidina (CHX) na viabilidade bacteriana de *S. mutans*, *A. israelii*, *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *E. corrodens*, *C. rectus*, *K. oxytoca*, *K. pneumoniae* e *E. cloacae*. Para avaliar o número de bactérias vivas e mortas após a exposição a diferentes concentrações de HOCl e CHX 0,2%, os inóculos de todas as bactérias descritas anteriormente foram ajustados para 1×10^8 concentração de bactérias/mL e cultivadas em caldo BHI.A

porcentagem de bactérias vivas foi testada pelo método de fluorescência usando o kit Live/ Dead(r) e BacLight (Molecular Probes (r)) e comparada entre os grupos pelos testes de Kruskal-Wallis e U Mann-Whitney com correção de Bonferroni (p valor <0,012). O efeito de HOCl e CHX nas proteínas totais de *P. gingivalis* e *S. mutans* foi determinado por SDS-PAGE. CHX mostrou uma eficácia maior do que HOCl contra *S. mutans*, *A. israelii*, *E. corrodens* e *E. cloacae*, enquanto HOCl foi mais eficaz do que CHX contra *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *C. rectus* e *K. oxitoca*. CHX e HOCl tiveram eficácia semelhante contra *K. pneumoniae*. Proteínas de *P. gingivalis* e *S. mutans*. O HOCl reduziu a viabilidade bacteriana principalmente em bactérias periodontopáticas, o que pode apoiar seu uso no controle de biofilme subgingival em pacientes periodontais.

CHEN; CHEN; DING, em 2016, compararam a eficácia do ácido hipocloroso (HOCl), hipoclorito de sódio (NaOCl) e clorexidina (CHX) na eliminação de bactérias gram-negativas (*E. coli* e *P. gingivalis*) e gram-positivas (*E. faecalis* e *S. sanguinis*). Foi avaliado o efeito do volume de irrigação e do tempo de exposição na eficácia antimicrobiana do HOCl e uma análise de durabilidade foi concluída. Coloração viva/morta, observação de morfologia, ensaio alamarBlue e detecção de lipopolissacarídeo (LPS) foram examinadas em discos de liga de titânio contaminados com jato de areia e biofilme após tratamento com os três agentes quimioterápicos. Segundo os resultados, o HOCl exibiu melhor eficácia antibacteriana com o aumento dos volumes de irrigação e também alcançou maior eficácia antibacteriana conforme o tempo de tratamento foi aumentado. Uma diminuição na eficácia antimicrobiana foi observada quando o HOCl foi aberto e deixado em contato com o ar. Todos os irrigantes mostraram atividade antibacteriana e mataram a maior parte das bactérias nas superfícies de liga de titânio de implantes contaminados com biofilme. Além disso, o HOCl reduziu significativamente a concentração de LPS de *P. gingivalis* quando comparado com NaOCl e CHX. Pode-se assim concluir que o anti-séptico HOCl pode ser eficaz para limpar superfícies de implantes contaminadas por biofilme.

LAFURIE *et al.*, em 2018, avaliaram a substantividade dos enxaguatórios bucais com ácido hipocloroso (HOCl) em comparação aos enxaguatórios com clorexidina (CHX) e um placebo. Foi realizado um ensaio clínico randomizado duplo-cego com 75 participantes. Estes participantes foram divididos em cinco grupos usando a randomização em bloco: 0,025% HOCl, 0,05% HOCl, 0,12% CHX, 0,2% CHX e água estéril como placebo. Os participantes foram instruídos a usar cada solução de enxágue por 30 segundos após a profilaxia dentária. Amostras de saliva foram retiradas no início do estudo e após 30 segundos, 1, 3, 5 e 7 horas para avaliar a substantividade. A viabilidade bacteriana foi estabelecida pelo método de fluorescência. A placa visível em todos os participantes foi avaliada com o índice de Turesky no início e após 7 horas. O enxágue com HOCl levou a uma redução de 33% nas contagens de bactérias na saliva após 30 segundos, em comparação com uma redução de 58% pela CHX. HOCl não tem substantividade e as contagens bacterianas voltaram ao valor basal após 1 hora. O tratamento com placebo levou à maior contagem de placa após 7 horas em comparação com os grupos CHX e HOCl, embora as diferenças não tenham sido significativas. O enxágue com HOCl induziu as maiores porcentagens de sabor desagradável e sensações de secura. Concluiu-se que os enxágues com HOCl possuem efeito inicial na viabilidade bacteriana da saliva, mas não têm substantividade. Outros mecanismos podem explicar seu efeito antiplaca.

SEXTON *et al.*, em 2021, avaliaram a eficácia de desinfecção sem toque em uma sala para reduzir a concentração e a contaminação cruzada de bactérias em superfície, quando usada em conjunto com protocolos de limpeza manual. Para este estudo foram semeadas bactérias em doze superfícies, de alto e baixo toque, em um quarto de hospital. Após a semeadura, dois métodos de desinfecção foram avaliados: somente a limpeza manual e

limpeza manual em conjunto com um sistema de desinfecção por atomização com ácido hipocloroso utilizado em todo ambiente sem toque. Foram coletadas amostras das superfícies antes e depois da desinfecção. Cada método de limpeza foi repetido um total de quatro vezes em dias separados. As amostras coletadas foram usados posteriormente para determinar os potenciais de contaminação cruzada durante as práticas de limpeza. A eficiência do trabalho de cada método também foi avaliada. A limpeza manual sozinha alcançou, em média, uma redução de 99,6%. Em comparação, a limpeza em conjunto com desinfecção por atomização do ácido hipocloroso sem toque alcançou uma redução de 99,9987%, em média. Por outro lado, a contaminação cruzada (transferência de organismos semeados para uma superfície não contaminada durante a limpeza) foi observada em 50% das superfícies para limpeza manual, enquanto em conjunto com o método de desinfecção sem toque 0% foi observado. Este método de desinfecção sem toque por atomização do ácido hipocloroso também resultou em uma redução de 64% no tempo gasto na limpeza manual dos quartos. Dessa forma, a desinfecção atomizada em toda a sala, usada em conjunto com os protocolos de limpeza manual, melhorou os resultados da desinfecção, minimizou os efeitos da contaminação cruzada observada durante as práticas de limpeza e reduziu o tempo de trabalho manual.

2.5 Ácido Hipocloroso e Toxicidade

WANG *et al.*, em 2007, descreveram a produção química, estabilização e atividade biológica de uma formulação de HOCl (também referido como NVC-101) para uso potencial como agente farmacêutico. Segundo os autores, quando comparada aos desinfetantes disponíveis comercialmente, peróxido de hidrogênio e hipoclorito de sódio (NaOCl), esta formulação melhorou a atividade antimicrobiana *in vitro* e o índice terapêutico. Além disso, apresentaram dados que demonstram um excelente perfil de segurança para NVC-101 em estudos de toxicologia animal. O HOCl estabilizado está na forma de uma solução fisiologicamente balanceada em solução salina 0,9% em uma faixa de pH de 3,5 a 4,0. Para manter a solução de HOCl em uma forma estável, maximizar suas atividades antimicrobianas e minimizar produtos colaterais indesejáveis, o pH deve ser mantido em 3,5 a 5. Para avaliar as propriedades desta formulação primeiramente foi preparado o HOCl. Foram utilizados materiais microbiológicos para a realização dos testes, que são eles: concentração bacteriana mínima, *time kill*, citotoxicidade, índice terapêutico, segurança e toxicidade animal. Usando esta forma estabilizada de HOCl, as atividades antimicrobianas são demonstradas contra uma ampla gama de microrganismos. O perfil de citotoxicidade *in vitro* em células L929 e o perfil de segurança *in vivo* de HOCl em vários modelos animais são descritos. Através desta pesquisa, concluiu-se que com base na atividade antimicrobiana e na ausência de toxicidade animal, prevê-se que o HOCl estabilizado tenha potenciais aplicações farmacêuticas no controle de infecção de tecidos moles.

KIM *et al.*, em 2008, desenvolveram uma solução de NaCl a 0,85% adicionando NaCl à água da torneira (pH 7,0 e 8,4) e medindo a concentração de cloro livre e ácido hipocloroso após dar à esta solução um curto impulso elétrico de 20 segundos. Em seguida, analisaram se o ácido hipocloroso derivado possuía um efeito tóxico nas células epiteliais nasais primárias humanas e se tinha efeitos bactericidas, fungicidas ou virucidas. O experimento foi realizado através do tratamento de células epiteliais nasais primárias humanas com 3,5 ppm de ácido hipocloroso e, em seguida, examinando as células quanto à citotoxicidade. Também investigaram os efeitos bactericidas, fungicidas e virucidas testando as células com diferentes microrganismos. Para estudar os efeitos virucidas do HOCl, o vírus influenza A humano foi utilizado. No ensaio de citotoxicidade e no exame morfológico, as células não apresentaram toxicidade em 30 minutos ou em 2 horas após o tratamento com

HOCl. Mais de 99% da atividade bactericida ou fungicida foi observada para todas as espécies, exceto para *Candida albicans*, em água da torneira em pH 7,0 ou 8,4. Além disso, foi alcançada uma redução em células testadas com o vírus influenza A humano. Diante dos resultados foi possível concluir que uma solução de HOCl de baixa concentração pode ser usada como uma solução eficaz para irrigação nasal.

MORITA; NISHIDA; ITO, em 2011, investigaram os efeitos sistêmicos e gastrointestinais da ingestão de água funcional eletrolisada com ácido, sob a perspectiva de uso em enxaguatórios bucais. Para o experimento foram utilizados dezessete camundongos (três semanas de idade), sendo que três dos camundongos foram sacrificados antes de receberem alimentos sólidos, enquanto os 14 restantes foram divididos em dois grupos: G1- acesso gratuito a água funcional eletrolisada com ácido como água potável (grupo de teste) e G2- acesso gratuito à água da torneira como água potável (grupo de controle). Após 8 semanas foram registradas mudanças no peso corporal, inspeções visuais da cavidade oral, testes histopatológicos, medições da rugosidade da superfície do esmalte e observações da morfologia do esmalte. Os resultados não mostraram diferença significativa nas mudanças no peso corporal entre os grupos teste e controle. Não foram observados achados ou medições anormais para o grupo de teste em termos de inspeções visuais da cavidade oral, testes histopatológicos ou medições da rugosidade do esmalte da superfície. Em termos de morfologia do esmalte, o atrito foi observado no grupo de teste. Esses achados sugerem que o uso de água funcional eletrolisada com ácido não tem efeito sistêmico e é seguro para uso em enxaguatórios bucais.

SCOTT *et al.*, em 2018, avaliou o efeito do Endocyn, uma solução de ácido hipocloroso e hipoclorito com pH neutro, desenvolvida para uso como irrigante endodôntico, em fibroblastos do ligamento periodontal humano (PDL), células de osteossarcoma de rato (UMR-106) e células-tronco da papila apical (SCAP) em comparação com outros irrigantes endodônticos comumente usados. As células foram expostas a várias concentrações de Endocyn, NaOCl 6%, EDTA 17% e CHX 2% por 10min, 1 ou 24h. A sobrevivência celular foi medida por fluorescência usando calceína AM. Também foi testada a capacidade do Endocyn de inibir a proliferação de SCAP e a atividade da fosfatase alcalina. A expressão do transcrito SCAP foi examinada via reação em cadeia da polimerase transcriptase reversa. O Endocyn não foi mais tóxico para as células PDL e UMR do que a água por até 24h. Concentrações de Endocyn de 50% foram tóxicas para SCAP após 1h de exposição. Concentrações de Endocyn de >20% inibiram a proliferação de SCAP, enquanto concentrações de >10% inibiram a atividade da fosfatase alcalina. A exposição de SCAP a 10% de Endocyn por 3 dias não alterou a maior parte da expressão do transcrito, mas reduziu significativamente a expressão de fosfatase alcalina, fibromodulina e osteomodulina. Endocyn foi significativamente menos citotóxico para as células PDL, UMR-106 e SCAP em comparação com outros irrigantes endodônticos comumente usados. Altas concentrações de Endocyn inibiram alguma expressão do transcrito e atividade da fosfatase alcalina, reduzindo o potencial osteogênico das células-tronco expostas.

SEVERING *et al.*, em 2019, determinaram a citotoxicidade e a eficácia antimicrobiana de seis soluções irrigantes de NaClO e HOCl em feridas. Para a avaliação da citotoxicidade (com base na DIN EN 10993-5), foram utilizados queratinócitos humanos (HaCaT) e fibroblastos de pele humana (BJ). *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* foram utilizados para a avaliação da eficácia antimicrobiana (com base na DIN EN 13727). As soluções foram avaliadas após 1, 5 e 15 min de exposição. Além disso, as propriedades físico-químicas (pH e valores do potencial de oxidação-redução) foram investigadas. A eficácia e a citotoxicidade variaram significativamente entre as soluções. Em geral, o aumento da atividade antimicrobiana foi associado à

diminuição da viabilidade celular. Além disso, foi observado um impacto dependente da concentração e do tempo sobre os patógenos e células: a atividade citotóxica e antimicrobiana aumentou com o aumento das concentrações da solução de NaClO / HOCl e tempos de exposição prolongados. Com base nessas avaliações *in vitro*, foi encontrada a seguinte classificação (menor para maior efeito microbicida e impacto citotóxico): Microdacyn60[®] (SHC / HCA-M) < Granudacyn[®] (SHC / HCA-G) < Veriforte[™] (SHC / HCA- V) < KerraSol[™] (SHC-K) < Lavanox[®] (SHC-L) << ActiMaris[®] forte (SHC / SM-A). Os resultados apresentados indicam que os efeitos microbicidas estão quase sempre associados a certos efeitos colaterais negativos na proliferação celular e a eficácia e biocompatibilidade das soluções de NaClO/HOCl dependem de sua formulação específica e propriedades físico-químicas.

3. PROPOSIÇÃO

Este estudo teve como objetivo avaliar, *in vitro*, a ação antimicrobiana e a citotoxicidade de solução de ácido hipocloroso obtido a partir de dispositivo eletrolítico (Dentaqua), em comparação com diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. Os objetivos específicos foram avaliar, *in vitro*, a ação antimicrobiana de solução de ácido hipocloroso obtido a partir de dispositivo eletrolítico (Dentaqua), em comparação com o hipoclorito de sódio nas concentrações de 1%, 2,5% e 5,25%, por meio da contagem de unidades formadoras de colônias e avaliar, *in vitro*, a citotoxicidade de solução de ácido hipocloroso obtido a partir de dispositivo eletrolítico (Dentaqua), em comparação com o hipoclorito de sódio nas concentrações de 1%, 2,5% e 5,25%, por meio de ensaio MTT com células de fibroblastos.

Hipótese em estudo: o ácido hipocloroso obtido a partir de dispositivo eletrolítico (Dentaqua) promove maior desinfecção de canais radiculares e menor citotoxicidade quando comparado ao hipoclorito de sódio.

4. MATERIAL E MÉTODO

Este estudo foi aprovado pela comissão de Ética em Pesquisa da Universidade de Passo Fundo, sob o número de protocolo 5.783.928.

4.1 Dentaqua

Para a produção do ácido hipocloroso utilizou-se o equipamento Dentaqua® (figura 1), que transforma uma solução salina manipulada (figura 2) em ácido hipocloroso quando em contato com água no interior do aparelho eletrolítico. Essa solução salina é conhecida por “brine”, apresentando em sua composição 450ml de água deionizada, 50ml de cloreto de sódio e 25ml de ácido hidrolórico 9%.



Figura 1: Equipamento Dentaqua®



Figura 2: Solução Salina manipulada - brine

Em um primeiro momento foi realizada a produção do ácido hipocloroso 250ppm de acordo com as normas do fabricante. O Dentaqua® foi conectado à tomada, e então preencheu-se o tanque com água até o recobrimento completo do seu último sensor. O compartimento da solução brine também foi preenchido completamente. Em seguida o botão “Water Bottle” foi acionado por 3 segundos para iniciar um ciclo, ao fim da produção a substância produzida foi descartada. Foi conferido se o último sensor ainda estava coberto com água, e caso não estivesse seria preenchido com mais até recobri-lo. Então foi acionado o botão “Ecasol” por 2 segundos, dando início à produção do ácido hipocloroso. A produção durou em torno de 10 a 12 minutos, preenchendo de pouco em pouco a garrafa, quando houve um último depósito de maior tempo e volume; neste momento o ciclo encerrou-se, preenchendo metade da garrafa de ácido hipocloroso. A solução produzida (250ppm) foi inserida em um frasco becker para saber a quantidade exata da produção em ml. Após foi transferida para um frasco devidamente identificado (solução 250ppm) e em seguida iniciou-se a produção da outra metade da garrafa. O tanque foi preenchido com água novamente até cobrir o último sensor, e, neste momento, pressionou-se, novamente, “Ecasol” por 2 segundos, para produzir mais metade da garrafa. Procedeu-se dessa maneira até completar quatro litros de ácido hipocloroso 250ppm. Um litro de 250ppm foi dividido em dois frascos de 500 ml, destinando um frasco para o teste de ação antimicrobiana e 1 frasco para o teste de citotoxicidade e os três litros restantes foram usados na produção da solução de 500ppm.

Após a produção do ácido hipocloroso 250ppm, foi produzida a solução de 500ppm. O Dentaqua® foi desconectado da tomada, as garrafas removidas e esvaziado todo conteúdo que havia no interior da máquina. Com o equipamento vazio, as garrafas foram recolocadas e então conectou-se na tomada novamente. O tanque foi preenchido com a solução 250 ppm até cobrir o último sensor e preencheu-se completamente o compartimento do brine. Em seguida o botão “Water Bottle” foi acionado por 3 segundos para iniciar um ciclo, ao fim da produção a substância produzida foi descartada. Foi conferido se o último sensor ainda estava coberto com a solução 250ppm, e caso não estivesse seria preenchido com mais solução até recobri-lo. Então foi acionado o botão “Ecasol” por 2 segundos, dando início à produção do ácido hipocloroso 500ppm. A produção do ácido hipocloro 500ppm foi realizada da mesma maneira que citado anteriormente para produção do ácido hipocloroso 250ppm.

4.2 Ação Antimicrobiana

4.2.1 Obtenção e preparo das amostras

Sessenta dentes unirradiculares humanos extraídos (figura 3) obtidos através do Biobanco da Faculdade de Odontologia da Universidade de Passo Fundo foram utilizados para o presente estudo.



Figura 3: Seleção de sessenta dentes humanos extraídos

A porção coronária foi seccionada na junção amelocementária (figura 4), de forma que o remanescente radicular apresentasse um comprimento de 15 mm (figura 5). Foi utilizado para o corte, um disco de diamante rotativo (KG Sorensen Dupla face modelo 1802.7015), acoplado na peça reta de baixa rotação, utilizando água para refrigeração.

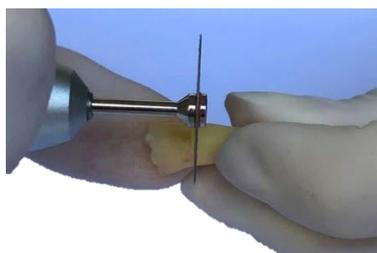


Figura 4: Secção na junção amelocementária



Figura 5: padronização em 15mm

Todas as raízes foram preparadas utilizando o mesmo protocolo, no intuito de remover o tecido pulpar e padronizar o diâmetro do canal. O comprimento de trabalho foi estabelecido através da introdução de uma lima tipo-K nº 10 no canal radicular, até que sua ponta fosse visualizada no forame apical. A partir desta medida reduziu-se 1 mm, estabelecendo o comprimento de trabalho. O preparo cervical (figura 6A) foi realizado com broca Largo nº 3 (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Suíça) e a ampliação apical realizada com o sistema rotatório ProTaper (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça), seguindo a sequência de limas S1, S2, F1, F2 e F3 (figura 6B). Todos os instrumentos foram utilizados no comprimento de trabalho, com velocidade de 250 rpm e torque de 2 N, programados previamente no motor X-Smart Plus (figura 4C, Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça). A substância química auxiliar utilizada durante a instrumentação das raízes foi água destilada (Decloquimis, São Paulo, SP, Brasil) e, após a instrumentação, foi realizada uma lavagem final com 3 mL de EDTA 17% (Iodontosul, Porto Alegre, RS, Brasil), para a remoção de *smear layer*.



Figura 6: A- Largo nº 3 para o preparo cervical. B- Sistema ProTaper Universal para ampliação apical. C- Motor X-Smart Plus. FONTE: dentalspeed.com

Após a conclusão da padronização do diâmetro dos canais radiculares, realizou-se o vedamento do forame apical com resina fotopolimerizável Opallis (figura 7A, FGM, Joinville, SC, Brasil), para evitar o extravasamento das substâncias testadas durante o experimento. A impermeabilização externa das raízes também ocorreu através de duas aplicações de adesivo a base de cianoacrilato (7B, SuperBonder – Henkel, São Paulo, SP, Brasil). Cada raiz foi fixada com silicone de condensação Putty-C para Impressão (Silon2APS - Dentsply, Petrópolis, RJ, Brasil) em um microtubo plástico (Axygen Inc, Union City, CA, EUA), de modo que a porção cervical ficasse posicionada para cima (figura 7C).

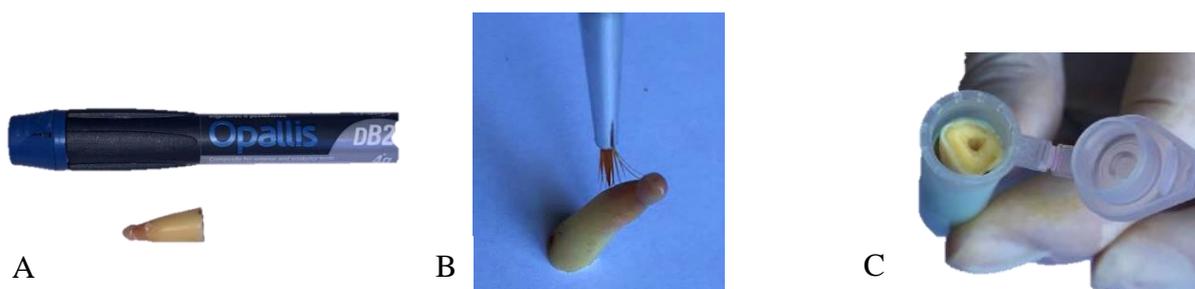


Figura 7: A- Vedamento apical com resina fotopolimerizável. B- Impermeabilização das raízes com cianoacrilato. C- Amostras fixadas em microtubos plásticos

As amostras foram alocadas em caixas de polipropileno (figura 8, Heathrow Scientific, Vernon Hills, IL, Estados Unites) e esterilizadas à temperatura de 120 °C em autoclave (Dabi Atlante, Ribeirão Preto, SP, Brasil), por um período de 30 minutos.



Figura 8: Disposição das amostras em caixas de polipropileno

4.2.2 Controle de esterilização

Um dente era selecionado aleatoriamente e submetido ao controle de esterilização. O dente selecionado era preenchido com 2 mL de solução salina estéril (figura 9A, Decloquimis, São Paulo, SP, Brasil), e, após 5 minutos, um cone de papel estéril com calibre #45 (Tanari, Manaus, AM, Brasil) era colocado em contato com as paredes do canal durante 30 segundos (figura 9B). Em seguida, o cone de papel era transportado individualmente para microtubos plásticos (Axygen Inc, Union City, CA, EUA) contendo 1 ml de solução salina estéril (Decloquimis, São Paulo, SP, Brasil). O material era homogeneizado (figura 9C) e semeado em placas de Petri com meio de cultura PCA (Plate Count Agar) através da técnica da gota, sendo pingadas cinco gotas de 15 µL (figura 9D). A placa era incubada a 37°C durante 48h, a fim de verificar o crescimento bacteriano.

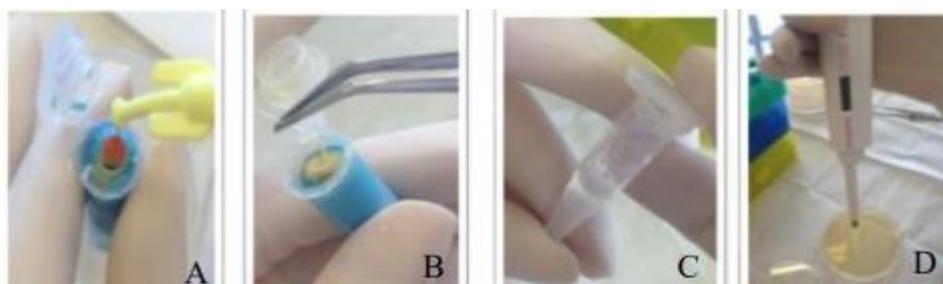


Figura 9: A- Dente selecionado aleatoriamente preenchido com solução salina estéril. B- Cone de papel estéril em contato com o canal. C- Homogeneização da solução. D- Semeadura em placa de petri

4.2.3 Preparo do inóculo

A estirpe de referência microbiana utilizada foi *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), obtida no Laboratório de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Passo Fundo. As bactérias foram ativadas e cultivadas em caldo BHI (Brain Heart Infusion) durante 24h a 37 °C em uma estufa bacteriológica. Após o período de incubação, o grau de turbidez do inóculo foi ajustado de acordo com a escala 1,0 de McFarland, que corresponde a $3,0 \times 10^8$ UFC/ml, referente a uma densidade ótica de 0,25 a 550 nm.

4.2.4 Contaminação dos canais radiculares

Uma alíquota de 100 μL do inóculo de *Enterococcus faecalis* contido no tubo de ensaio foi inserida no interior dos canais radiculares (figura 10A) até o seu completo preenchimento, utilizando seringas descartáveis de 1 ml. A cultura de *Enterococcus faecalis* foi mantida durante 14 dias, a fim de promover o crescimento de bactérias e a formação de biofilme, renovando o caldo BHI a cada 48h. Todos os procedimentos foram realizados sob condições assépticas em uma câmara de fluxo laminar (figura 10B).

A cada 48h, uma amostra era escolhida aleatoriamente para ser submetida ao controle microbiano, no intuito de verificar a ausência de contaminação por outras espécies microbianas, garantindo uma cultura pura de *Enterococcus faecalis*. Um cone de papel estéril com calibre #35 (Tanari, Manaus, AM, Brasil) foi introduzido no canal radicular e mantido em contato com as paredes do canal radicular, durante 30 segundos (figura 10C). Em seguida, o cone era transferido para um microtubo de plástico estéril contendo 1 mL de solução salina estéril, que era homogeneizada em um agitador e, então, realizada a semeadura através da técnica das gotas, sendo pingadas cinco gotas de 15 μL em placas de Petri contendo PCA (figura 10D). A placa era incubada a 37°C durante 48h e, em seguida, era realizada análise da morfologia das unidades formadoras de colônias (UFCs), bem como análise de coloração de Gram, a fim de confirmar a contaminação somente por *Enterococcus faecalis* (figura 10E).

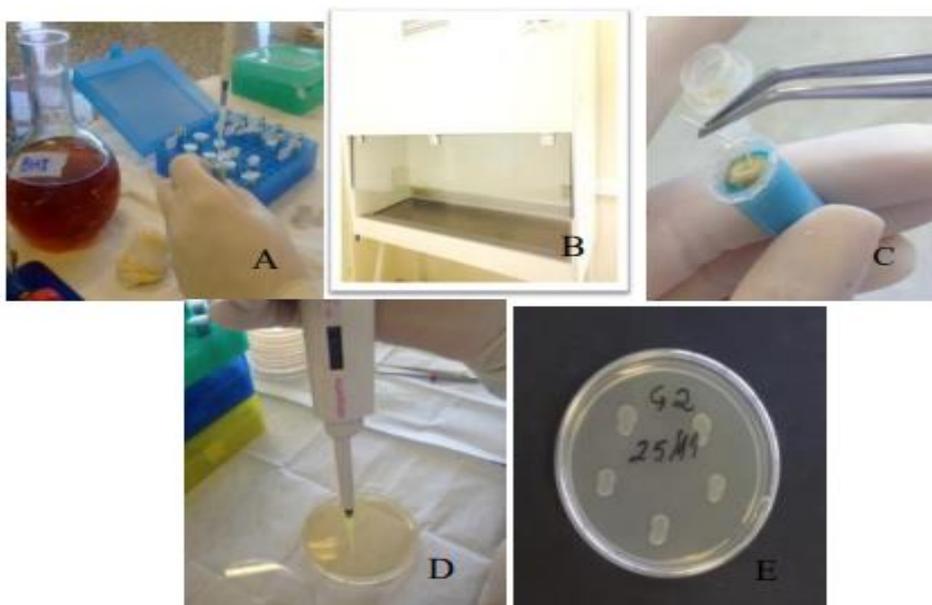


Figura 10: A- Contaminação dos canais radiculares. B- Câmara de fluxo laminar. C- Cone de papel em contato com as paredes do canal. D- Técnica de gotas. E- Análise da morfologia.

4.2.5 Avaliação de descontaminação dos protocolos testados

Após o período de 14 dias de contaminação com *Enterococcus faecalis*, as sessenta amostras foram divididas em seis grupos (n=10), de acordo com os protocolos de descontaminação utilizados (tabela 1), como segue: G1 – água deionizada (DW), sendo o grupo controle; G2 – hipoclorito de sódio 1% (NaOCl 1%); G3 – hipoclorito de sódio 2,5% (NaOCl 2,5%); G4 – hipoclorito de sódio 5,25% (NaOCl 5,25%); G5 – ácido hipocloroso 250ppm (DENTAQUA 250ppm); G6 – ácido hipocloroso 500ppm (DENTAQUA 500ppm).

Tabela 1: Distribuição dos grupos de acordo com o protocolo de descontaminação testado

Grupo	Protocolo de descontaminação
1	DW
2	NaOCl 1%
3	NaOCl 2,5%
4	NaOCl 2,25%
5	DENTAQUA 250ppm
6	DENTAQUA 500ppm

Os canais radiculares foram preenchidos com as substâncias químicas testadas até o extravasamento com uma seringa descartável estéril de 5 mL e agulha de calibre 30 (Navi-Tip - Ultradent, South Jordan, UT, Estados Unidos). A substância permaneceu em contato com as paredes do canal pelo período de 5 minutos, depois foi aspirada e renovada até extravasamento. No total, foram 6 ciclos de 5 minutos, totalizando 30 minutos da substância no interior do canal radicular. Após este período, foi realizada irrigação com 5 mL de água destilada.

Após o término dos protocolos de irrigação final, os canais radiculares de todos os grupos foram aspirados e secos com cones de papel absorvente F3 do sistema rotatório ProTaper (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça).

4.2.6 Realização das coletas e análise microbiológica

A coleta do conteúdo microbiano do interior do canal radicular das amostras foi realizada em dois momentos. A primeira coleta (S1) foi realizada imediatamente após o período de contaminação das amostras e a segunda coleta (S2) foi realizada imediatamente após os protocolos de descontaminação testados.

As coletas (S1 e S2) foram realizadas da mesma forma. O canal radicular foi preenchido com solução salina estéril e uma ponta de papel absorvente estéril calibre #35 foi introduzida no interior do canal radicular, realizando movimentos circulares, no intuito de encostar intencionalmente em todas as paredes do canal, pelo período de 30 segundos. Depois disso, a ponta de papel absorvente foi transferida para um microtubo contendo 1 mL de solução salina estéril. O material foi homogeneizado e diluído até 10^{-3} (figura 11). Alíquotas foram semeadas em placas de Petri contendo PCA através da técnica das gotas, no local correspondente da diluição utilizada (figura 12). As placas foram incubadas durante 24 horas a uma temperatura de 37°C . Após o período de incubação, a contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFCs) foi realizada nas placas (figura 13).

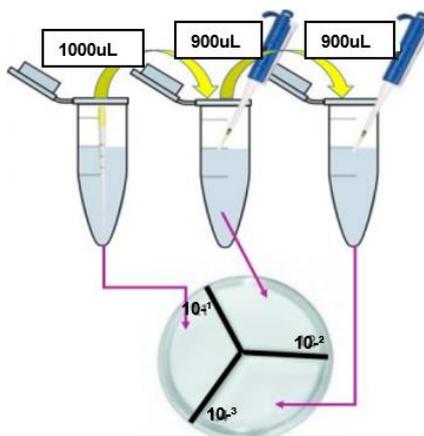


Figura 11: Esquema de diluição dos materiais homogeneizados em placas de petri

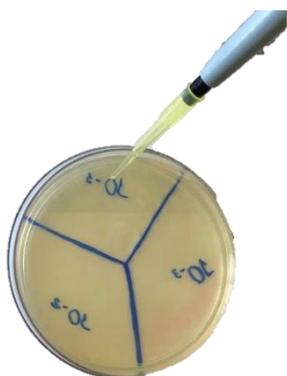


Figura 12: Semeadura no local correspondente à diluição

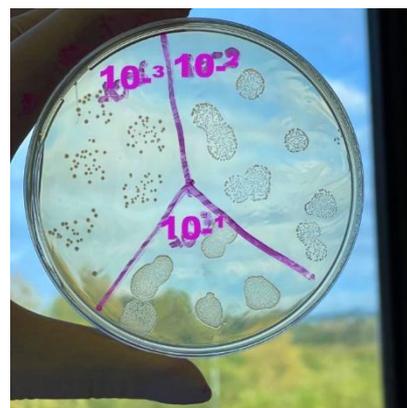


Figura 13: Contagem de UFCs após 24h de incubação das placas em estufa bacteriológica

4.2.7 Análise estatística

A análise estatística foi realizada calculando o percentual de redução de *Enterococcus faecalis* a partir da contagem inicial e final de unidades formadoras de colônias nos diferentes grupos de protocolos de descontaminação testados, utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Percentual de redução} = 100 - [(\text{Valor final}/\text{Valor inicial}) \times 100].$$

One-way ANOVA foi aplicado na avaliação microbiológica, seguido pelo procedimento de post hoc de Tukey, a 5% de nível de significância. Os dados foram analisados utilizando o programa SPSS versão 17.0 (SPSS, Chicago, IL, Estados Unidos).

4.3 Citotoxicidade

4.3.1 Obtenção e manutenção das células L929

Neste experimento, foram utilizadas células L929, que são culturas contínuas de fibroblastos de gengiva, provenientes da American Type Culture Collection (ATCC), gentilmente cedidas pelo Laboratório de Virologia Aplicada da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC, Florianópolis, SC, Brasil). Para a manutenção das células foi escolhido o meio MEM (Minimum Essential Media – Sigma-Aldrich, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil) em frascos de cultura de 75 cm² mantidos em atmosfera umidificada a 37° C e 5% de CO². Não foram utilizados antibióticos ou antifúngicos durante a manutenção da cultura celular e/ou experimentos.

4.3.2 Ensaio MTT

Para avaliação da citotoxicidade celular, foi realizado o ensaio com brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium ou MTT (Metiltetrazólio) (Sigma-Aldrich), que corresponde a um teste colorimétrico utilizado para avaliar a viabilidade celular. No dia anterior ao ensaio, as células L929 foram tripsinizadas, contadas

e distribuídas em placas de 96 poços (figura 14) na concentração de 1×10^5 células por poço. O meio para a realização dos experimentos foi o DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Sigma-Aldrich, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), enriquecido com 5% de soro fetal bovino.



Figura 14: Placa de 96 poços para distribuição das células

4.3.3 Exposição as substâncias químicas

Após a incubação durante 24 horas a 37°C em estufa com 5% de CO_2 , foi realizada a observação da confluência do tapete celular através da visualização em microscópio invertido (figura 15). A seguir, o meio DMEM foi retirado por aspiração e 100 μL das seguintes soluções (tabela 1, p.31) foram adicionadas e incubadas no período de 3 minutos:

- G1 – água deionizada (controle);
- G2 – hipoclorito de sódio 1% (NaOCl 1%);
- G3 – hipoclorito de sódio 2,5% (NaOCl 2,5%);
- G4 – hipoclorito de sódio 5,25% (NaOCl 5,25%);
- G5 – ácido hipocloroso 250ppm (HClO 250ppm);
- G6 – ácido hipocloroso 500ppm (HClO 500ppm).



Figura 15: Microscópio invertido

4.3.4 Lavagem dos poços e agitação

Após o tempo de incubação, os poços foram lavados com 200 μL de Solução Tampão Fosfato Salina (PBS) estéril a temperatura de 37°C , e foram adicionados 50 mL da solução de MTT (1mg/mL em meio DMEM), para incubação pelo período de 4 horas (figura 16). Posteriormente, o MTT foi cuidadosamente retirado evitando a

danificação das células e foram adicionados 100 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) para solubilização dos cristais de formazam (figura 17). Também foi adicionado o DMSO em poços vazios para o cálculo do branco. A placa foi colocada em um agitador durante 10 minutos de incubação e a absorbância foi, então, mensurada em filtro de 490 nm.



Figura 16: Adição de 50ml de solução de MTT

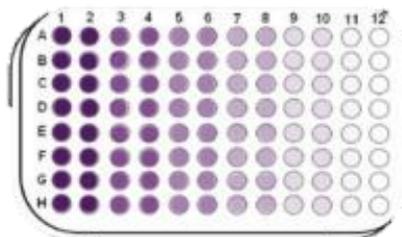


Figura 17: Adição de 100ml de solução de DMSO

4.3.5 Análise estatística

Ressalta-se que todos os experimentos foram realizados em triplicata e as porcentagens de viabilidade celular foram calculadas em relação aos controles celulares, conforme fórmula abaixo:

$$\% \text{ de viabilidade} = \frac{(\text{absorbância da amostra} - \text{média da absorbância do branco}) \times 100}{(\text{absorbância do controle} - \text{média da absorbância do branco})}$$

A análise estatística foi realizada por meio do teste One Way ANOVA seguido de Post hoc de Tukey ($\alpha=0,05$).

5. RESULTADOS

A média e o desvio padrão para a porcentagem de redução bacteriana e células viáveis após o tratamento com as substâncias químicas testadas estão descritos na Tabela 2.

Os resultados de ação antimicrobiana revelaram que todas as substâncias testadas foram efetivas na redução bacteriana, quando comparadas ao grupo controle, sem diferença estatística entre eles ($p < 0,05$).

Os resultados de citotoxicidade demonstraram que todas as substâncias químicas testadas foram diferentes estatisticamente quando comparadas ao grupo controle, sendo que os grupos G2, G3 e G4 foram semelhantes entre si e os grupos G5 e G6 se mostraram menos citotóxicos ($p < 0,05$).

Tabela 2: média e desvio padrão (\pm) para a porcentagem de redução bacteriana (%) e células viáveis (%) após o tratamento com as substâncias químicas testadas.

Grupo	Redução bacteriana %	Células viáveis %
1. DW	12.03(4.37) ^a	98.88 (1.12) ^a
2. NaOCl 1%	97.59 (2.74) ^b	35.70 (0.10) ^d
3. NaOCl 2,5%	100.00 (0.00) ^b	35.66 (0.43) ^d
4. NaOCl 5,25%	100.00 (0.00) ^b	34.76 (0.98) ^d
5. HClO 250ppm	97.18 (3.15) ^b	49.06 (1.99) ^b
6. HClO 500ppm	99.94 (0.22) ^b	41.73 (1.15) ^c

* Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$).

** DW = água destilada; NaOCl = hipoclorito de sódio; HClO = ácido hipocloroso.

6. DISCUSSÃO

O sucesso do tratamento endodôntico depende da limpeza, modelagem e, principalmente, da desinfecção do sistema de canais radiculares, pois sabe-se que os microrganismos desempenham um papel fundamental na indução e perpetuação das alterações patológicas que acometem a polpa e os tecidos periapicais (KAKEHASHI, 1965). Dentre estes microrganismos presentes na microbiota endodôntica há uma espécie em destaque, o *Enterococcus faecalis*, que apresenta maior resistência bacteriana por tratar-se de uma bactéria anaeróbia facultativa, dificultando sua eliminação durante o preparo químico-mecânico convencional (PINHEIRO *et al.*, 2003). Esta resistência faz com que as bactérias frequentemente persistam no canal radicular após seu preparo químico-mecânico e obturação, ocasionando, muitas vezes, um insucesso endodôntico (MOLANDER *et al.*, 1998). Em casos de falha endodôntica, o *Enterococcus faecalis* é a espécie dominante (SUNDQVIST *et al.*, 1998).

Por estas razões, durante o tratamento endodôntico se faz necessário o uso de substâncias químicas auxiliares que contribuam para a descontaminação dos canais radiculares, sendo eficazes contra uma ampla gama de microrganismos, ao mesmo tempo que não causem efeitos deletérios como a citotoxicidade, apresentando compatibilidade com os tecidos do hospedeiro (SIMBULA *et al.*, 2010). No decorrer do tratamento, estes irrigantes, muitas vezes, entram em contato com os tecidos periradiculares, podendo causar reações como o dano tecidual, gerando desconforto ao paciente e interferências no processo de cicatrização (AMARAL *et al.*, 2007). Sendo assim, estudos sobre a citotoxicidade dos irrigantes utilizados em endodontia são de grande valia tanto para habilitar o uso clínico de novas substâncias, quanto para determinar quais os riscos decorrentes do uso inadequado de um produto com índice citotóxico.

O presente estudo propôs avaliar o potencial de ação antimicrobiana e citotoxicidade de uma substância conhecida por ácido hipocloroso, obtida através de um dispositivo eletrolítico nomeado Dentaqua®, em comparação com diferentes concentrações de hipoclorito de sódio, comumente utilizado para sanificação dos canais radiculares. Através do estudo, foi possível simular um tratamento endodôntico convencional, utilizando os irrigantes testados por trinta minutos dentro dos canais, com renovação dos líquidos a cada cinco minutos, na intenção de reproduzir a irrigação realizada durante do tratamento de canal para promover a descontaminação.

Dentre os procedimentos envolvidos no controle das infecções do canal radicular, a irrigação é um processo de grande importância na eliminação de microrganismos (MENEZES *et al.*, 2004). O NaOCl é o irrigante mais utilizado e numerosas publicações abordaram sua capacidade antimicrobiana, no entanto, o tempo necessário para erradicar completamente o *E. faecalis* com as concentrações comumente usadas não foi determinado. Na literatura, o tempo de irrigação ou contato da substância varia de dois a trinta minutos, porém não existe um protocolo a respeito da concentração e tempo de irrigação necessários para remover as bactérias dos canais (RETAMOZO *et al.*, 2010). Segundo SOUZA *et al.*, em 2018, para eliminar bactérias persistentes do canal são necessárias alta concentração, grande volume e longa exposição ao NaOCl, e com o advento da instrumentação reciprocante, a técnica de preparo se tornou mais rápida, reduzindo o tempo de contato das soluções de hipoclorito com as paredes do canal radicular, reduzindo assim a atividade antimicrobiana da solução. Dessa forma, sabe-se que alta concentração e longa exposição ao NaOCl são necessárias para a eliminação do *E. faecalis* (RETAMOZO *et al.*,

2010). Porém quanto maior a concentração e tempo de exposição, maiores são os efeitos deletérios desta substância.

Por estes motivos, busca-se uma substância química auxiliar que promova a descontaminação ao mesmo tempo que não cause injúrias ao elemento dentário e ao paciente. Este estudo analisou o ácido hipocloroso (HOCl) com a intenção de que fosse um possível substituto aos irrigantes já comumente utilizados. Trata-se de uma substância endógena de todos os mamíferos e eficaz contra uma ampla gama de microrganismos (WANG et al., 2007), sendo gerado pelas células imunológicas do corpo para combater patógenos invasores e infecções (LAPENNA; CUCCURULLO, 1996), e devido a suas características, seu uso é atrativo para desinfecção dos canais. Além disso, estudos mostram que esta não é uma substância irritante e não sensibiliza células devido a sua baixa citotoxicidade quando comparada com NaOCl (WANG et al., 2007). O ácido hipocloroso está presente na composição do NaOCl e é o seu ingrediente mais ativo, pois tem a maior ação germicida dos componentes, por isso é ele que determina a atividade da solução de NaOCl quando diluída e, por ter carga neutra pode facilmente penetrar na membrana lipídica (NIZER *et al.*, 2020). Para obter o ácido hipocloroso durante a pesquisa, empregou-se um equipamento eletrolítico denominado Dentaqua®, que transforma uma solução salina patenteadada em ácido hipocloroso, porém ainda não existem estudos sobre o uso deste equipamento na odontologia, justificando a realização deste. O Dentaqua®, segundo seus fabricantes, produz ácido hipocloroso ativado (HOCl) e espécies reativas de oxigênio (ROS) de vida curta, sempre em pH neutro e com um teor de cloreto residual extremamente baixo, altamente eficaz em concentrações e tempos de contato muito baixos e não tóxico (DENTAQUA, 2022).

Os métodos para avaliar o potencial antimicrobiano e citotóxico das substâncias testadas foram a contagem de unidades formadoras de colônias (UFCs) e ensaio com Metil tetrazólio (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium), conhecido por MTT. Diferentes testes microbiológicos são utilizados para avaliar a descontaminação proporcionada por protocolos químicos na terapia endodôntica e, neste estudo, utilizou-se a contagem de UFCs para determinar a eficácia das soluções na eliminação do *Enterococcus faecalis*. O método foi escolhido com base em outros estudos que mostraram ser um protocolo efetivo (GRÜNDLING *et al.*, 2011, ALMEIDA *et al.*, 2014) e permite quantificar as bactérias dos canais radiculares de forma aceitável (SOUZA *et al.*, 2018). No entanto, as amostras microbiológicas foram coletadas apenas no canal principal não sendo possível avaliar a presença de *E. faecalis* nos túbulos dentinários ou canais acessórios. Não há consenso na literatura sobre o tempo necessário para o crescimento bacteriano do *E. faecalis*. Entretanto, um estudo de GUERREIRO-TANOMARU et al. (2013) mostra que 14 dias é um tempo suficiente para a formação de biofilme no canal radicular. Em razão disso foi adotado um protocolo de 14 dias de cultura do *E. faecalis*, para que o crescimento bacteriano fosse garantido e para garantir uma boa testagem dos irrigantes finais com ação antimicrobiana.

Para avaliar a viabilidade celular foram selecionados fibroblastos derivados da linha celular de camundongo L929 devido à sua adequação para este tipo de experimento (BARBOSA *et al.*, 2009). O ensaio de MTT é um dos métodos mais utilizados na literatura para avaliar a citotoxicidade de um material, incluindo soluções irrigantes (CHÁVEZ-ANDRADE et al., 2017; PRADO et al., 2015; AMARAL et al., em 2007; TEIXEIRA et al., 2018, BARBOSA *et al.*, 2009). Foi introduzido por Mosmann em 1983 (MOLLASHAHI *et al.*, 2016) e segundo o próprio autor “o ensaio detecta células vivas e o sinal gerado depende do grau de ativação das células. Pode, portanto, ser usado para medir citotoxicidade, proliferação ou ativação. As principais vantagens do ensaio colorimétrico são sua rapidez e precisão, e a ausência de qualquer radioisótopo”. Este método avalia a

citotoxicidade de materiais dentários com base nas mudanças no número de células viáveis, metabolismo celular e morfologia celular (MOLLASHAH *et al.*, 2016).

O presente estudo revelou que o ácido hipocloroso apresenta efetivo potencial de ação antimicrobiana, semelhante ao hipoclorito de sódio, indo ao encontro de outros estudos que já haviam obtido resultados semelhantes. Para MARAIS, em 2000, a comparação de água eletroquimicamente ativada com o hipoclorito de sódio, avaliando a limpeza das paredes do canal radicular, demonstrou que a água eletroquimicamente ativada foi superior ao NaOCl. Além disso, CHEN *et al.*, em 2016 compararam a eficácia do ácido hipocloroso, hipoclorito de sódio e clorexidina na eliminação de bactérias gram positivas e negativas da superfície de implantes contaminados por biofilme, e o HOCl exibiu melhor eficácia antibacteriana. Este potencial antimicrobiano pode estar relacionado ao fato do ácido hipocloroso apresentar pH neutro, conferindo mobilidade para atravessar as membranas celulares e potencialmente impactar outras biomoléculas intracelularmente (ROBINS *et al.*, 2022). Outro fato que explica o seu mecanismo de ação é que por tratar-se substância endógena de todos os mamíferos (WANG *et al.*, 2007), o ácido hipocloroso é gerado pelos neutrófilos durante sua ação para matar microrganismos, pois é um oxidante altamente microbicida (WINTERBOURN *et al.*, 2016).

Para mais, o potencial citotóxico do ácido hipocloroso foi menor quando comparado ao hipoclorito de sódio, como já mostrado na literatura. O estudo de WANG *et al.*, em 2007, descreveu a produção química, estabilização e atividade biológica de uma formulação de HOCl e, segundo os autores, quando comparada aos desinfetantes peróxido de hidrogênio e hipoclorito de sódio esta substância melhorou a atividade antimicrobiana e o índice terapêutico, concluindo que por apresentar ação antimicrobiana e não ter toxicidade o HOCl tem potencial para aplicações farmacêuticas no controle de infecções. Na área da medicina foi possível concluir que uma solução de HOCl de baixa concentração pode ser usada como uma solução eficaz para irrigação nasal (KIM *et al.*, 2008).

Dois concentrações do ácido hipocloroso foram testadas neste estudo e concluiu-se que quando a concentração é aumentada temos uma melhora no potencial antimicrobiano, mas, em contrapartida, a viabilidade das células sofre uma diminuição, demonstrando que uma maior concentração gera um potencial citotóxico. Este achado vai de encontro com o estudo de SEVEREING *et al.*, em 2019, que determinaram a citotoxicidade e potencial antimicrobiano de NaOCl e HOCl em feridas, concluindo que o aumento da atividade antimicrobiana foi associado à diminuição da viabilidade celular.

Diante do exposto, os resultados deste estudo foram satisfatórios pois demonstraram que o ácido hipocloroso obtido através do Dentaqua® promoveu efetiva redução bacteriana, semelhante ao hipoclorito de sódio, sem diferença estatística entre eles. Além disso, mostrou-se menos citotóxico, apresentando maior viabilidade das células testadas. Estes resultados vão ao encontro a outros já descritos na literatura. Por fim, ressalta-se a importância clínica deste estudo, devido à necessidade atual de buscar novas alternativas de substâncias químicas que possam ser utilizadas na terapia endodôntica com melhores propriedades. Desta maneira, a substância testada mostra-se atraente para ser utilizada como uma substância química auxiliar na endodontia, porém mais estudos precisam ser realizados a respeito destas e outras propriedades, como as mecânicas, bem como estudos *in vivo* desta nova solução. Ademais, tratando-se de um equipamento importado o dispositivo Dentaqua® apresenta um alto custo, o que encareceria o tratamento e não seria uma alternativa viável a todos os endodontistas.

7. CONCLUSÕES

Diante das limitações do presente estudo, pode-se concluir que o ácido hipocloroso produzido no dispositivo eletrolítico Dentaqua® foi tão efetivo quanto o hipoclorito de sódio na redução bacteriana e se apresentou menos citotóxico quando comparado a essa substância.

8. REFERÊNCIAS

AMARAL, K.F.; ROGERO, M.M.; FOCK, R.A.; BORELLI, P.; GAVINI, G. Cytotoxicity analysis of EDTA and citric acid applied on murine residente macrophages culture. *Int Endod J.* v. 40, n. 5, p 338-343, 2007.

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 of Endodontics*, v. 40, n. 6, p. 876–879, 2014.

AYDIN, Z.U; AKPINAR, K.E; HEPOKUR, C.; ERDÖNMEZ, D. Assessment of toxicity and oxidative DNA damage of sodium hypochlorite, chitosan and propolis on fibroblast cells. *Brazilian oral research*, v. 32, p. 119, 2018.

BACA, P.; JUNCO, P.; ARIAS-MOLIZ, M.T.; GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, M.P.; FERRER-LUQUE, C.M. Residual and antimicrobial activity of final irrigation protocols on enterococcus faecalis biofilm in dentin. *Journal of Endodontics*, v. 37, n. 3, p. 363–366, 2011.

BARBOSA, S.V; BARROSO, C.M; RUIZ, P.A. Cytotoxicity of endodontic irrigants containing calcium hydroxide and sodium lauryl sulphate on fibroblasts derived from mouse L929 cell line. *Brazilian dental journal*, v. 20, n. 2, p. 118–121, 2009.

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

CASTILLO, D.M.; CASTILLO, Y.; DELGADILLO, N.A; NEUTA, Y.; JOLA, J.; CALDERÓN, J.L; LAFAURIE, G.I. Viability and effects on bacterial proteins by oral rinses with hypochlorous acid as active ingredient. *Brazilian Dental Journal*, v. 26, n. 5, p. 519–524, 2015.

CHÁVEZ-ANDRADE, G.M; TANOMARU-FILHO, M.; RODRIGUES, E. M; GOMES-CORNÉLIO, A. L; FARIA, G; BERNARDI, M. I. B; GUERREIRO-TANOMARU, J.M. Cytotoxicity, genotoxicity and antibacterial activity of poly(vinyl alcohol)-coated silver nanoparticles and farnesol as irrigating solutions. *Archives of oral biology*, v. 84, p. 89–93, 2017.

CHEN, C.; CHEN, C.; DING, S. Effectiveness of Hypochlorous Acid to Reduce the Biofilms on Titanium Alloy Surfaces in Vitro. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 17, n. 7, p. 1161, 2016.

CHEN, K.K.; WU, J.H.; WEI, S.I; DU, J.K. Influence of the acidity of electrolyzed water on the microhardness of inner layer dentin. *Journal of Dental Sciences*, v. 14, n. 4, p. 419–425, 2019.

DE ALMEIDA, A.P.; SOUZA, M.A.; MIYAGAKI, D.C.; DAL BELLO, Y.; CECCHIN, D.; FARINA, A.P. Comparative evaluation of calcium hypochlorite and sodium hypochlorite associated with passive ultrasonic irrigation on antimicrobial activity of a root canal system infected with *Enterococcus faecalis*: an *in vitro* study. *Journal of endodontics*, v. 40, n. 12, p. 1953–1957, 2014.

DENTAQUA 2022. Disponível em <: <https://dentaqua.com/about-dentaqua/>>. Acesso em 14 jan. 2023.

DU, T.; WANG, Z.; SHEN, Y.; MA, J.; CAO, Y.; HAAPASALO, M. Effect of Long-term Exposure to Endodontic Disinfecting Solutions on Young and Old *Enterococcus faecalis* Biofilms in Dentin Canals. *Journal of Endodontics*, v. 40, n. 4, p. 509–514, 2014.

FAIR, G.M.; MORRIS, J.C.; CHANG, S.L.; WEIL, I.; BURDEN, R.P. The Behavior of Chlorine as a Water Disinfectant. *Journal of the American Water Works Association*, v. 1, p. 1051–1061, 1948.

FARINA, A.P.; CECCHIN, D.; BARBIZAM, J.V.B.; CARLINI, B.J. Influence of endodontic irrigants on bond strength of a self-etching adhesive. *Australian Endodontic Journal*, v. 37, n. 1, p. 26–30, 2011.

GHISI, A.C.; KOPPER, P.M.P.; BALDASSO, F.E.R.; STÜRMER, C.P.; ROSSI-FEDELE, G.; STEIER, L.; FIGUEIREDO, J.A.P.; MORGENTAL, R.D.; VIER-PELISSER, F.V. Effect of Super-Oxidized Water, Sodium Hypochlorite and EDTA on Dentin Microhardness. *Brazilian Dental Journal*, v. 25, n. 5, p. 420-424, 2014.

GHISI, A.C.; KOPPER, P.M.P.; BALDASSO, F.E.R.; STÜRMER, C.P.; ROSSI-FEDELE, G.; STEIER, L.; FIGUEIREDO, J.A.P.; MORGENTAL, R.D.; VIER-PELISSER, F.V. Effect of Superoxidized Water and Sodium Hypochlorite, Associated or Not with EDTA, on Organic and Inorganic Components of Bovine Root Dentin. *Journal Of Endodontics*, v. 41, n. 6, p. 925-930, 2015.

GRÜNDLING, G.L.; ZECHIN, J.G.; JARDIM, W.M.; DE OLIVEIRA, S.D.; DE FIGUEIREDO, J.A. Effect of ultrasonics on enterococcus faecalis biofilm in a bovine tooth model. *Journal of endodontics*, v. 37, n.8, p. 1128–1133, 2011.

GUERREIRO-TANOMARU, J.M.; DE FARIA-JÚNIOR, N.B.; DUARTE, M.A.; ORDINOLA-ZAPATA, R.; GRAEFF, M.S.; TANOMARU-FILHO, M. Comparative analysis of *Enterococcus faecalis* biofilm formation on different substrates. *Journal of Endodontics*, v.39, n.3, p. 346-350, 2013.

HSIEH, S.C.; TENG, N.C.; CHU, C.C.; CHU, Y.T.; CHEN, C.H.; CHANG, L.Y.; HSU, C.Y.; HUANG, C.S.; HSIAO, G.Y.W.; YANG, J. Chang. The Antibacterial Efficacy and In Vivo Toxicity of (EO) Water-Based Endodontic Irrigating Solutions. *Materials*, v. 13, n. 2, p. 1–9, 2020.

KAKEHASHI, R. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral surgery, oral medicine, and oral pathology*, v. 20, n. 3, p. 340–349, 1965.

KIM, H. J.; LEE, J.G.; KANG, J.W.; CHO, H.J.; KIM, H.S.; BYEON, H.K.; YOON, J.H. Effects of a low concentration hypochlorous acid nasal irrigation solution on bacteria, fungi, and virus. *Laryngoscope*, v. 118, n. 10, p. 1862–1867, 2008.

LAFaurIE, G.; ZAROR, C.; DÍAZ-BÁEZ, D.; CASTILLO, D.; ÁVILA, J.; TRUJILLO, T.; CALDERÓN-MENDOZA, J. Evaluation of substantivity of hypochlorous acid as an antiplaque agent: A randomized controlled trial. *International Journal of Dental Hygiene*, v. 16, n. 4, p. 527–534, 2018.

LAPENNA, D.; CUCCURULLO, F. Hypochlorous Acid and its Pharmacological Antagonism: An Update Picture. *General pharmacology*, v. 27, n. 7, p. 1145–1147, 1996.

LEONARDO, N.G.S.; CARLOTTO, I.B.; LUISI, S.B.; KOPPER, P.M.P.; GRECCA, F.S.; MONTAGNER, F. Calcium Hypochlorite Solutions: Evaluation of Surface Tension and Effect of Different Storage Conditions and Time Periods over pH and Available Chlorine Content. *Journal of Endodontics*, v. 42, n. 4, p. 641–645, 2016.

MAINNEMARE, A.; MÉGARBANE, B.; SOUEIDAN, A.; DANIEL, A.; CHAPPLE, I.L.C. Hypochlorous Acid and Taurine-N-Monochloramine in Periodontal Diseases. *Journal of Dental Research*, v. 83, n. 11, p. 823–831, 2004.

MARAIS, J. T. Cleaning efficacy of a new root canal irrigation solution: A preliminary evaluation. *International Endodontic Journal*, v. 33, n. 4, p. 320–325, 2000.

MARENDING, M.; LUDER, H.U.; BRUNNER, T.J.; KNECHT, S.; STARK, W.J.; ZEHNDER, M. Effect of sodium hypochlorite on human root dentine – mechanical, chemical and structural evaluation. *International Endodontic Journal*, v. 40, n. 10, p. 786–793, 2007.

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.

MENEZES, M.M; VALERA, M.C; JORGE, A.O; KOGA-ITO, C.Y; CAMARGO, C.H; MANCINI, M.N. In vitro evaluation of the effectiveness of irrigants and intracanal medicaments on microorganisms within root canals. *International endodontic journal*, v.37, n.5, p. 311–319, 2004.

MOLANDER, A; REIT, C; DAHLÉN, G; KVIST, T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *International Endodontic Journal*, v.31, n.1, p. 1-7, 1998.

MOLLASHAHI, N.F.; SABERI, E.; KARKEHABADI, H.; Evaluation of Cytotoxic Effects of Various Endodontic Irrigation Solutions on the Survival of Stem Cell of Human Apical Papilla. *Irâ Endod J.* v. 11, n. 4, p.293-297. 2016.

MORAGO, A.; ORDINOLA-ZAPATA, R.; FERRER-LUQUE, C.M.; BACA, P.; RUIZ-LINARES, M.; ARIAS-MOLIZ, M.T. Influence of Smear Layer on the Antimicrobial Activity of a Sodium Hypochlorite/Etidronic Acid Irrigating Solution in Infected Dentin. *Journal of Endodontics*, v. 42, n. 11, p. 1647–1650, 2016.

MOREIRA, D.M.; ALMEIDA, J.F.A.; FERRAZ, C.C.R.; GOMES, B.P.F.A; LINE, S.R.P.; ZAIA, A.A. Structural Analysis of Bovine Root Dentin after Use of Different Endodontics Auxiliary Chemical Substances. *Journal of Endodontics*, v. 35, n. 7, p. 1023–1027, 2009.

MORITA, C.; NISHIDA, T.; ITO, K. Biological toxicity of acid electrolyzed functional water: Effect of oral administration on mouse digestive tract and changes in body weight. *Archives of Oral Biology*, v. 56, n. 4, p. 359–366, 2011.

NIZER, W.S. da C.; INKOVSKIY, V.; OVERHAGE, J. Surviving reactive chlorine stress: Responses of gram-negative bacteria to hypochlorous acid. *Microorganisms*, v. 8, n. 8, p. 1–27, 2020.

NOCCA, G.; AHMED, H.M.A.; MARTORANA, G.E.; CALLÀ, C.; GAMBARINI, G.; RENGO, S.; SPAGNUOLO, G. Chromographic Analysis and Cytotoxic Effects of Chlorhexidine and Sodium Hypochlorite Reaction Mixtures. *Journal of Endodontics*, v. 43, n. 9, p. 1545–1552, 2017.

OKINO, L.A.; SIQUEIRA, E.L.; SANTOS, M.; BOMBANA, A.C.; FIGUEIREDO, J.A.P. Dissolution of pulp tissue by aqueous solution of chlorhexidine digluconate and chlorhexidine digluconate gel. *International Endodontic Journal*, v. 37, n. 1, p. 38–41, 2004.

PINHEIRO, ET.; GOMES, BPFA.; FERRAZ, CCR.; SOUSA, ELR.; TEIXEIRA. FB.; SOUZA FILHO, FJ. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int J Endod*, v. 36, p. 1-11, 2003.

PLUTZER, B.; ZILM, P.; RATNAYAKE, J.; CATHRO, P. Comparative efficacy of endodontic medicaments and sodium hypochlorite against *Enterococcus faecalis* biofilms. *Australian Dental Journal*, v. 63, n. 2, p. 208–216, 2018.

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

ROSSI-FEDELE, G.; FIGUEIREDO, J.A.P.; STEIER, L.; CANULLO, L.; STEIER, G.; ROBERTS, A.P. Evaluation of the antimicrobial effect of super-oxidized water (Sterilox®) and sodium hypochlorite against

Enterococcus faecalis in a bovine root canal model. *Journal Of Applied Oral Science*, v. 18, n. 5, p. 498–502, 2010.

ROBINS, L. I.; CLARK, A.; GAFKEN, P. R.; ALAM, S.; MILICI, J.; HASSAN, R.; WANG, C. Y.; WILLIAMS, J.; MEYERS, C. Hypochlorous acid as a disinfectant for high-risk HPV: Insight into the mechanism of action. *Journal of medical virology*, v. 94, n.7, p. 3386–3393, 2022.

ROSSI-FEDELE, G.; GUASTALLI, A.R.; DOGRAMACI, E.J.; STEIER, L.; FIGUEIREDO, J.A.P. Influence of pH changes on chlorine-containing endodontic irrigating solutions. *International Endodontic Journal*, v. 44, n. 9, p. 792–799, 2011.

ROSSI-FEDELE, G.; DOGRAMACI, E.J.; STEIER, L.; FIGUEIREDO, J.A.P. Some factors influencing the stability of Sterilox®, a super-oxidised water. *British Dental Journal*, v. 210, n. 12, p. 23-23, 2011.

SCOTT, M.B.; ZILINSKI, G.S.; KIRKPATRICK, T.C.; HIMEL, V.T.; SABEY, K.A.; LALLIER, T.E. The Effects of Irrigants on the Survival of Human Stem Cells of the Apical Papilla, Including Endocyn. *Journal of Endodontics*, v. 44, n. 2, p. 263–268, 2018.

SEXTON, J.D.; REYNOLDS, K.A.; GARAVITO, F.; ANDERSON, B.; IVASKA, J.M. Impact of a Whole-Room Atomizing Disinfection System on Healthcare Surface Contamination, Pathogen Transfer, and Labor Efficiency. *Critical Care Explorations*, v. 3, n. 2, p. 0340, 2021.

SIMBULA, G.; DETTORI, C.; CAMBONI, T.; COTTI, E. Comparison of tetraacetylenediamine + sodium perborate and sodium hypochlorite cytotoxicity on L929 fibroblasts. *Journal of Endodontics*, v. 36, n. 9, p. 1516–1520, 2010.

SOUZA, M.A.; DIAS, C.T.; ZANDONÁ, J.; HOFFMANN, I.P.; MENCHIK, V.H.S.; PALHANO, H.S.; BERTOL, C.D.; ROSSATO-GRANDO, L.G.; CECCHIN, D.; FIGUEIREDO, J.A.P. Antimicrobial activity of hypochlorite solutions and reciprocating instrumentation associated with photodynamic therapy on root canals infected with Enterococcus faecalis – An in vitro study. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 23, p. 347–352, 2018.

SUNDQVIST, G; FIGDOR, D; PERSSON, S; SJÖGREN, U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*, v.85, n.1, p. 86–93, 1998.

TEIXEIRA, P.A.; COELHO, M.S.; KATO, A.S.; FONTANA, C.E.; PEDRO-ROCHA, D.G.; Citotoxicity assessment of 1% peracetic acid, 2,5% sodium hypochlorite and 17% EDTA on FG11 and FG15 human fibroblastos. *Acta Odontol Latinoam*. v.31, n.1, p 11-15, 2018.

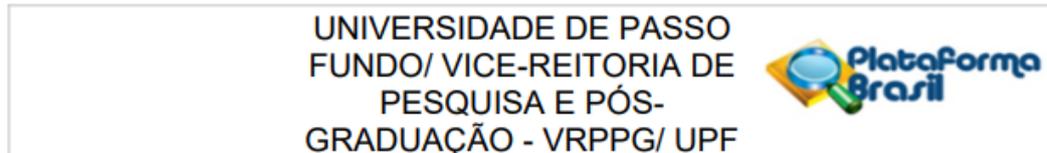
VOUZARA, T.; KOULAOUZIDOU, E.; ZIOUTI, F.; ECONOMIDES, N. Combined and independent cytotoxicity of sodium hypochlorite, ethylenediaminetetraacetic acid and chlorhexidine. *International Endodontic Journal*, v. 49, n. 8, p. 764–773, 2016.

WANG, L.; BASSIRI, M.; NAJAFI, R.; NAJAFI, K.; YANG, J.; KHOSROVI, B.; HWONG, W.; BARATI, E.; BELISLE, B.; CELERI, C., ROBSON, MC. Hypochlorous Acid as a Potential Wound Care Agent Part I . Stabilized Hypochlorous Acid : A Component of the Inorganic Armamentarium of Innate Immunity. *Journal of Burns and Wounds*, v. 6, p. 65–79, 2007.

WINTERBOURN, C. C; KETTLE, A. J; HAMPTON, M. B. Reactive Oxygen Species and Neutrophil Function. *Annual review of biochemistry*, v. 85, p. 765–792, 2016.

9. ANEXOS

ANEXO 1: Parecer nº 5.783.928 de aprovação do Comitê de Ética para autorização de realização do estudo.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: USO DO ÁCIDO HIPOCLOROSO PRODUZIDO POR DISPOSITIVO ELETROLÍTICO NA ENDODONTIA E SUAS PROPRIEDADES

Pesquisador: MYLENA LAZARETI ZANELLA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 63825622.2.0000.5342

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.783.928

Apresentação do Projeto:

Os microrganismos desempenham um papel fundamental na indução e, principalmente, na perpetuação das alterações patológicas que acometem a polpa e os tecidos periapicais. Portanto, é necessário o uso de substâncias químicas e recursos auxiliares visando contribuir no processo de descontaminação do sistema de canais radiculares. Deve-se buscar alternativas que promovam uma adequada neutralização de microrganismos do sistema de canais radiculares, ao mesmo tempo em que alterações estruturais da dentina não sejam promovidas, e crie condições favoráveis para um tratamento endodôntico de qualidade.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo do estudo é avaliar, in vitro, a ação antimicrobiana e a citotoxicidade do ácido hipocloroso em canais radiculares infectados contra *Enterococcus faecalis*.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo os pesquisadores, os riscos são mínimos, pois os dentes serão obtidos em um biobanco e as células utilizadas para o ensaio de viabilidade celular são armazenadas e obtidas em laboratório. Como benefício, citam alternativa para tratamento endodôntico.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um estudo experimental laboratorial para avaliar a ação antimicrobiana e a citotoxicidade do ácido hipocloroso em canais radiculares infectados com *Enterococcus faecalis*.

Endereço: BR 285- Km 292 Campus I - 4º andar Centro Administrativo
Bairro: São José CEP: 99.052-900
UF: RS Município: PASSO FUNDO
Telefone: (54)3316-8157 E-mail: cep@upf.br

UNIVERSIDADE DE PASSO
FUNDO/ VICE-REITORIA DE
PESQUISA E PÓS-
GRADUAÇÃO - VRPPG/ UPF



Continuação do Parecer: 5.783.928

Para o teste de ação antimicrobiana, cinquenta dentes unirradiculares humanos extraídos serão inoculados, por 14 dias, com 100 l de cultura de *Enterococcus faecalis*. Em seguida, as amostras serão divididas aleatoriamente em 5 grupos (n=10) de acordo com o protocolo de desinfecção avaliado. A contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) será realizada para avaliar a eficácia dos tratamentos propostos. O teste de citotoxicidade será realizado por meio do ensaio MTT. Após preparo do meio de cultura celular, 100 uL dos grupos de tratamento serão adicionados individualmente aos poços contendo o meio, sendo incubados por 3 minutos. Todos os experimentos serão realizados em triplicata e as porcentagens de viabilidade celular serão calculadas em relação aos controles celulares.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O protocolo de pesquisa foi apresentado de maneira completa e adequada. Os compromissos do pesquisador e das instituições foram apresentados. O protocolo foi considerado claro em seus aspectos científicos e metodológicos.

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, do Conselho Nacional da Saúde, Ministério da Saúde, Brasil, manifesta-se pela aprovação do protocolo 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_BÁSICAS_DO_PROJETO_2003868.pdf	22/11/2022 12:51:56		Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Biobanco.pdf	14/09/2022 14:06:07	MYLENA LAZARETI ZANELLA	Aceito
Declaração de	Declaracao_de_infraestrutura.pdf	13/09/2022	MYLENA LAZARETI	Aceito

Endereço: BR 285- Km 292 Campus I - 4º andar Centro Administrativo

Bairro: São José **CEP:** 99.052-900

UF: RS **Município:** PASSO FUNDO

Telefone: (54)3316-8157

E-mail: cep@upf.br

UNIVERSIDADE DE PASSO
FUNDO/ VICE-REITORIA DE
PESQUISA E PÓS-
GRADUAÇÃO - VRPPG/ UPF



Continuação do Parecer: 5.783.928

Instituição e Infraestrutura	Declaracao_de_infraestrutura.pdf	11:48:49	ZANELLA	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	13/09/2022 11:48:36	MYLENA LAZARETI ZANELLA	Aceito
Orçamento	orcamento.docx	13/09/2022 11:31:56	MYLENA LAZARETI ZANELLA	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.docx	13/09/2022 11:28:34	MYLENA LAZARETI ZANELLA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_pesquisa_nao_iniciada.pdf	13/09/2022 11:25:49	MYLENA LAZARETI ZANELLA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Ausencia_tcle.pdf	13/09/2022 11:25:34	MYLENA LAZARETI ZANELLA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_detalhado.docx	13/09/2022 11:25:21	MYLENA LAZARETI ZANELLA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PASSO FUNDO, 29 de Novembro de 2022

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

Endereço: BR 285- Km 292 Campus I - 4º andar Centro Administrativo
Bairro: São José **CEP:** 99.052-900
UF: RS **Município:** PASSO FUNDO
Telefone: (54)3316-8157 **E-mail:** cep@upf.br