

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO

Mylena Lazareti Zanella

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIMICROBIANA E TOXICIDADE DO
ÁCIDO HIPOCLOROSO OBTIDO A PARTIR DE DISPOSITIVO
ELETROLÍTICO EM CANAIS RADICULARES INFECTADOS COM
*Enterococcus faecalis***

Passo Fundo

2023

Mylena Lazareti Zanella

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIMICROBIANA E TOXICIDADE DO
ÁCIDO HIPOCLOROSO OBTIDO A PARTIR DE DISPOSITIVO
ELETROLÍTICO EM CANAIS RADICULARES INFECTADOS COM
*Enterococcus faecalis***

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

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a Deus pela vida e a oportunidade de viver momentos tão especiais como este.

Aos meus pais, Rubens e Rosemeri, por todo o suporte que me deram durante esse período, por terem acreditado em mim e por sempre me estimularem a realizar todos os meus sonhos. Obrigada por tudo e por terem feito a base de quem eu sou hoje. A minha irmã, Heloisa, por ser minha companheira em todos os momentos, por estar ao meu lado sempre me ajudando e acompanhando. Amo muito vocês.

À minha família e amigos que sempre entenderam minha ausência e também me estimularam a seguir nesse caminho, sempre com palavras de incentivo e muito carinho.

Aos meus professores, por partilharem não apenas seu conhecimento teórico e prático, mas experiências pessoais, conselhos amigos e aprendizados de vida que levarei para sempre comigo.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Matheus Albino Souza, por confiar a mim a execução deste trabalho. Agradeço pela paciência, profissionalismo, sabedoria, organização e todo suporte que forneceu durante a pesquisa. Foi uma parceria muito especial que começou há 5 anos atrás na disciplina de endodontia e que me ensinou muito sobre trabalho em equipe. Obrigada professor pelo exemplo de ser quem você é. Foi uma honra imensa ser tua orientada.

Aos professores Huriel, Charise e Vanessa, por toda a contribuição de seus conhecimentos durante a realização desse estudo, além da disponibilidade para a realização do mesmo.

À minha colega e amiga tão especial, Gabriele, que está na minha vida desde o início dessa caminhada e permanecerá para sempre. Obrigada amiga por ter dividido tudo isso comigo, por termos nos desafiado e finalmente conseguido. Com certeza tudo foi mais leve contigo ao meu lado, não poderia ter tido uma dupla melhor, te amo muito.

Aos meus queridos coorientados, Camila, Eduarda, Felipe e Nathan, por toda a disponibilidade, vontade de aprender, parceria e paciência durante esses dois anos de pesquisa. Vocês foram essenciais e se tornaram amigos, é muito bom saber que posso contar com vocês.

Aos meus colegas de turma, Alencar, Andrew, Ângela, Clarissa, Indiarai, Herica, Natália, Paulo, Sara, Renan, Thaís e Ulysses, que compuseram a melhor turma de mestrado que um dia imaginei que teria. Obrigada pela parceria, troca de conhecimento e amizade. Foi um prazer imenso conhecer e dividir os últimos dois anos com cada um de vocês.

À Faculdade de Odontologia da Universidade de Passo Fundo, por ser a minha segunda casa. 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.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Divisão dos grupos experimentais de acordo com as substâncias testadas.....	31
Tabela 2 – Média e desvio padrão (\pm) da redução bacteriana e viabilidade celular após os tratamentos.....	36

LISTA DE FIGURAS

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

LISTA DE ABREVIATURAS

°C – Graus Celsius

% – Porcentagem

– Diâmetro

µm – Micrômetro

BHI – Caldo de infusão cérebro-corção

Ca(OCl)² – Hipoclorito de cálcio

CHX – Clorexidina

DW – Água destilada

E. faecalis – *Enterococcus faecalis*

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

h – Hora

HOCl – Ácido hipocloroso

min – Minuto

mL – Mililitro

mm – Milímetro

MTT – metiltiazolil tetrazólio

N – Newton

NaOCl – Hipoclorito de sódio

nm – Nanômetro

PUI – Irrigação ultrassônica passiva

rpm – Rotações por minuto

S1 – Primeira coleta

S2 – Segunda coleta

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	5
LISTA DE TABELAS	6
LISTA DE FIGURAS.....	7
LISTA DE ABREVIATURAS	8
RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	11
1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
3. PROPOSIÇÃO.....	26
4. MATERIAIS E MÉTODOS	27
5. RESULTADOS.....	36
6. DISCUSSÃO	37
7. CONCLUSÕES	40
8. REFERÊNCIAS.....	41
9. ANEXOS	46

RESUMO

OBJETIVO: Avaliar, *in vitro*, a ação antimicrobiana e a citotoxicidade do ácido hipocloroso em canais radiculares infectados com *Enterococcus faecalis*.

MATERIAIS E MÉTODOS: Para o teste de ação antimicrobiana, cinquenta dentes unirradiculares humanos extraídos foram inoculados, por 14 dias com *Enterococcus faecalis*. As amostras foram divididas aleatoriamente em 5 grupos (n=10) de acordo com o protocolo testado: G1 – água deionizada (controle); G2 – hipoclorito de sódio 2,5% (NaOCl 2,5%); G3 – clorexidina 2% (CHX 2%); G4 – ácido hipocloroso (250ppm); G5 – ácido hipocloroso (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 de brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio (MTT). Após o 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. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e as porcentagens de viabilidade celular calculadas em relação aos controles celulares. O percentual de redução bacteriana e a citotoxicidade foram analisados pelo teste de one-way ANOVA seguido por post-hoc de Tukey ($\alpha=0,05$).

RESULTADOS: Todas 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 e G3 foram semelhantes entre si e os grupos G4 e G5 se mostraram menos citotóxicos ($p<0,05$).

CONCLUSÃO: O ácido hipocloroso foi tão efetivo quanto o hipoclorito de sódio e clorexidina na redução de *E. faecalis* e possui menos citotoxicidade.

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

ABSTRACT¹

OBJECTIVE: To evaluate, *in vitro*, the antimicrobial action and cytotoxicity of hypochlorous acid in root canals infected with *Enterococcus faecalis*.

MATERIALS AND METHODS: For the antimicrobial action test, fifty extracted human single-rooted teeth were inoculated for 14 days with *Enterococcus faecalis* culture. Samples were randomly divided into 5 groups (n=10) according to the tested protocol: G1 – deionized water (control); G2 – 2.5% sodium hypochlorite (2.5% NaOCl); G3 – 2% chlorhexidine (2% CHX); G4 – hypochlorous acid (250ppm); G5 – hypochlorous acid (500ppm). Colony forming units (CFU) counts were performed to assess the effectiveness of the proposed treatments. Cytotoxicity testing was performed using the 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay. After preparing the cell culture medium, 100 uL of the same treatment groups already mentioned were added individually to the wells containing the medium, being incubated for a period of 3 minutes. All experiments were performed in triplicate and cell viability percentages calculated in relation to cell controls. The percentage of bacterial reduction and cytotoxicity were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test ($\alpha=0.05$).

RESULTS: All substances tested were effective in reducing bacteria, 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, with groups G2 and G3 being similar to each other and groups G4 and G5 being less cytotoxic ($p<0.05$).

CONCLUSION: Hypochlorous acid was as effective as sodium hypochlorite and chlorhexidine in reducing *E. faecalis* and has less cytotoxicity.

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

¹ EVALUATION OF THE ANTIMICROBIAL ACTION AND TOXICITY OF HYPOCHLOROUS ACID OBTAINED FROM AN ELECTROLYTIC DEVICE IN ROOT CANALS INFECTED WITH *Enterococcus faecalis*

1. INTRODUÇÃO

Os microrganismos desempenham um papel fundamental na indução e, principalmente, na perpetuação das alterações patológicas que acometem a polpa e os tecidos periapicais (KAKEHASHI *et al.*, 1965). Dentre os microrganismos encontrados na microbiota endodôntica, se destaca o *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*), um microrganismo anaeróbio facultativo, altamente resistente ao preparo químico-mecânico convencional e usualmente encontrado nos casos de insucesso do tratamento endodôntico (PINHEIRO *et al.*, 2003). Portanto, é necessário o uso de substâncias químicas e recursos auxiliares visando contribuir no processo de descontaminação do sistema de canais radiculares.

O hipoclorito de sódio (NaOCl) é uma substância química auxiliar, conhecida pela sua atividade antimicrobiana (DU *et al.*, 2014) e capacidade de promover a dissolução da matéria orgânica (OKINO *et al.*, 2004). No entanto, é uma solução citotóxica quando utilizada em elevadas concentrações (MARINS *et al.*, 2012), instável quimicamente (LEONARDO *et al.*, 2016) e interfere negativamente na adesão do material restaurador à dentina (FARINA *et al.*, 2011). Ao mesmo tempo, 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 *et al.*, 2014; PATIL & UPPIN, 2011), o que pode trazer como consequência uma redução da resistência à fratura do elemento dentário após a realização do tratamento endodôntico.

Perante as limitações expostas presentes nas soluções de NaOCl, novas substâncias têm sido pesquisadas para serem utilizadas na endodontia, no intuito de promover 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. A clorexidina (CHX) é uma substância utilizada para o tratamento endodôntico pois, apresenta potencial antimicrobiano, sendo efetiva contra patógenos resistentes presentes na microbiota endodôntica (STOJICIC *et al.*, 2012) e alta substantividade (BASRANI *et al.*, 2002). O hipoclorito de cálcio (Ca[OCI]2), é outra substância alternativa, já pesquisada para seu uso na endodontia, que apresenta ação antimicrobiana (DE ALMEIDA *et al.*, 2014; SOUZA *et al.*, 2020), potencial de dissolução de tecido orgânico (DUTTA & SAUNDERS, 2012) e baixa citotoxicidade (BLATTES *et al.*, 2017).

O ácido hipocloroso (HOCl) é uma substância endógena de todos os mamíferos e é 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). Não é uma substância irritante e não sensibiliza células devido à sua baixa citotoxicidade quando comparado com NaOCl (WANG *et al.*, 2007).

Recentemente seu uso na odontologia passou a ser pesquisado pois o HOCl é responsável pela ação desinfetante de soluções de cloro (FAIR *et al.*, 1948), possui estabilidade química ao armazenamento se manuseado de maneira adequada, sendo um irrigante antibacteriano durável no uso clínico diário (CHEN *et al.*, 2016). Além disso, se mostrou eficaz para limpar superfícies de implantes contaminadas por biofilme e tem potencial de ser um antisséptico para o tratamento de periimplantite (CHEN *et al.*, 2016) e ser utilizado para o tratamento da periodontite (MAINNEMARE *et al.*, 2004).

Em relação à área da endodontia, não existem muitos estudos relacionados ao uso do ácido hipocloroso. No entanto, foi demonstrado que o HOCl pode ser utilizado como uma solução de irrigação endodôntica (ROSSI-FEDELE *et al.*, 2011). Neste trabalho, este ácido é obtido através de um dispositivo eletrolítico (Dentaqua®), que

transforma uma substância chamada de “brine”, composta por água deionizada, cloreto de sódio e ácido hidrolórico, em ácido hipocloroso. Porém ainda não existem estudos sobre o uso deste equipamento na odontologia.

Cada vez mais busca-se novas alternativas na endodontia de substâncias químicas e recursos auxiliares, que promovam uma adequada descontaminação do sistema de canais radiculares, porém, sem promover alterações estruturais significantes na dentina. Diante dos bons resultados do ácido hipocloroso, o presente estudo buscou elucidar o real potencial desta solução para uso como substância química auxiliar na endodontia, através da sua ação antimicrobiana e seu potencial citotóxico.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Hipoclorito de sódio e ação antimicrobiana

TYAGI *et al.*, em 2013, explorou irrigantes fitoterápicos mais novos, que são agentes antimicrobianos potenciais na inibição de *Candida albicans* em comparação ao hipoclorito de sódio. Foram utilizados 25 pré-molares inferiores humanos extraídos preparados e seccionados verticalmente, totalizando 50 amostras. Após, foram colocados em poços de cultura expondo a superfície do canal radicular a *C. albicans* cultivada em Sabouraud Dextrose Agar para formar um biofilme. Após dois dias, as amostras foram divididas aleatoriamente em 5 grupos (n=10): G1 – Própolis; G2 - *Morinda citrifolia*; G3 - *Azadirachta indica* (Neem); G4 - NaOCl a 5%; G5 - Solução salina estéril e irrigadas por 10 min com cada substância. As amostras foram avaliadas quanto ao crescimento de *C. albicans* e número de unidades formadoras de colônias. As leituras foram submetidas à análise estatística por meio de análise de variância e testes post hoc de Tukey. Os grupos hipoclorito de sódio e própolis exibiram maior eficácia antimicrobiana contra *C. albicans* sem diferença estatística significativa entre si. O grupo *A. indica* (Neem) veio logo em seguida. *M. citrifolia* teve ação antifúngica limitada, seguido pelo grupo de controle negativo de solução salina. De acordo com os resultados deste estudo, a própolis pode ser utilizada como um antifúngico eficaz semelhante ao hipoclorito de sódio, embora estudos *in vivo* de longo prazo sejam necessários.

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 *E. 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. Os resultados da porcentagem de células mortas foram comparados usando testes paramétricos após submeter os dados à transformação de Anscombe normalizada. O nível de significância foi $p < 0,05$. 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*.

PLADISAI *et al.*, em 2016, compararam a eficácia de diferentes protocolos de desinfecção na redução de bactérias em um biofilme de *E. faecalis* em dentes com grandes canais radiculares. Foram preparados cinquenta e cinco raízes de pré-molares inferiores humanos com grandes canais de raiz única, que foram infectadas com *E. faecalis* por 21 dias. Quatro raízes foram observadas usando microscopia eletrônica de varredura para verificar a formação de biofilme. Os demais espécimes foram divididos em 5 grupos experimentais e um grupo controle estéril: G1 - instrumentação mecânica com limas #60-90 e NaOCl 2,5% (MI-N); G2 - irrigação com NaOCl 2,5% (IR-N); G3 - irrigação com NaOCl 2,5% com uso do ultrassom (PUI-N); G4 - irrigação com solução salina normal; G5 - nenhuma intervenção (inicial). Após a desinfecção do canal radicular, espécimes de dentina foram coletados para análise

microbiana. As unidades formadoras de colônias médias foram determinadas e comparadas entre os grupos usando análise de variância unilateral. O menor número de bactérias intracanal foi recuperado do G1 seguido pelo G3 e G2. O G4 não apresentou redução significativa em relação ao G5. No entanto, houve diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,01$). As bactérias restantes no G3 foram 4,5 vezes menores em comparação com o G2; no entanto, foi 1862 vezes maior em comparação com o G1. Instrumentação mecânica com limas #60-90 e irrigação com NaOCl 2,5% foi o método mais eficaz para desinfetar grandes canais radiculares. Embora a ativação ultrassônica tenha aumentado a eficácia da irrigação do canal radicular, ela não pode substituir a instrumentação mecânica mesmo em grandes canais radiculares com acesso irrigante ilimitado à porção apical.

BUKHARY & BALTO, em 2017, avaliaram a eficácia antibacteriana do Octenisept/octenidina (OCT), Alexidina a 1% (ALX), e clorexidina a 2% (CHX) contra *Enterococcus faecalis* usando microscopia confocal de varredura a laser. Foram preparados discos de dentina radicular de dentes humanos extraídos, esterilizados e inoculados com *E. faecalis* para estabelecer um modelo de biofilme em 3 semanas. Os discos de dentina infectados foram expostos a OCT (n=20), ALX 1% (n=20) e CHX 2% (n=20) por 10 minutos. Discos de dentina (n=15) expostos a NaOCl 5,25% foram usados como controle positivo, enquanto as amostras expostas a solução salina (n=15) foram usadas como controle negativo. Após a exposição, os discos de dentina foram corados com corante fluorescente e analisados com microscopia confocal de varredura a laser para determinar a proporção de células mortas no biofilme. A análise estatística foi realizada usando os testes U de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney ($p < 0,05$). A maior proporção de células mortas foi encontrada no grupo de NaOCl 5,25% em comparação com os grupos experimentais ($p < 0,05$). Uma proporção significativamente maior de células mortas foi encontrada no grupo OCT em comparação com os grupos ALX 1% e CHX 2% ($p < 0,05$). A proporção de células mortas foi aproximadamente 42,5% nos grupos ALX 1% e CHX 2%, sem diferença estatisticamente significativa entre si ($p > 0,05$). O NaOCl teve atividade antimicrobiana significativamente maior contra biofilmes de *E. faecalis* em comparação com OCT, CHX e ALX. OCT foi mais eficaz do que CHX e ALX.

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 tetraacetililenodiamina associada ao perborato de sódio (TAED + P) em fibroblastos L929 e compararam com a do 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 TAED + 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; TAED + P resultou menos citotóxicidade do que NaOCl em todas as condições experimentais examinadas. Esses dados apóiam o possível uso de TAED + P como irrigante endodôntico. Mais estudos são necessários para analisar sua atividade antibacteriana contra patógenos endodônticos.

BOTTON *et al.*, 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 antagônico 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 para-cloroanilina (PCA) na presença de NaOCl e examinar 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-sulfofenil)-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 Clorexidina e ação antimicrobiana

DU *et al.*, em 2012, avaliaram a atividade antibacteriana *in vitro* por plasmas de não-equilíbrio à pressão atmosférica (APNPs) como uma abordagem eficaz contra biofilmes bacterianos em sistemas de canais radiculares durante a terapia endodôntica. Lamínulas estéreis foram colocadas nas cavidades das placas de cultura de tecidos para permitir a formação de biofilmes de *Enterococcus faecalis*. Os biofilmes foram tratados por 5 minutos com APNPs ou digluconato de clorexidina 2% (CHX). A viabilidade das bactérias do biofilme foi analisada por coloração e microscopia confocal de varredura a laser. Além disso, dentes unirradiculares infectados foram expostos a APNPs ou CHX a 2% por 5, 10 e 15 minutos. Após o tratamento, os canais radiculares foram lavados e as suspensões resultantes foram inoculadas em ágar de infusão cérebro-coração (caldo BHI) para avaliar a sobrevivência bacteriana. Finalmente, a micro-tomografia computadorizada foi usada para observar e verificar os sistemas de canais radiculares em relação aos efeitos antibacterianos obtidos. O tratamento por 5 minutos com APNPs ou 2% CHX matou a maioria das bactérias nos biofilmes de *E. faecalis*. Além disso, o tratamento com APNP foi tão eficaz quanto 2% CHX para inativar bactérias em canais radiculares infectados ($P > 0,05$). A sobrevivência bacteriana após o tratamento com APNPs ou 2% CHX

reduziu notavelmente com o aumento dos tempos de exposição ($P < 0,05$). Não houve diferença significativa entre a sobrevivência bacteriana em sistemas de canais radiculares complexos e canais retos simples ($P > 0,05$). Plasmas de não-equilíbrio à pressão atmosférica (APNPs) podem ser um complemento eficaz para o tratamento antimicrobiano endodôntico padrão.

DE LUCENA *et al.*, em 2013, determinaram a viabilidade de *Enterococcus faecalis* em dentina radicular humana infectada *in vitro* após exposição a medicamentos de canal radicular à base de clorexidina e octenidina. Segmentos de raízes humanas ($n = 40$) foram infectados com *E. faecalis* por 8 semanas. As amostras de dentina radicular (rd) coletadas na semana 4 serviram como valores de linha de base individuais. Na semana 8, os segmentos radiculares foram divididos aleatoriamente em quatro grupos de teste ($n=10$) para a colocação de um dos seguintes medicamentos nos canais radiculares: pasta de hidróxido de cálcio (CH), gel de clorexidina (CHX-gel) (5,0%), pontos de clorexidina/guta-percha (CHX-GP); e gel de octenidina (OCT-gel) (5,0%) seguido de incubação por 4 semanas. O efeito na viabilidade de *E. faecalis* foi avaliado por dois corantes fluorescentes (syto 9/iodeto de propídio) para determinar a 'proporção de bactérias viáveis' (PVB%) e o número de 'unidades formadoras de colônias' (UFC). Os valores médios e os intervalos de confiança de 95% (CI) foram calculados para PVB% e log UFC. Células bacterianas viáveis e mortas foram detectadas em todas as amostras 'rd' nas semanas 4 e 8. O tratamento com CHX-gel, CHX-GP e OCT-gel resultou em valores de PVB% significativamente mais baixos com 15,4%, 3,5% e 0 %, respectivamente. Nenhum crescimento (UFC) foi registrado para essas amostras na semana 12. Quando medicado por CH, o PVB% foi aumentado sem uma mudança correspondente em UFCs. Em contraste com o hidróxido de cálcio, ambos os medicamentos intracanais à base de CHX e octenidina foram eficazes na redução da viabilidade de *E. faecalis*. O OCT mostrou os resultados mais favoráveis e pode ter potencial como medicamento endodôntico.

FERRER-LUQUE *et al.*, em 2014, compararam a atividade antimicrobiana residual de cetrimida 0,2% e clorexidina 0,2% e 2% em canais radiculares infectados com *Enterococcus faecalis*. O *E. faecalis* foi cultivado em raízes unirradulares por 4 semanas. Após o preparo do canal radicular, os canais radiculares foram irrigados com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 17% para remoção da camada de esfregaço. As raízes foram divididas aleatoriamente em três grupos experimentais ($n=26$) de acordo com a solução irrigante final: Grupo I: 5 mL de cetrimida 0,2%; Grupo II: 5 mL de clorexidina 0,2%; e Grupo III: 5 mL de clorexidina a 2%. As amostras foram coletadas por 50 dias para denotar a presença de crescimento bacteriano. A proporção de espécimes não crescidos ao longo de 50 dias foi avaliada usando a análise de sobrevivência não paramétrica de Kaplan-Meier. As diferenças entre os grupos foram testadas usando o teste de log-rank e o nível de significância estatística foi estabelecido em $p < 0,05$. O maior valor de sobrevivência foi encontrado com clorexidina 2%, apresentando diferenças estatisticamente significativas em relação aos outros dois grupos. Aos 50 dias, o crescimento de *E. faecalis* foi detectado em 69,23% das amostras nos Grupos I e II e em 34,61% das amostras do Grupo III. Não houve diferenças significativas entre 0,2% de cetrimida e 0,2% de clorexidina. A irrigação final com clorexidina 2% mostrou maior atividade residual do que clorexidina 0,2% e cetrimida 0,2% em canais radiculares infectados com *E. faecalis*.

CHERIAN *et al.*, em 2016, avaliaram os efeitos antimicrobianos de 2% de clorexidina (CHX) versus 0,1% de dicloridrato de octenidina (OCT) como irrigante de canal radicular com e sem irrigação ultrassônica passiva contra *Enterococcus faecalis in vitro* e a profundidade de penetração de solução irrigante nos túbulos dentinários na junção do terço médio e apical. Quarenta e oito pré-molares inferiores humanos de raiz única recém-extraídos foram removidas as coroas e o espécime da raiz padronizado para 14 mm. O biofilme de *E. faecalis* foi cultivado por sete dias e os espécimes foram divididos em quatro grupos ($n = 12$) com base no protocolo de irrigação: Grupo I- Irrigação por Seringa Convencional (CSI) com 2% de CHX, Grupo II- CSI + 0,1% OCT, Grupo III-Irrigação Ultrassônica

Passiva (PUI) + 2% CHX e Grupo IV- PUI + 0,1% OCT. Lascas de dentina foram coletadas em duas profundidades (200µm e 400µm) e determinado o número total de unidades formadoras de colônias. Os dados foram analisados estatisticamente usando ANOVA, comparação múltipla de médias de Scheffes e teste t pareado ($p < 0,05$). Os grupos III e IV (PUI) apresentaram diferença significativa em relação aos grupos I e II (CSI) tanto a 200µm quanto a 400µm ($p = 0,000$). Para o Grupo III e Grupo IV não foram encontradas diferenças significativas em 200µm e 400µm ($p = 1,000$ e $0,363$ respectivamente), porém diferença significativa foi encontrada entre os dados em 200µm e 400µm para todos os quatro grupos ($p = 0,000$). Octenidina (0,1%) foi mais eficaz do que Clorexidina 2% contra *E. faecalis* a 200µm e 400µm. A irrigação ultrassônica passiva demonstrou potencializar a ação antimicrobiana dos irrigantes.

ABDELMONEM *et al.*, em 2019, pesquisaram uma forma de melhorar a capacidade de penetração, limpeza e efeito antibacteriano do Cloridato de Clorexidina (Chx.HCl) usando uma nanoemulsão de Chx.HCl recém-formulada como um irrigante para o canal radicular. Foi estudada a solubilidade de Chx.HCl em diferentes meios (ácido oleico, Labrafil M 1944CS, Tween 20, Tween 80, propilenoglicol e água). Diagramas de fase pseudoternários foram construídos para designar os sistemas ideais. As fórmulas de nanoemulsão preparadas foram avaliadas quanto ao conteúdo de fármaco, tempo de emulsificação, dispersibilidade, tamanho de gota, liberação de fármaco *in vitro*, estabilidade termodinâmica, atividade antibacteriana *in vitro* e estudo *ex vivo* para a fórmula selecionada. As comparações foram feitas da nanoemulsão Chx.HCl com duas concentrações diferentes de 0,75% e 1,6% e com Chx.HCl de tamanho de partícula normal, como irrigante do canal radicular quanto à sua capacidade de penetração, efeito de limpeza e efeito antibacteriano. A fórmula selecionada foi F6 com composição de 2% de Labrafil, 12% de Tween 80 e 6% de propilenoglicol. Possui tamanho de partícula pequeno (12,18 nm), tempo de emulsificação curto (1,67 segundos) e taxa de dissolução rápida após 2 minutos. Ele foi considerado um sistema termodinamicamente e fisicamente estável. A maior concentração de nanoemulsão de Chx.HCl 1.6% mostra a melhor capacidade de penetração em comparação com o tamanho normal de partícula Chx.HCl devido ao menor tamanho de partícula. A preparação de nanoemulsão Chx.HCl tem melhor capacidade de limpeza e efeito antibacteriano com alta eficácia em *Enterococcus faecalis*, onde foi alcançada uma alta taxa de redução ou erradicação completa das células bacterianas.

2.4 Clorexidina e toxicidade

TREVINO *et al.*, em 2011, testaram a hipótese de que diferentes protocolos de irrigação do canal radicular alteram a sobrevivência das células-tronco da papila apical (SCAP). Foram isoladas as SCAP de terceiros molares humanos imaturos, e uma subpopulação de células expressando STRO-1 foi selecionada e expandida *in vitro*. Segmentos de raiz humana padronizados ($n = 5$) foram irrigadas com um dos protocolos testados: G1 – EDTA 17%; G2 - NaOCl 6% + EDTA 17% + NaOCl 6%; G3 - EDTA 17% + CHX 2%; G4 - NaOCl 6% + EDTA 17% + NaOCl 6% + álcool isopropílico + CHX 2%. Posteriormente, SCAP enriquecido com STRO-1 foram misturados com plasma rico em plaquetas, semeados nas pontas das raízes e cultivados por 21 dias. As raízes foram então descalcificadas, processadas para imunohistoquímica e coradas para vimentina e TO-PRO-3. A proporção de células viáveis (positivas para vimentina) foi calculada com base na contagem total de células (TO-PRO-3) para cada grupo. A irrigação com EDTA 17% melhor suportou a sobrevivência celular, seguida de irrigação com NaOCl 6% + EDTA 17% + NaOCl 6%. Por outro lado, os protocolos que incluíam CHX 2% não tinham células viáveis. Os irrigantes por si só afetam muito a sobrevivência do SCAP enriquecido com STRO-1 no ambiente do canal radicular e que a inclusão de EDTA em protocolos de irrigação pode ser benéfica em procedimentos regenerativos.

CHEN *et al.*, em 2016, investigaram a citotoxicidade do plasma sem equilíbrio modificado com digluconato de clorexidina (CHX) em fibroblastos gengivais humanos (HGFs) e avaliaram a biossegurança do plasma sem equilíbrio modificado com 2% de CHX como um novo método de canal radicular tratamento. Amostras de tecido retiradas de gengiva humana foram principalmente cultivadas e passadas. Células das passagens 3-7 foram usadas. Os HGFs foram tratados por plasma de não equilíbrio modificado com 2% de CHX por 0 min (grupo de controle), 30 s, 1 min, 1,5 min, 3 min, 5 min e 10 min, respectivamente, e então foram incubados por 0, 24, e 48 h. Em seguida, o ensaio do kit-8 de contagem de células (CCK-8) foi aplicado para analisar a citotoxicidade do plasma de não-equilíbrio modificado com 2% de CHX em HGFs. Não houve diferença significativa entre o grupo 0 h tratado com o plasma de não-equilíbrio modificado por 1 min e o grupo controle ($P > 0,05$). No entanto, houve diferenças significativas entre todos os outros grupos tratados e o grupo controle ($P < 0,05$). Quando tratado por 1,5 min ou menos, a viabilidade celular foi obviamente aumentada; enquanto tratado por 3 minutos ou mais, foi obviamente reduzido. Além disso, quando cultivadas sucessivamente por 0, 24 e 48 h, a viabilidade celular diminuiu no início e, em seguida, aumentou nos grupos tratados com 3 min e tratados com 5 min. O plasma de não equilíbrio modificado com 2% de CHX não teve influência na viabilidade celular em 1,5 min de tratamento, e pode ser usado com segurança no tratamento de canal radicular.

VERMA *et al.*, em 2019, avaliaram a influência da clorexidina (CHX), controle de veículo de Nim (NVC) e extrato de Nim (NE) em cultura de fibroblastos gengivais humanos (hGFs) usando 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2, Ensaio de brometo de 5-difeniltetrazólio (MTT) e análise de classificação de células ativadas por fluorescência (FACS). Os fibroblastos foram derivados de espécimes de biópsia gengival saudáveis colhidos assepticamente. Os efeitos de CHX, NVC e NE foram avaliados em hGFs cultivados por meio de FACS e ensaio de MTT. O ensaio de MTT com hGFs indicou morfologia alterada com morte celular máxima em 10% CHX, enquanto NVC e NE mostraram resultados semelhantes em uma concentração de 75% e acima. Na análise FACS, além de 1%, CHX afetou adversamente a distribuição da fase do ciclo celular, enquanto NE exerceu um efeito prejudicial apenas a 100%. Além disso, tanto com NVC quanto com células NE foram bem diferenciadas em todas as três fases do ciclo celular, com distinção sendo perdida em 50% para finalmente causar morte celular em 100%. A CHX além da concentração de 1% exibiu um efeito tóxico sobre hGFs em 1, 5 e 15 minutos de exposição. No entanto, NE não afetou adversamente os fibroblastos, mesmo na concentração de 50%, mostrando um efeito menos tóxico em comparação com CHX nessas células. A qualidade citoprotetora e amigável oral de NE enfatiza a superioridade de NE sobre CHX.

WIDBILLER *et al.*, em 2019, testaram a hipótese que a clorexidina (CHX) tem um efeito direto quando aplicada às células-tronco da papila apical (SCAPs) e um efeito indireto quando as SCAPs são expostas à dentina previamente condicionada com CHX. A toxicidade celular foi avaliada *in vitro* usando o ensaio de fluorescência verde CellTox e CellTiter-Glo após SCAPs serem expostos diretamente a uma faixa dinâmica de concentração de CHX; culturas de explantes de papila apical foram coradas com ApopTag após cultura com CHX. Além disso, placas padronizadas de dentina humana foram tratadas com CHX e consecutivamente enxaguadas em EDTA, L- α -lecitina ou L- α -lecitina seguida por EDTA. Em seguida, os SCAPs foram cultivados nas lajes por 5 dias, e a viabilidade celular foi determinada (efeito indireto). Os dados foram tratados de forma não paramétrica e analisados usando o teste de Kruskal-Wallis ($P \leq 0,05$). A exposição direta de SCAPs a CHX afetou altamente a viabilidade celular em concentrações acima de 10-3%, enquanto concentrações mais baixas não tiveram efeito adverso. Durante os 60 minutos iniciais, as concentrações de CHX de 10-2% ou mais resultaram em toxicidade precoce pronunciada com um efeito máximo dentro de 15 minutos após a exposição. Da mesma forma, placas de dentina condicionadas com CHX foram prejudiciais para a sobrevivência de SCAP; no entanto, os efeitos deletérios foram completamente revertidos

pela neutralização com L- α -lecitina. A clorexidina é tóxica para SCAPs quando aplicada direta ou indiretamente via dentina condicionada. Se aplicado por um curto período de tempo e neutralizado por L- α -lecitina, pode ser um desinfetante suave e preservador de células antes da regeneração endodôntica.

2.5 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 unirradiculares 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. oxytoca*. 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 *et al.*, 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 antisséptico 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.

REYNOLDS *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 usadas 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.

2.6 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 os seguintes microrganismos: *Aspergillus fumigatus*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Rhizopus oryzae*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina, *Streptococcus pneumoniae*. 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 *et al.*, em 2011 investigaram os efeitos sistêmicos e gastrointestinais da ingestão de água funcional eletrolisada com ácido hipocloroso, 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, avaliaram 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.

BALL *et al.*, em 2021, avaliaram a segurança da solução de ácido hipocloroso para lavagem intracavitária comparada com solução salina em um modelo de rato de 3 procedimentos cirúrgicos – laminectomia, toracotomia e laparotomia. O espaço intracavitário foi lavado com soro fisiológico ou ácido hipocloroso. Os procedimentos também foram concluídos usando a solução de Dakin (hipoclorito de sódio) para comparação, dada a sua citotoxicidade conhecida. No 5º dia de pós-operatório, foram realizadas necropsias de todos os animais e obtidos órgãos relevantes e amostras de sangue. A histologia (coloração de hematoxilina e eosina) foi usada para examinar biópsias dos órgãos coletados em busca de sinais de inflamação, integridade dos vasos sanguíneos e necrose. A coloração imuno-histoquímica para caspase-3 foi utilizada para identificar células apoptóticas. Não houve diferenças nos desfechos (sobrevivência, dor e tempo de recuperação) ou histologia entre os animais lavados com ácido hipocloroso e soro fisiológico. A arquitetura organo-específica intacta foi observada em ambos os grupos. Em comparação, os ratos tratados com a solução de Dakin demonstraram fibrose capsular e hemorragia significativas. Além disso, observou-se apoptose significativa no mesentério intestinal do grupo tratado com a solução de Dakin quando corado para caspase-3. Então, foi concluído que o ácido hipocloroso é seguro para a lavagem das cavidades intraperitoneal, intratecal e intratorácica.

3. PROPOSIÇÃO

3.1 Este estudo teve como objetivos gerais:

3.1.1 Avaliar, *in vitro*, a ação antimicrobiana e a citotoxicidade do ácido hipocloroso produzido a partir de um dispositivo eletrolítico (Dentaqua) em canais radiculares infectados contra *Enterococcus faecalis*.

3.2 Este estudo teve como objetivos específicos:

3.2.1 Avaliar, *in vitro*, a influência do ácido hipocloroso obtido a partir de dispositivo eletrolítico (Dentaqua), na desinfecção de um modelo de canais radiculares infectados com *Enterococcus faecalis*, por meio da contagem de unidades formadoras de colônias.

3.2.2 Avaliar, *in vitro*, a citotoxicidade do ácido hipocloroso obtido a partir de dispositivo eletrolítico (Dentaqua), por meio de ensaio MTT com células fibroblastos.

3.3 As hipóteses testadas foram:

3.3.1 O ácido hipocloroso obtido a partir de dispositivo eletrolítico promove maior desinfecção de canais radiculares infectados com *Enterococcus faecalis*, quando comparado à clorexidina e o hipoclorito de sódio.

3.3.2 O ácido hipocloroso obtido a partir de dispositivo eletrolítico apresenta menos citotoxicidade no ensaio MTT com células fibroblastos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pela comissão de Ética em Pesquisa da Universidade de Passo Fundo, sob o número de protocolo 5.783.928 (anexo 1, p. 46).

4.1 Dentaqua

O equipamento eletrolítico Dentaqua® (figura 1) foi utilizado para a produção do ácido hipocloroso. Através de uma solução salina manipulada com água, o equipamento faz a transformação em ácido hipocloroso 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 eletrolítico Dentaqua®

Primeiramente foi realizada a produção do ácido hipocloroso na concentração de 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 para iniciar primeiramente um ciclo de limpeza do dispositivo. 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 (250 ppm) foi inserida em um frasco Becker para saber a quantidade exata da produção em ml. Após foi transferida para um frasco devidamente identificado (solução 250 ppm) 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 250 ppm 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 500 ppm.

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 250ppm 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

Cinquenta dentes unirradiculares humanos extraídos (figura 2) obtidos através do Biobanco da Faculdade de Odontologia da Universidade de Passo Fundo foram utilizados para o presente estudo.



Figura 2: Seleção de 50 dentes humanos extraídos

A porção coronária foi seccionada na junção amelocementária (figura 3), de forma que o remanescente radicular apresentasse um comprimento de 15 mm (figura 4). 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.

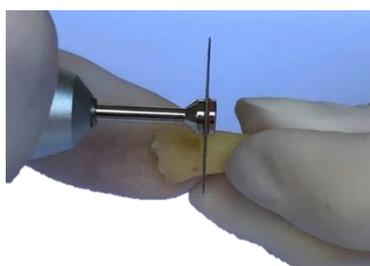


Figura 3: Secção na junção amelocementária

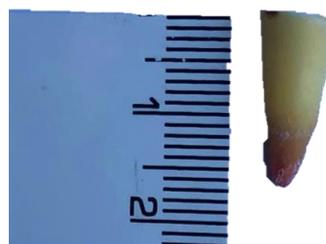


Figura 4: Padronização em 15mm.

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 foi reduzido 1 mm, estabelecendo o comprimento de trabalho. O preparo cervical (figura 5A) foi realizado com broca Largo nº 3 (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Suíça) e a ampliação apical foi realizada com o sistema rotatório ProTaper (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça), seguindo a sequência de limas S1, S2, F1, F2 e F3 (figura 5B). 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 5C, 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 5: 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, foi realizado o vedamento do forame apical com resina fotopolimerizável Opallis (figura 6A, FGM, Joinville, SC, Brasil), para evitar o extravasamento das substâncias testadas durante o experimento. A impermeabilização externa das raízes também foi feita através de duas aplicações de adesivo a base de cianoacrilato (figura 6B, 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 6C).

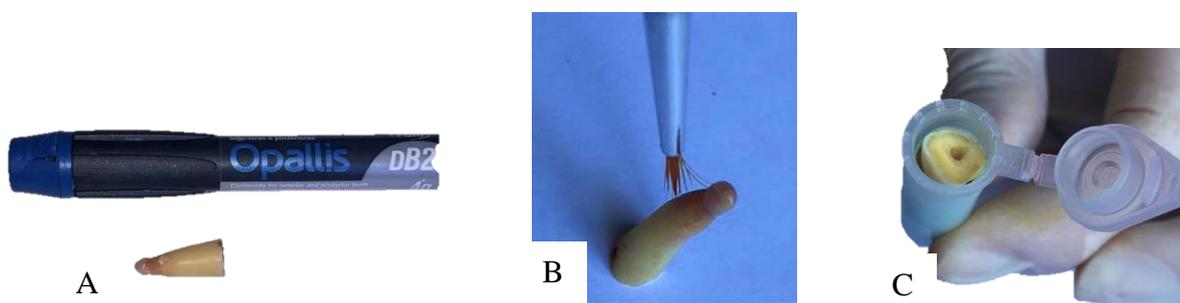


Figura 6: A- Vedamento apical com resina fotopolimerizável. B- Impermeabilização das raízes com cianoacrilato. C- Amostras fixadas em microtubos plásticos

As amostras foram alocadas em caixas de polipropileno (figura 7, Heathrow Scientific, Vernon Hills, IL, Estados Unidos) e esterilizadas à temperatura de 120 °C em autoclave (Dabi Atlante, Ribeirão Preto, SP, Brasil), por um período de 30 minutos.



Figura 7: 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 8A, Decloquimis, São Paulo, SP, Brasil), e, após 5 minutos, um cone de papel estéril com calibre #45 (Tanari, Manaus, AM, Brasil) foi colocado em contato com as paredes do canal durante 30 segundos (figura 8B). 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 8C) 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 μ L (figura 8D). A placa era incubada a 37°C durante 48h, a fim de verificar o crescimento bacteriano.

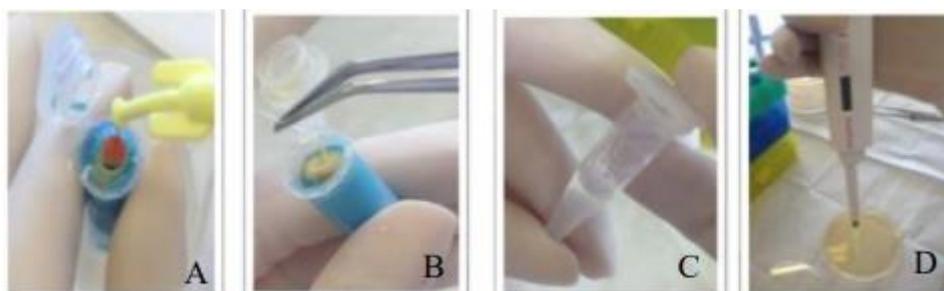


Figura 8: A- Dente selecionado aleatoriamente preenchido com solução salina estéril. B- Cone de papel estéril em contato com o canal. C- Homogeneização da solução. D- Semeadura em placa de petri.

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 μ L do inóculo de *Enterococcus faecalis* contido no tubo de ensaio foi inserida no interior dos canais radiculares (figura 9A) 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 9B).

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 9C). 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 μ L em

placas de Petri contendo PCA (figura 9D). A placa era incubada a 37°C durante 48h e, em seguida, realizada análise da morfologia das unidades formadoras de colônias (UFCs), bem como análise de coloração de Gram, a fim de verificar a confirmação de contaminação somente por *Enterococcus faecalis* (figura 8E).

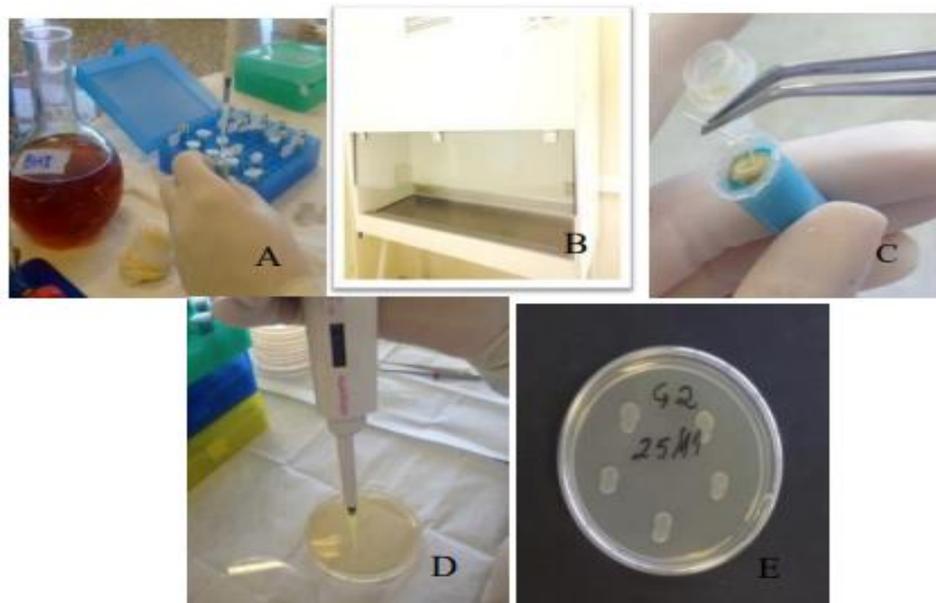


Figura 9: A – Contaminação dos canais radiculares, B - Câmara de fluxo laminar, C – Cone de papel em contato com as paredes do canal, D – Cone de papel em 1ml de solução salina estéril, D – Técnica de gotas, E – Análise da morfologia.

4.2.5. Avaliação de descontaminação dos protocolos testados

Após o período de 14 dias de contaminação com *Enterococcus faecalis*, as cinquenta amostras foram divididas em cinco grupos (n=10), de acordo com os protocolos de descontaminação utilizados (tabela 1), como segue: DW – água deionizada, como sendo o grupo controle; NaOCl 2,5% – hipoclorito de sódio 2,5%; CHX 2% – clorexidina 2%; HOCl 250ppm – ácido hipocloroso 250ppm; HOCl 500ppm – ácido hipocloroso 500ppm.

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

Grupo	Protocolo de descontaminação
DW	Água deionizada
NaOCl 2,5%	Hipoclorito de sódio 2,5%
CHX 2%	Clorexidina 2%
HOCl 250ppm	Ácido hipocloroso 250ppm
HOCl 500ppm	Ácido hipocloroso 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, após era 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.

Ao 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) realizada imediatamente após os protocolos de descontaminação testados.

As coletas (S1 e S2) foram realizadas da mesma forma. O canal radicular era preenchido com solução salina estéril e uma ponta de papel absorvente estéril calibre #35 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 era transferida para um microtubo contendo 1 mL de solução salina estéril. O material era homogeneizado e diluído até 10^{-3} (figura 10). Alíquotas foram semeadas em placas de Petri contendo PCA através da técnica das gotas, no local correspondente da diluição utilizada (figura 11). As placas foram incubadas durante 24 horas a uma temperatura de $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após o período de incubação, a contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFCs) foi realizada nas placas (figura 12).

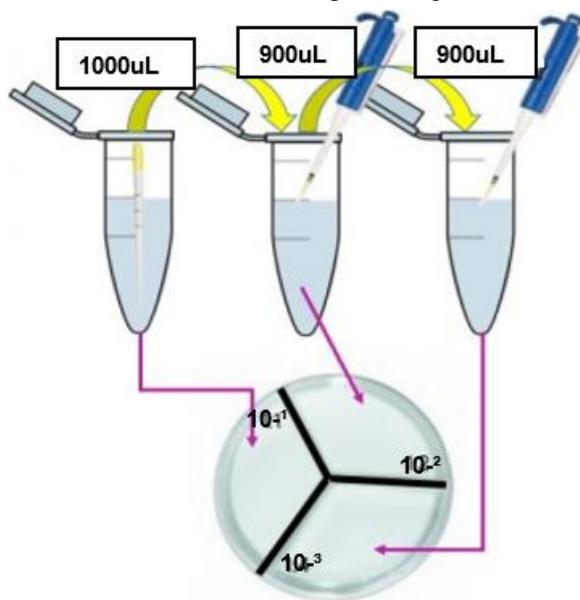


Figura 10: Esquema de diluição dos materiais homogeneizados em placas de petri.

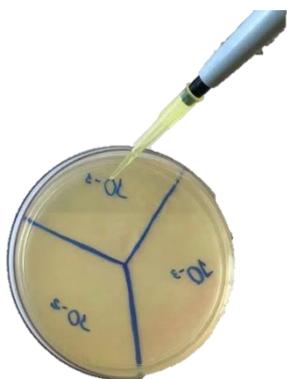


Figura 11: Semeadura no local correspondente à diluição.



Figura 12: 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 de 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-2yl)-2,5-difenil tetrazolium ou MTT (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 13) na concentração de 1x10⁵ 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.

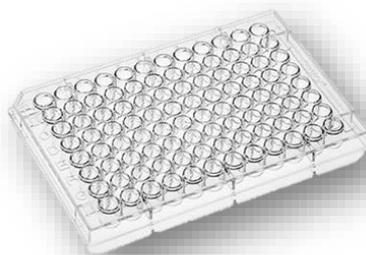


Figura 13: Placa de 96 poços para distribuição das células.

4.3.3 Exposição as substâncias químicas

Após a incubação durante 24 horas a 37° C em estufa com 5% de CO², foi realizada a observação da confluência do tapete celular através da visualização em microscópio invertido (figura 14). A seguir, o meio DMEM foi retirado por aspiração e 100 uL das seguintes soluções (tabela 1, p. 31) foram adicionadas e incubadas no período de 3 minutos:

DW – água deionizada (controle);

NaOCl 2,5% – hipoclorito de sódio 2,5%;

CHX 2% – clorexidina 2%;

HOCl 250ppm – ácido hipocloroso;

HOCl 500ppm – ácido hipocloroso.



Figura 14: 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 15). 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 16). 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 15: Adição de 50 mL de solução de MTT.

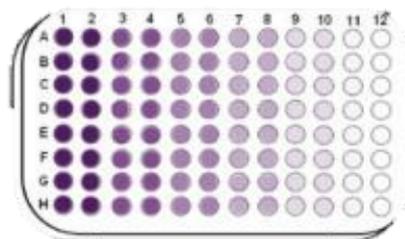


Figura 16: Adição de 100 mL de solução de DMSO.

4.3.5 Análise estatística

Ressalta-se que todos os experimentos foram realizados em triplicata e as porcentagens de viabilidade celular 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 de *E. faecalis* e células viáveis após o tratamento com as substâncias químicas testadas estão expressos na Tabela 2.

Os resultados de ação antimicrobiana revelaram que todas 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 CHX 2% e NaOCl 2,5% foram semelhantes entre si e os grupos HClO 250 ppm e HClO 500 ppm se mostraram menos citotóxicos ($p < 0,05$).

Tabela 2 – Média e desvio padrão (\pm) da redução bacteriana (%) e viabilidade celular (%) após os tratamentos de irrigantes testados.

Grupos	Redução bacteriana (%)	Viabilidade celular (%)
1. DW	12,03 (4,37) ^a	97,19 (1,12) ^a
2. CHX 2%	99,65 (0,38) ^b	39,96 (0,23) ^d
3. NaOCl 2,5%	100,00 (0,00) ^b	35,16 (0,26) ^e
4. HClO 250 ppm	97,93 (2,01) ^b	65,23 (1,89) ^b
5. HClO 500 ppm	98,22 (1,99) ^b	41,73 (1,13) ^c

DW- água destilada; CHX- clorexidina; NaOCl- hipoclorito de sódio; HClO- ácido hipocloroso.

Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas ($p < .05$). A comparação é feita apenas em cada coluna

6. DISCUSSÃO

O *E. faecalis* foi o microrganismo de escolha para a realização deste estudo, pois tem capacidade de penetrar nos túbulos dentinários (CHIVATXARANUKUL *et al.*, 2008; RAN *et al.*, 2015) e consegue sobreviver nos canais radiculares por períodos prolongados (SEDGLEY *et al.*, 2005). Este microrganismo é anaeróbico facultativo com alta resistência às ações antimicrobianas, além de estar presente na maioria dos casos de falha no tratamento endodôntico (PINHEIRO *et al.*, 2003). Na literatura, grande parte dos estudos mostram que o *E. faecalis* não é completamente eliminado do canal através apenas, com o uso de soluções de descontaminação do canal radicular (DE ALMEIDA *et al.*, 2014). Porém, neste estudo, pode-se observar que dentre os protocolos testados, apenas o NaOCl 2,5% foi capaz de eliminar completamente o *E. faecalis* dos canais radiculares. Isso pode ser explicado pelo fato de neste estudo, os canais estarem bem amplos e a substância ter ficado 30min ininterruptos em contato com as paredes do canal, o que beneficia a descontaminação junto das propriedades antibacterianas encontradas com o hipoclorito de sódio. Além disso, as coletas bacteriológicas foram feitas apenas no canal principal, sem levar em consideração o sistema de canais radiculares que possui diversas complexidades anatômicas e dificultam a completa sanificação (TUNCER *et al.*, 2015).

O teste da citotoxicidade de novas substâncias químicas auxiliares é de extrema importância para habilitar o seu uso clínico, para que além de promover a descontaminação dos canais radiculares, não apresente efeitos citotóxicos. Durante o tratamento endodôntico, os irrigantes podem entrar em contato com os tecidos adjacentes, podendo causar complicações como danos teciduais e dor pós operatória aos pacientes, interferindo no processo cicatricial (AMARAL *et al.*, 2007; SIMBULA *et al.*, 2010). Por isso, os agentes químicos empregados devem ter compatibilidade biológica, principalmente quando em contato com a região periapical. Além disso, com o advento da instrumentação mecanizada, os tratamentos passaram a ser mais rápidos, o que fez com que o tempo que a substância química auxiliar permanece em contato com o canal radicular também reduzisse, sendo necessárias substâncias em concentrações mais altas para garantir a efetividade antimicrobiana das soluções, porém, quanto maior a concentração, maiores serão os efeitos citotóxicos das substâncias (SOUZA *et al.*, 2018). 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). Neste estudo foi adotado o período de 30 min para simular um tratamento endodôntico convencional, sendo repostas essas substâncias a cada 5 min no interior dos canais radiculares, pensando em reproduzir a irrigação realizada para descontaminação endodôntica.

O presente estudo testou uma substância chamada de ácido hipocloroso, que foi obtida através de um equipamento eletrolítico chamado Dentaqua®, avaliando sua capacidade antimicrobiana e citotoxicidade como substância química auxiliar na endodontia. O HOCl é um ácido fraco que produz íons hipoclorito (OCl⁻) em solução com a água, e ambos possuem agentes oxidantes com propriedades antibacterianas (BALL *et al.*, 2021). Ele 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), favorecendo a morte das bactérias. 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. Segundo os fabricantes, o equipamento produz ácido hipocloroso ativado (HOCl) e espécies reativas de oxigênio 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). Para avaliar a ação antimicrobiana e a citotoxicidade dessa substância neste estudo, foram utilizados respectivamente os testes de contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) e o ensaio com Metil tetrazólio (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium), conhecido por ensaio MTT.

A ação antimicrobiana é uma propriedade extremamente importante quando se fala em uma substância química auxiliar, e para testar a eficácia dessa propriedade durante um tratamento endodôntico convencional, foi utilizada a contagem de UFC. Este teste foi escolhido com base a pesquisas anteriores (DE ALMEIDA *et al.*, 2014; GRÜNDLING *et al.*, 2011), por permitir quantificar as bactérias dos canais radiculares de forma admissível (PETERS *et al.*, 1995). Não há consenso na literatura sobre o tempo necessário para o crescimento bacteriano do *E. faecalis*, para que seja feito os testes de descontaminação. Foi adotado um protocolo de 14 dias de cultura do *E. faecalis*, para o crescimento bacteriano com base em um estudo feito por GUERREIRO-TANOMARU *et al.* (2013) que mostra que 14 dias é um tempo suficiente para a formação de biofilme no canal radicular.

Para o protocolo de descontaminação, através da simulação de um tratamento endodôntico convencional, as substâncias permaneceram por um período de 30 min em contato com as amostras, de forma ininterrupta. Das substâncias testadas, todas possuíram efeitos bactericidas contra o *E. faecalis*, exceto a água deionizada, que foi utilizada como substância controle. Os resultados mostraram que tanto a CHX, quanto o NaOCl tiveram efetiva ação antimicrobiana no tratamento endodôntico, de acordo com estudos já realizados anteriormente (DE LUCENA *et al.*, 2013; FERRER-LUQUE *et al.*, 2014; PLADISAI *et al.*, 2016; TYAGI *et al.*, 2013). Não houve diferença estatística significativa entre a utilização do HOCl nas concentrações de 250 e 500 ppm das demais substâncias, comprovando a efetividade da substância contra o *E. faecalis*, em concordância com outros estudos presentes na literatura onde foi testada essa propriedade do HOCl (CHEN *et al.*, 2016; POOJAR *et al.*, 2017). Apesar de que, o NaOCl 2,5%, tenha tido completa eliminação do *E. faecalis* de acordo com os possíveis motivos reproduzidos neste estudo que foram citados anteriormente, no teste de contagem de UFC não é possível quantificar o *E. faecalis* nos túbulos dentinários. Para isso, o estudo de Böttcher *et al.* (2015), mostrou que a microscopia confocal a laser apresenta essa vantagem sobre a contagem de UFC, de avaliar a profundidade dos túbulos, além de apresentar a viabilidade celular pela diferenciação de bactérias presentes e viáveis de bactérias presentes e mortas.

No teste de citotoxicidade, o ensaio de MTT foi adotado, pois 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). Este método colorimétrico é simples, reproduzível, rápido, preciso e, avalia a citotoxicidade de materiais dentários com base nas mudanças nos número de células viáveis, metabolismo celular e morfologia celular (MOLLASHAH *et al.*, 2016). Para realização do ensaio, foram utilizadas células de fibroblastos L929, assim como descrito na literatura (SIMBULA *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2007). O tempo estabelecido para testar a citotoxicidade é uma variável questionável na literatura, mas sabe-se que os irrigantes possuem sua citotoxicidade relacionada com diretamente com a dose e o tempo (VOUZARA *et al.*, 2016) e neste estudo ele foi determinado em 3 minutos de contato das soluções com as células L929, baseado no protocolo do ensaio MTT adotado pelo laboratório onde o teste foi realizado.

Os resultados do ensaio MTT mostraram que todas substâncias apresentaram algum grau de citotoxicidade. O maior dano foi ocasionado pela solução de NaOCl, seguido pela CHX, com diferença estatística significativa entre as duas substâncias. Apesar de o NaOCl ser o irrigante mais utilizado na prática endodôntica, por conta da sua capacidade bactericida e de dissolução tecidual (OKINO *et al.*, 2004), seu potencial citotóxico já mostrava na literatura que sua utilização deve ser feita de forma cautelosa (CAI *et al.*, 2023; MARINS *et al.*, 2012). O ácido hipocloroso

apresentou os menores índices de citotoxicidade, isso pode ser explicado pelo fato de o HOCl possuir um pH básico, ao contrário do NaOCl, que possui a molécula de HOCl, mas também tem na composição o OCl⁻, que faz com que aumente o cloro disponível livre e conseqüentemente o pH, favorecendo a citotoxicidade da substância (CAI *et al.*, 2023). Um estudo feito por Ball *et al.* (2021) utilizando HOCl e NaOCl para lavagem intracavitária, mostrou que ambas as soluções possuem ação antimicrobiana semelhantes, porém o NaOCl foi extremamente citotóxico, causando inflamação significativa, fibrose e hemorragia aos tecidos expostos, aumentando a apoptose celular.

Já foi descrito anteriormente, que com a redução do tempo de preparo químico-mecânico, deve-se utilizar o NaOCl em concentrações mais altas para alcançar um efetivo efeito antimicrobiano (RETAMOZO *et al.*, 2010) e como sabe-se, quanto maior a dose, maior será a citotoxicidade e dano celular. Para este estudo, foram utilizadas duas soluções de HOCl, nas concentrações de 250ppm e 500ppm, afim de analisar a viabilidade celular dos fibroblastos L929. Pode-se observar que ambas as concentrações tiveram excelentes potenciais antimicrobianos, equivalentes às soluções de CHX e NaOCl. Porém, a viabilidade celular foi reduzida na maior concentração de 500 ppm. Sendo assim, a melhor concentração de HOCl a ser utilizada é a de 250 ppm, pois possui excelente ação bactericida e sem apresentar tanto potencial citotóxico.

Diante do que foi descrito, pode-se observar que os resultados deste estudo foram satisfatórios, comprovando que o ácido hipocloroso obtido pelo dispositivo eletrolítico Dentaqua é uma ótima alternativa para irrigação do sistema de canais radiculares, ressaltando ainda mais a relevância deste estudo. Apesar de todas as vantagens apresentadas para o HOCl, o equipamento Dentaqua é um dispositivo importado, por isso apresenta um elevado custo e aumentaria significativamente o valor de um tratamento convencional. Entretanto, outros estudos devem ser realizados para avaliar outras propriedades desta substância, como propriedades mecânicas e estudos *in vivo*.

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 e a clorexidina na redução bacteriana e se apresentou menos citotóxico aos tecidos periapicais quando comparado a essas substâncias.

8. REFERÊNCIAS

ABDELMONEM, R.; YOUNIS, M.K.; HASSAN, D.H.; EL-GAWAD, M.A.; AHMED, E.S.; HASSANEIN, E.; EL-BATOUTY, K.; ELFAHAM, A. Formulation and characterization of chlorhexidine HCL nanoemulsion as a promising antibacterial root canal irrigant: In-vitro and ex-vivo studies. *Int. J. Nanomedicine*, v. 14, p. 4697–4708, 2019.

AMARAL, K.F.; ROGERO, M.M.; FOCK, R.A.; BORELLI, P.; GAVINI, G. Cytotoxicity analysis of EDTA and citric acid applied on murine resident 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. *J. Endod.*, v. 40, n. 6, p. 876–879, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2013.10.041>>.

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. *Braz. Oral Res.*, v. 32, p. 1–8, 2018.

BALL, R.L.; GARG, G.; VAZQUEZ, J.S.; DAY, A.; MOFFATT, L.T.; ROBSON, M.C.; SHUPP, J.W. Hypochlorous Acid Solution Is Safe for Intracavitary Lavage: Examination in a Rodent Model. *Eplasty*, v. 21, p. e1, 2021. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7802432/>>.

BASRANI, B.; SANTOS, J.M.; TJÄDERHANE, L.; GRAD, H.; GORDUYSUS, O.; HUANG, J.; LAWRENCE, H.P.; FRIEDMAN, S. Substantive antimicrobial activity in chlorhexidine-treated human root dentin. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, v. 94, n. 2, p. 240–245, 2002.

BLATTES, G.B.F.; MESTIERI, L.B.; BÖTTCHER, D.E.; FOSSATI, A.C.M.; MONTAGNER, F.; GRECCA, F.S. Cell migration, viability and tissue reaction of calcium hypochlorite based-solutions irrigants: An in vitro and in vivo study. *Arch. Oral Biol.*, v. 73, p. 34–39, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2016.08.037>>.

BÖTTCHER, D.E.; SEHNEM, N.T.; MONTAGNER, F.; FATTURI PAROLO, C.C.; GRECCA, F.S. Evaluation of the Effect of Enterococcus faecalis Biofilm on the 2% Chlorhexidine Substantivity: An in Vitro Study. *J. Endod.*, v. 41, n. 8, p. 1364–1370, 2015.

BOTTON, G.; PIRES, C.W.; CADONÁ, F.C.; MACHADO, A.K.; 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. *Int. Endod. J.*, v. 49, n. 8, p. 746–754, 2016.

BUKHARY, S.; BALTO, H. Antibacterial Efficacy of Octenisept, Alexidine, Chlorhexidine, and Sodium Hypochlorite against Enterococcus faecalis Biofilms. *J. Endod.*, v. 43, n. 4, p. 643–647, 2017.

CAI, C.; CHEN, X.; LI, Y.; JIANG, Q. Advances in the Role of Sodium Hypochlorite Irrigant in Chemical Preparation of Root Canal Treatment. *Biomed Res. Int.*, v. 2023, 2023.

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. *Braz. Dent. J.*, 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. *Arch. Oral Biol.*, v. 84,

n. May, p. 89–93, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2017.09.028>>.

CHEN, C.J.; CHEN, C.C.; DING, S.J. Effectiveness of hypochlorous acid to reduce the biofilms on titanium alloy surfaces in vitro. *Int. J. Mol. Sci.*, v. 17, n. 7, 2016.

CHERIAN, B.; GEHLOT, P.M.; MANJUNATH, M.K. Comparison of the antimicrobial efficacy of octenidine dihydrochloride and chlorhexidine with and without passive ultrasonic irrigation - An invitro study. *J. Clin. Diagnostic Res.*, v. 10, n. 6, p. ZC71–ZC77, 2016.

CHIVATXARANUKUL, P.; DASHPER, S.G.; MESSER, H.H. Dentinal tubule invasion and adherence by *Enterococcus faecalis*. *Int. Endod. J.*, v. 41, n. 10, p. 873–882, 2008.

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. *J. Endod.*, v. 40, n. 12, p. 1953–1957, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2014.08.025>>.

DE LUCENA, J.M.V.M.; DECKER, E.M.; WALTER, C.; BOEIRA, L.S.; LÖST, C.; WEIGER, R. Antimicrobial effectiveness of intracanal medicaments on *Enterococcus faecalis*: Chlorhexidine versus octenidine. *Int. Endod. J.*, v. 46, n. 1, p. 53–61, 2013.

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

DU, T.; MA, J.; YANG, P.; XIONG, Z.; LU, X.; CAO, Y. Evaluation of antibacterial effects by atmospheric pressure nonequilibrium plasmas against *enterococcus faecalis* biofilms in vitro. *J. Endod.*, v. 38, n. 4, p. 545–549, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2011.10.021>>.

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. *J. Endod.*, v. 40, n. 4, p. 509–514, 2014.

DUTTA, A.; SAUNDERS, W.P. Comparative evaluation of calcium hypochlorite and sodium hypochlorite on soft-tissue dissolution. *J. Endod.*, v. 38, n. 10, p. 1395–1398, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2012.06.020>>.

FAIR, G.M.; MORRIS, J.C.; CHANG, S.L.; WEIL, I.; BURDEN, R.P. The Behavior of Chlorine as a Water Disinfectant. *Source J. (American Water Work. Assoc.*, v. 40, n. 10, p. 1051–1061, 1948. Disponível em: <<http://www.jstor.org/stable/41234959>%5Cnhttp://www.jstor.org/stable/41234959?seq=1&cid=pdf-reference#references_tab_contents%5Cn<http://www.jstor.org/page/>>.

FARHAD MOLLASHAHI, N.; SABERI, E.; KARKEHABADI, H. Evaluation of cytotoxic effects of various endodontic irrigation solutions on the survival of stem cell of human apical papilla. *Iran. Endod. J.*, v. 11, n. 4, p. 293–297, 2016.

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

FERRER-LUQUE, C.M.; ARIAS-MOLIZ, M.T.; RUÍZ-LINARES, M.; GARCÍA, M.E.M.; BACA, P. Residual activity of cetrimide and chlorhexidine on *Enterococcus faecalis*-infected root canals. *Int. J. Oral Sci.*, v. 6, n. 1, p. 46–49, 2014.

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

GUERREIRO-TANOMARU, J.M.; DE FARIA-JÚNIOR, N.B.; DUARTE, M.A.H.; ORDINOLA-ZAPATA, R.; GRAEFF, M.S.Z.; TANOMARU-FILHO, M. Comparative analysis of *Enterococcus faecalis* biofilm formation

on different substrates. *J. Endod.*, v. 39, n. 3, p. 346–350, 2013.

KAKEHASHI, S.; STANLEY, H.R.; FITZGERALD, R.J. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surgery, Oral Med. Oral Pathol.*, v. 20, n. 3, p. 340–349, 1965.

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

KARATAŞ, E.; AYAZ, N.; ULUKÖYLÜ, E.; BALTACI, M.Ö.; ADIGÜZEL, A. Effect of final irrigation with sodium hypochlorite at different temperatures on postoperative pain level and antibacterial activity: A randomized controlled clinical study. *J. Appl. Oral Sci.*, v. 29, p. 1–8, 2021.

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.I.; ZAROR, C.; DÍAZ-BÁEZ, D.; CASTILLO, D.M.; DE ÁVILA, J.; TRUJILLO, T.G.; CALDERÓN-MENDOZA, J. Evaluation of substantivity of hypochlorous acid as an antiplaque agent: A randomized controlled trial. *Int. J. Dent. Hyg.*, v. 16, n. 4, p. 527–534, 2018.

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

LEONARDO, N.G.E.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. *J. Endod.*, 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. J. Dent. Res.* [S.l: s.n.], 2004

MARAIS, J.T. Cleaning efficacy of a new root canal irrigation solution: A preliminary evaluation. *Int. Endod. J.*, 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. *Int. Endod. J.*, 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. *Braz. Dent. J.*, v. 23, n. 5, p. 527–533, 2012.

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. *J. Endod.*, v. 42, n. 11, p. 1647–1650, 2016.

MOREIRA, D.M.; AFFONSO ALMEIDA, J.F.; FERRAZ, C.C.R.; DE ALMEIDA GOMES, B.P.F.; LINE, S.R.P.; ZAIA, A.A. Structural Analysis of Bovine Root Dentin after Use of Different Endodontics Auxiliary Chemical Substances. *J. Endod.*, 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. *Arch. Oral Biol.*, v. 56, n. 4, p. 359–366, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2010.10.016>>.

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. *J. Endod.*, 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. *Int. Endod. J.*, v. 37, n. 1, p. 38–41, 2004.

PATIL, C.R.; UPPIN, V. Effect of endodontic irrigating solutions on the microhardness and roughness of root canal dentin: An in vitro study. *Indian J. Dent. Res.*, v. 22, n. 1, p. 22–27, 2011.

PETERS, L.B.; WESSELINK, P.R.; MOORER, W.R. The fate and the role of bacteria left in root dentinal tubules. *Int. Endod. J.*, v. 28, n. 2, p. 95–99, 1995.

PINHEIRO, E.T.; GOMES, B.P.; FERRAZ, C.C.; SOUSA, E.L.; TEIXEIRA, F.B.; SOUZA-FILHO, F.J. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int. Endod. J.*, v. 36, n. 1, p. 1–11, 2003.

Disponível em: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L36615794%0Ahttp://wt3cf4et2l.search.serialssolutions.com?sid=EMBASE&issn=01432885&id=doi:&atitle=Microorganisms+from+canals+of+root-filled+teeth+with+periapical+lesions.&stitle=Int+>>.

PLADISAI, P.; AMPORNARAMVETH, R.S.; CHIVATXARANUKUL, P. Effectiveness of different disinfection protocols on the reduction of bacteria in *Enterococcus faecalis* biofilm in teeth with large root canals. *J. Endod.*, v. 42, n. 3, p. 460–464, 2016.

POOJAR, B. *et al.* Methodology Used in the Study. *Asian J. Pharm. Clin. Res.*, v. 7, n. 10, p. 1–5, 2017.

PRADO, M.; DA SILVA, E.J.N.L.; DUQUE, T.M.; ZAIA, A.A.; FERRAZ, C.C.R.; DE ALMEIDA, J.F.A.; DE ALMEIDA GOMES, B.P.F. 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.

RAN, S.; WANG, J.; JIANG, W.; ZHU, C.; LIANG, J. Assessment of dentinal tubule invasion capacity of *Enterococcus faecalis* under stress conditions ex vivo. *Int. Endod. J.*, v. 48, n. 4, p. 362–372, 2015.

RETAMOZO, B.; SHABAHANG, S.; JOHNSON, N.; APRECIO, R.M.; TORABINEJAD, M. Minimum Contact Time and Concentration of Sodium Hypochlorite Required to Eliminate *Enterococcus faecalis*. *J. Endod.*, v. 36, n. 3, p. 520–523, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2009.12.005>.

REYNOLDS, K.A.; SEXTON, J.D.; GARAVITO, F.; ANDERSON, B.; IVASKA, J.M. Impact of a Whole-Room Atomizing Disinfection System on Healthcare Surface Contamination, Pathogen Transfer, and Labor Efficiency. *Crit. Care Explor.*, v. 3, n. 2, p. e0340, 2021.

ROSSI-FEDELE, G.; GUASTALLI, A.R.; DOĞRAMACI, E.J.; STEIER, L.; DE FIGUEIREDO, J.A.P. Influence of pH changes on chlorine-containing endodontic irrigating solutions. *Int. Endod. J.* [S.l.: s.n.], 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. *J. Endod.*, v. 44, n. 2, p. 263–268, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2017.09.001>.

SEDGLEY, C.M.; LENNAN, S.L.; APPELBE, O.K. Survival of *Enterococcus faecalis* in root canals ex vivo. *Int. Endod. J.*, v. 38, n. 10, p. 735–742, 2005.

SEVERING, A.L.; REMBE, J.D.; KOESTER, V.; STUERMER, E.K. Safety and efficacy profiles of different commercial sodium hypochlorite/hypochlorous acid solutions (NaClO/HClO): Antimicrobial efficacy, cytotoxic impact and physicochemical parameters in vitro. *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 74, n. 2, p. 365–372, 2019.

SIMBULA, G.; DETTORI, C.; CAMBONI, T.; COTTI, E. Comparison of Tetraacetythylenediamine + Sodium Perborate and Sodium Hypochlorite Cytotoxicity on L929 Fibroblasts. *J. Endod.*, v. 36, n. 9, p. 1516–1520,

2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2010.05.010>>.

SOUZA, M.A.; LAGO, B.L.T.; PLETSCHE, A.; BINOTTO, A.; POLETTI, A.; RODRIGUES, F.T.; RICCI, R.; BISCHOFF, K.F.; DIAS, C.T.; PALHANO, H.S.; LAGO, C.T.R.; FARINA, A.P.; CECCHIN, D.; BERVIAN, J.; DE FIGUEIREDO, J.A.P. Association of calcium hypochlorite, reciprocating instrumentation and photodynamic therapy: Antimicrobial analysis and effects on root dentin structure. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, v. 29, n. November 2019, 2020.

SOUZA, M.A.; TUMELERO DIAS, C.; ZANDONÁ, J.; PAIM HOFFMANN, I.; SANCHES MENCHIK, V.H.; PALHANO, H.S.; BERTOL, C.D.; ROSSATO-GRANDO, L.G.; CECCHIN, D.; DE 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 Photodyn. Ther.*, v. 23, n. July, p. 347–352, 2018.

STOJICIC, S.; SHEN, Y.; QIAN, W.; JOHNSON, B.; HAAPASALO, M. Antibacterial and smear layer removal ability of a novel irrigant, QMiX. *Int. Endod. J.*, v. 45, n. 4, p. 363–371, 2012.

TREVINO, E.G.; PATWARDHAN, A.N.; HENRY, M.A.; PERRY, G.; DYBDAL-HARGREAVES, N.; HARGREAVES, K.M.; DIOGENES, A. Effect of irrigants on the survival of human stem cells of the apical papilla in a platelet-rich plasma scaffold in human root tips. *J. Endod.*, v. 37, n. 8, p. 1109–1115, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2011.05.013>>.

TYAGI, S.; SINHA, D.; GARG, P.; SINGH, U.; MISHRA, C.; NAGPAL, R. Comparison of antimicrobial efficacy of propolis, *Morinda citrifolia*, *Azadirachta indica* (Neem) and 5% sodium hypochlorite on *Candida albicans* biofilm formed on tooth substrate: An in-vitro study. *J. Conserv. Dent.*, v. 16, n. 6, p. 532–535, 2013.

VERMA, U.P.; GUPTA, A.; YADAV, R.K.; TIWARI, R.; SHARMA, R.; BALAPURE, A.K. Cytotoxicity of chlorhexidine and neem extract on cultured human gingival fibroblasts through fluorescence-activated cell sorting analysis : An in-vitro study. 2019.

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

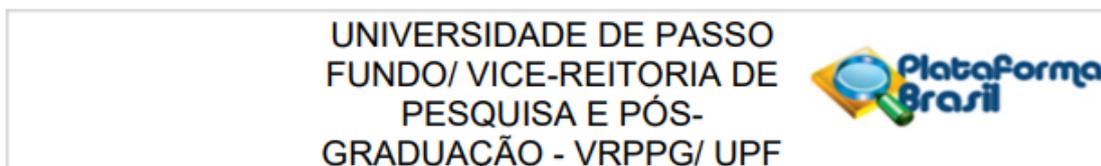
WANG, L.; BASSIRI, M.; NAJAFI, R.; NAJAFI, K.; YANG, J.; KHOSROVI, B.; HWONG, W.; BARATI, E.; BELISLE, B.; CELERI, C.; ROBSON, M.C. Hypochlorous acid as a potential wound care agent: part I. Stabilized hypochlorous acid: a component of the inorganic armamentarium of innate immunity. *J. Burns Wounds*, v. 6, p. e5, 2007.

Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17492050>> <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1853323>>.

WIDBILLER, M.; ALTHUMAIRY, R.I.; DIOGENES, A. Direct and Indirect Effect of Chlorhexidine on Survival of Stem Cells from the Apical Papilla and Its Neutralization. *J. Endod.*, v. 45, n. 2, p. 156–160, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.joen.2018.11.012>>.

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

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

ANTIMICROBIAL ACTION OF HYPOCHLOROUS ACID OBTAINED FROM AN
ELECTROLYTIC DEVICE AND EVALUATION OF ITS CYTOTOXICITY IN
FIBROBLASTIC CELLS²

AÇÃO ANTIMICROBIANA DO ÁCIDO HIPOCLOROSO OBTIDO DE DISPOSITIVO
ELETROLÍTICO E AVALIAÇÃO DE SUA CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS
FIBROBLÁSTICAS

Abstract

This study evaluated the antimicrobial effect and cytotoxicity of hypochlorous acid (HClO) obtained from an electrolytic device. The root canals of fifty extracted human teeth were inoculated with *Enterococcus faecalis* and divided into 5 groups (n=10): DW (control); 2% chlorhexidine gel (CHX); 2.5% sodium hypochlorite (NaOCl); 250 ppm HClO and 500 ppm HClO. The counting of colony forming units evaluated the decontamination potential of each group. Cytotoxicity was evaluated after inoculation of tested protocols in fibroblastic cells for 3 min, calculating the cell viability. Specific statistical analysis was performed ($\alpha=5\%$). The highest bacterial reduction was observed in experimental groups, with no statistical differences from each other ($p>0.05$). The highest number of viable cells was observed in control group, followed by 250 ppm HClO and 500 ppm HClO groups, with statistical differences from each other ($p<0.05$). It could be concluded that HClO presented similar antimicrobial activity and lower cytotoxicity at both concentrations when compared to CHX and NaOCl.

Keywords: antimicrobial, chlorhexidine, cytotoxicity, hypochlorous acid, sodium hypochlorite.

² Mylena Lazareti Zanella (Department of Restorative Dentistry, University of Passo Fundo, Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brazil)

Resumo

Este estudo avaliou o efeito antimicrobiano e a citotoxicidade do ácido hipocloroso (HClO) obtido em dispositivo eletrolítico. Os canais radiculares de cinquenta dentes humanos extraídos foram inoculados com *Enterococcus faecalis* e divididos em 5 grupos (n=10): DW (controle); gel de clorexidina 2% (CHX); hipoclorito de sódio (NaOCl) 2,5%; 250 ppm de HClO e 500 ppm de HClO. A contagem das unidades formadoras de colônias avaliou o potencial de descontaminação de cada grupo. A citotoxicidade foi avaliada após inoculação dos protocolos testados em células fibroblásticas por 3 min, calculando a viabilidade celular. Foi realizada análise estatística específica ($\alpha=5\%$). A maior redução bacteriana foi observada nos grupos experimentais, sem diferenças estatísticas entre si ($p>0,05$). O maior número de células viáveis foi observado no grupo controle, seguido pelos grupos 250 ppm HClO e 500 ppm HClO, com diferenças estatísticas entre si ($p<0,05$). Pode-se concluir que o HClO apresentou atividade antimicrobiana semelhante e menor citotoxicidade em ambas as concentrações quando comparado ao CHX e ao NaOCl.

Palavras-chave: antimicrobiano, clorexidina, citotoxicidade, ácido hipocloroso, hipoclorito de sódio.

Introduction

Endodontic treatment has as main objective the effective decontamination of the root canal system, taking care not to induce damages to adjacent tissues, since microorganisms represent the major reason for pulp and periapical pathologies (1), and chemical auxiliary substances induce inflammatory reactions when contacting connective tissue (2). The root canal instrumentation alone is not able to reach effective decontamination, due to the anatomical complexity of the root canal system (3), which provides a suitable environment for microbial survival and development of persistent infection (4). In this scenario, mechanical instrumentation must be associated with chemical auxiliary substances, in order to promote effective antimicrobial activity with no damage to adjacent tissues, favoring apical healing.

Sodium hypochlorite (NaOCl) and chlorhexidine (CHX) have been used as chemical auxiliary substances during chemomechanical preparation. The broad-spectrum antimicrobial activity (5) and ability to promote pulp tissue dissolution (6) are the main benefits of NaOCl. However, it induces significant modifications in organic components and mechanical properties of the root dentin (7) and its cytotoxicity induces periapical tissue irritation (2). In turn, CHX presents broad spectrum antimicrobial activity and substantivity, ensuring long time of action inside the root canal (8). However, CHX is not able to promote pulp tissue dissolution (6) and induces some levels of inflammatory reaction when contacting connective tissues (9). Therefore, there is a constant search for new alternatives in the field of auxiliary chemical substances.

More recently, a new technology called Dentaqua (Dentaqua, Conmel, Ireland) has been developed, which has the ability to produce hypochlorous acid (HClO) solution at different concentrations. It is obtained by the electrolysis of saline solution mixed with distilled water and previous studies have shown its antimicrobial potential in dental unit water lines (10), as well as its low cytotoxicity when tested over epithelial tissues (11). In addition, HClO has both proinflammatory and anti-inflammatory properties, promotes healing by regulating cytokines and growth factors (12), and oxidizes organic matter present in the wastewater (13). Although the

literature reveals a promising future for the use of HClO as chemical auxiliary substance, its antimicrobial activity in root canals and cytotoxicity potential over connective tissue cells need further investigations.

Thus, the aim of this study was to perform an *in vitro* evaluation of the antimicrobial effect of HClO obtained from an electrolytic device on root canals infected with *E. faecalis* and its cytotoxicity in fibroblastic cells. The hypotheses were that (i) HClO presents similar antimicrobial activity and (ii) lower cytotoxicity, when compared to other chemical auxiliary substances under investigation.

Materials and Methods

This study was approved by the Research Ethical Committee of the University of Passo Fundo (protocol No. 5.783.928).

Antimicrobial effect evaluation

Fifty single-rooted extracted human teeth were used in the present evaluation. All teeth were obtained from the Biobank of the School of Dentistry of the University of Passo Fundo (Passo Fundo, RS, Brazil). Dental crowns were sectioned with diamond disc so that all roots remained with 15 mm in length. All roots were prepared in order to remove pulp tissues and to standardize the canal diameter. Working length (WL) was established by introducing #10 K-file (Dentsply-Sirona, York, PA, USA) into the root canal until its tip was visualized at the apical foramen. From this measure, 1 mm was subtracted from WL. Roots were enlarged using manual K-files (Dentsply-Sirona) and serial instrumentation, up to a #35 file. Distilled water (DW) (Natupharma, Passo Fundo, RS, Brazil) was used as irrigant solution and renewed at each instrument change. Subsequently, root canals were filled with 17% EDTA (Natupharma, Passo Fundo, RS, Brazil) for 1 minute to remove the smear layer, followed by irrigation with 5 mL of DW and drying with absorbent paper (Tanari, Manacapuru, AM, Brazil).

Roots were sterilized at 120° C in autoclave (Kavo, Joinville, RS, Brazil) for 30 minutes. Five samples were randomly selected for sterilization control. Sterile paper point was placed in contact with the canal walls of each sample for 15 seconds and transported to microtube containing 1 mL of 0.9% saline solution (Basso, Caxias do Sul, RS, Brazil). The material was homogenized and a 100 µL aliquot was cultivated on blood agar after five minutes. Samples were incubated at 37° C for 48 hours and showed no sign of bacterial growth.

The reference strain was *Enterococcus faecalis* (*E.faecalis*) (ATCC 19433), which was cultivated in brain-heart infusion (BHI) broth (Acumedia–Neogen, Lansing, MI, USA) for 24 hours at 37° C in bacteriological incubator (Kavo, Joinville, SC, Brazil). The turbidity degree was adjusted to the McFarland's 1.0 scale, corresponding to 3.0×10^8 CFU/ml and optical density from 0.25 to 550 nm. A 100-µL culture aliquot was inoculated into the root canal of each sample, until extravasation to the root canal entrance. The culture was maintained for 14 days for biofilm formation, and the remaining volume was replaced every 48 hours with sterile BHI. Once a week, one BHI aliquot was collected from a randomly selected specimen of each group and submitted to Gram staining and cultured on blood agar, followed by catalase and esculin tests, in order to verify the absence of other microorganisms.

After contamination, samples were irrigated with 5 mL of DW and randomly distributed into five groups (n=10), according to test decontamination protocols: G1: DW (control); G2: 2% CHX; G3: 2.5% NaOCl; G4: 250 ppm HClO; G5: 500 ppm HClO. DW, CHX gel and NaOCl solutions were obtained by manufacturing pharmacy (Natupharma, Passo Fundo, RS, Brazil).

The 250 ppm HClO solution was obtained by Dentaqua device (Dentaqua, Conmel, Ireland). This device consists of a compartment on the top, a connector for the smaller bottle on the back, and a connector for the larger bottle on the front. Figure 1 provides an illustration of the Dentaqua device. The electrochemical activation technology involves the generation of electrochemically activated solutions by passing a dilute NaCl solution through an electric field in a Flow-through Electrolytic Module (FEM), segregating the ions formed and producing two oppositely charged

solutions with altered physical and chemical properties. The positively charged solution (anolyte) consists of a mixture of unstable mixed oxidants, such as HClO, in a physically excited state, which is capable of penetrating biofilms and is highly microbicidal. The negatively charged antioxidant solution (catholyte) predominantly consists of sodium hydroxide in an excited state.

The upper compartment is filled with sterile DW. The smaller bottle on the back is filled with brine solution, which is composed of three components: deionized water, saturated sodium chloride brine and 9% hydrochloric acid. The of deionized water, saturated brine and 9% hydrochloric acid volume ratio is 17:2 :1. After filling, the smaller bottle was connected to the back of the device, while the larger bottle was connected to the front of the device. The Water Bottle button was pressed, performing a washing cycle of the device with DW for a period of 3 minutes, discarding this solution in the larger bottle. The DW was then discarded and the larger bottle was again connected to the device for the production of HClO. The Ecasol button was pressed for the production of HClO for a period of 10 minutes, which was obtained by the electrolysis of saline solution mixed with DW in the device, dispensing the HClO solution at 250 ppm in the larger bottle, being ready to use. For the production of HClO solution at 500 ppm, the same procedure was performed, replacing DW by HClO solution at 250 ppm during the production procedure.

In groups 1, 3, 4 and 5, root canals were completely filled with the test solution using 5-mL syringe with 19-G needle until extravasation to the root canal entrance. The test solution remained in contact with root canal walls for 5 minutes. Subsequently, irrigation with 5 mL of test solution was performed and the test solution was renewed. Six 5-minute decontamination cycles were performed, totaling 30 minutes of the test solution into root canals. In group 2, root canals were completely filled with 2% CHX gel using 5-mL syringe with 19-G needle until extravasation to the root canal entrance. The CHX gel remained in contact with root canal walls for 5 minutes. Subsequently, irrigation with 5 mL of DW was performed and the CHX gel was renewed. Six 5-minute decontamination cycles were performed, totaling 30 minutes of the CHX gel in root

canals. Finally, irrigation with 5 mL of DW was performed and the root canals of all groups were dried using aspiration cannula and absorbent paper points (Tanari).

Microbiological analysis was performed in two stages: after contamination (S1) and after irrigation procedures (S2). Root canals were filled with sterile saline solution and #35 K-file promoted contact with root canal walls for 30 seconds, and #35 sterile absorbent paper points promoted the same intentional contact with root canal walls for 30 seconds. It was transferred to tube containing 450 μL of 0.85% sterile saline solution, being subsequently homogenized and diluted to 10^{-3} . Aliquots of 100 μL of each dilution were cultivated on blood agar in duplicate, being incubated for 24 h at 37° C. Subsequently, the number of CFUs was counted on plates. The antimicrobial activity was analyzed by the reduction percentage in S1 and S2 CFUs counts.

Cytotoxicity evaluation

In this evaluation, L929 gingival fibroblastic cells were used, which were provided by the Laboratory of Applied Virology of the Federal University of Santa Catarina (UFSC, Florianópolis, SC, Brazil). For cell maintenance, Minimum Essential Media (Sigma-Aldrich, Rio de Janeiro, RJ, Brazil) supplemented with 10% fetal bovine serum medium (Invitrogen, São Paulo, SP, Brazil) were used, being kept in 75 cm^2 culture flasks under humidity at 37°C and 5% CO_2 .

The assay was performed with 3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide or MTT (Sigma-Aldrich), corresponding to a colorimetric test to evaluate cell viability. L929 cells were trypsinized, counted and distributed in 96-well plates at concentration of 1×10^5 cells per well. The Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Sigma-Aldrich, Rio de Janeiro, RJ, Brazil) was used, enriched with 5% fetal bovine serum. After incubation for 24 hours at 37°C in oven with 5% CO_2 , cell confluence was observed under inverted microscope. Then, the DMEM medium was removed by aspiration and 100 μL of test chemical substances were added, being incubated for 3 minutes.

Wells were washed with 200 μL of sterile PBS and 50 μL of MTT solution (1 mg/mL in DMEM) were added for incubation for 4 hours. MTT was carefully removed avoiding damage to

cells and 100 mL of dimethylsulfoxide (DMSO) were added to solubilize formazan crystals. DMSO was also added to empty wells for white colorimetric calculation. The plate was placed on mixer for 10 minutes and the absorbance was measured on 490 nm filter. All experiments were performed in triplicate and cell viability percentages were calculated in relation to control group, according to the following formula: $\text{viability (\%)} = (\text{sample absorbance} - \text{mean blank absorbance}) \times 100 / \text{control absorbance} - \text{mean blank absorbance}$.

Statistical analysis

Data were analyzed using SPSS 11.0 software (IBM SPSS Statistics 20; SPSS, Chicago, IL). Normal data distribution was confirmed by the Shapiro-Wilk test in both evaluations. Data of both evaluations were analyzed by one-way ANOVA followed by post-hoc Tukey's test ($p < 0.05$).

Results

Means (standard deviation) of bacterial reduction (%) in the evaluation of CFUs and viable cells (%) and cytotoxicity after tested decontamination protocols are presented in Table 1.

In the CFU evaluation, no statistically significant differences among groups 2 (CHX), 3 (2.5% NaOCl), 4 (250 ppm HClO) and 5 (500 ppm HClO) ($p > 0.05$) were observed. All experimental groups were statistically different when compared to the control group ($p < 0.05$). In the cytotoxicity evaluation, the highest percentage of viable cells was observed in the control group, followed by group 4 (250 ppm HClO) 5 (500 ppm HClO) and 2 (2% CHX), with statistically significant differences from each other ($p < 0.05$). The lowest percentage of viable cells was observed in group 3 (2.5% NaOCl), being statistically different from all other groups ($p < 0.05$).

Discussion

The permanence of bacteria inside the root canal system after chemo-mechanical preparation can be considered the main cause of endodontic failure (14). Thus, it is essential to use an auxiliary

chemical substance with effective antimicrobial activity in the endodontic therapy. At the same time, there is risk of chemical substance extrusion to periapical areas during these procedures. Depending of chemical substance and concentration, it causes cell damage, induces inflammatory reaction and impairs wound healing (2,9), and impairs the survival of stem cells, which are required for successful tissue regeneration (15). In this scenario, the present study evaluated HClO obtained from an electrolytic device regarding its antimicrobial activity and cytotoxicity, considering that these variables are essential to enable the use of a chemical substance in endodontic treatment.

Several microorganisms have been isolated from root canals in cases of endodontic failure, with high incidence of *E. faecalis*. *E. faecalis* is a highly-resistant anaerobic facultative gram+ microorganism, presents ability to penetrate dentinal tubules and colonize the root canal system in a biofilm format (16). For these reasons, this bacterium was chosen to perform the bacterial growth model in this study. Despite a wide variety of times in literature, contamination time of 14 days was used in the present study. According to Guerreiro-Tanomaru (17), this time is enough to ensure the formation of a cohesive and well-structured bacterial biofilm. Based in previous studies focused on antimicrobial strategies against biofilms, CFU count was used as antimicrobial evaluation method in this study, being a standard protocol that provides an effective bacterial quantification of the root canal space, as well as the evaluation of the effectiveness of proposed decontamination protocols (18-20).

The MTT assay assesses cytotoxicity based on changes in the number of viable fibroblastic cells, cell metabolism and cell morphology. It is a simple, reproducible and frequently used method to assess the cytotoxicity of irrigating solutions, which are commonly used in the endodontic therapy. The fibroblastic cells used in this evaluation are diploid host cells, continuous in nature, which are more likely of demonstrating the cytotoxic effect exerted by dental materials or chemical substances when compared to other commercially available cell lines (21). In the present study, the MTT assay was used to evaluate the cytotoxicity of tested decontamination protocols

over fibroblastic cells, considering that it presents higher sensitivity; the cell viability count is not affected by any compounds released from samples; it is not influenced by any cellular metabolic action, making this evaluation easier to perform when compared to other methods (22).

Mechanical instrumentation promoted important advances to the shaping of root canals and made instrumentation faster. At the same time, it reduced the contact time of chemical substances with root canal walls, decreasing the antimicrobial activity of chemical substances (23,24). In the present study, instrumentation was not associated with the use of test chemical substances to assess the intrinsic decontamination potential of these substances. In addition, irrigation cycles were performed, with constant renewal of the test substances in order to simulate the clinical reality of the time required to perform the chemo-mechanical preparation in all its stages (25). Despite the care regarding the time to perform adequate decontamination, none of the test groups completely eliminated *E.faecalis* from root canals. This is a critical finding because this resistant bacterium can adapt to the environment, acquire nutrients and reach critical number to exhibit virulence and pathogenicity, leading to the progression of periapical diseases in a clinical situation (26).

According to results of present study, HClO obtained from an electrolytic device at both concentrations showed high antimicrobial activity, being similar to conventional auxiliary substances, such as NaOCl and CHX, which confirms the first hypothesis of this study. The antimicrobial effect of chlorinated substances, such as HClO, occurs due to the release of active chlorine. Through this mechanism, enzymatic inhibition and formation of chloramines are observed after reaction with bacterial cytoplasm components. In addition, chlorine is a strong oxidizing agent, which promotes the irreversible oxidation of sulfhydryl groups of bacterial enzymes (27). According to these mechanisms, bacterial cell metabolic reactions are interrupted, causing damage to cell DNA. In addition, the acidic pH and the high HClO concentrations also favor this effective antimicrobial activity (28), leading to high bacterial cell death in the present study.

HClO obtained from the electrolytic device at both concentrations showed lower cytotoxicity when compared to NaOCl and CHX in this study. This result confirms the second hypothesis of present study, being in accordance with some findings in literature, where NaOCl and CHX revealed undesirable effects regarding cytotoxicity (2,9). The electrochemically activated solution produced by the Dentaqua device is composed of activated mixed oxidants formed in dynamic equilibrium, where HClO is the main oxidant. It is an endogenous substance, which is produced by white blood cells, induces healing by regulating cytokines and growth factors, promotes biomodulation of inflammatory sites and is used by leukocytes to reduce infections (29). In addition, some findings in literature revealed that HClO solution obtained from an electrolytic device induced low levels of adverse effects over connective tissue cells (11), in the same way as observed in the present study, even when used at high concentrations. The previously described biological properties may help to explain the results found.

The chemical substances that promote the release of active chlorine are usually influenced by their concentration, with greater biological effects when concentration is increased. Furthermore, it is known that the concentration of solutions containing active chlorine decreases over time and storage (5). Although there are studies in literature regarding the benefits of HClO, the present study proposes the use of a device capable of controlling the hypochlorous acid concentration at the production time. Another advantage is that the production is fast and easy to perform, providing solution containing fresh HClO at the desired concentration. The results of this study showed that the increase in HClO concentration did not induce increase in antimicrobial action. Even at the lowest concentration of 250 ppm, the active chlorine content responsible for bacterial neutralization is already high, being enough to reach high antimicrobial action levels. On the other hand, this increase in concentration led to lower fibroblastic cell viability level. Unlike clinical reality, solutions were placed in direct contact with connective tissue cells, and the active chlorine content was directly placed in contact with these cell components. Thus, the higher HClO concentration may have caused such results. Even so, cytotoxicity was significantly lower when

compared to CHX and, mainly, to NaOCl, which caused severe reduction in cell viability levels in this study.

The present study proposes the use of a device capable of producing an electrochemically activated solution containing HClO as main component. In addition to producing a fresh substance at the desired concentration and ready for use, this study revealed promising findings regarding antimicrobial activity and cytotoxicity. The present study has some limitations. Microbiologic samples were only collected from the main canal. Therefore, it was not possible to assess the presence of bacteria in the depth of dentinal tubules or the viability of these bacteria. Moreover, the auxiliary chemical substance remains in contact with a reduced area of periapical tissues during endodontic treatment. There is no direct contact between the chemical substance and connective tissue cells throughout the study, as was performed in the experimental design of the present study. Cytotoxicity may be lower in clinical reality, although in the present study, significant differences were observed among test substances. Further studies are suggested to clarify these conditions, as well as to evaluate other variables involving the influence of these chemical substances in endodontic treatment.

Conclusion

Under the study limitations, it was possible to conclude that HClO presented similar antimicrobial activity and lower cytotoxicity at both concentrations when compared to CHX and NaOCl.

References

1. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1965;20:340–349.
2. Gatot A, Arbelle J, Leiberman A, Yanai-Inbar I. Effects of sodium hypochlorite on soft tissues after its inadvertent injection beyond the root apex. *J Endod* 1991;17:573–574.

3. Ahmed HM, Versiani MA, De-Deus G, Dummer PM. A new system for classifying root and root canal morphology. *Int Endod J* 2017;50:761–70.
4. Siqueira JF Jr, Rôças IN. Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. *J Endod* 2008;34:1291–1301.e3.
5. Du T, Ma J, Yang P, Xiong Z, Lu X, Cao Y. Evaluation of antibacterial effects by atmospheric pressure nonequilibrium plasmas against *Enterococcus faecalis* biofilms in vitro. *J Endod* 2012;38:545-549.
6. Okino LA, Siqueira EL, Santos M, Bombana AC, Figueiredo JA. Dissolution of pulp tissue by aqueous solution of chlorhexidine digluconate and chlorhexidine digluconate gel. *Int Endod J* 2004;37:38-41.
7. Moreira DM, Almeida JF, Ferraz CC, Gomes BP, Line SR, Zaia AA. Structural analysis of bovine root dentin after use of different endodontics auxiliary chemical substances. *J Endod* 2009;35:1023-1027.
8. Ferraz CC, Gomes BP, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. In vitro assessment of the antimicrobial action and the mechanical ability of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant. *J Endod* 2001;27:452-455.
9. Pereira MS, Faria G, Bezerra da Silva LA, Tanomaru-Filho M, Kuga MC, Rossi MA. Response of mice connective tissue to intracanal dressings containing chlorhexidine. *Microsc Res Tech* 2012;75:1653-1638.
10. Marais JT, Brozel VS. Electro-chemically activated water in dental unit water lines. *Brit Dent J* 1999;187:154-158.
11. Boyle MA, O'Donnell MJ, Russell RJ, Coleman DC. Lack of cytotoxicity by Trustwater Ecasol™ used to maintain good quality dental unit waterline output water in keratinocyte monolayer and reconstituted human oral epithelial tissue models. *J Dent* 2010;38:930-940.
12. Sam CH, Lu HK. The role of hypochlorous acid as one of the reactive oxygen species in periodontal disease. *J Dent Sci* 2009;4:45–54.
13. Vijayaraghavan K, Ramanujam TK, Balasubramanian N. In situ hypochlorous acid generation for the treatment of distillery spentwash. *Ind Eng Chem Res* 1999;38:2264–2267.
14. Vera J, Siqueira JF Jr, Ricucci D, Loghin S, Fernández N, Flores B, Cruz AG. One- versus two-visit endodontic treatment of teeth with apical periodontitis: a histobacteriologic study. *J Endod* 2012;38:1040-1052.
15. Kim SG, Kahler B, Lin LM. Current developments in regenerative endodontics. *Curr Oral Health Rep* 2016;3:293–301.

16. Sedgley CM, Lennan SL, Appelbe OK. Survival of *Enterococcus faecalis* in root canals ex vivo. *Int Endod J* 2005;38:735–742.
17. Guerreiro-Tanomaru JM, de Faria-Júnior NB, Duarte MA, Ordinola-Zapata R, Graeff MS, Tanomaru-Filho M. Comparative analysis of *Enterococcus faecalis* biofilm formation on different substrates. *J Endod* 2013;39:346-350.
18. Evans MD, Baumgartner JC, Khemaleelakul S, Xia T. Efficacy of calcium hydroxide: chlorhexidine paste as an intracanal medication in bovine dentin. *J Endod* 2003;29:338–339.
19. Menezes MM, Valera MC, Jorge AO, Koga-Ito CY, Camargo CH, Mancini MN. In vitro evaluation of the effectiveness of irrigants and intracanal medicaments on microorganisms within root canals. *Int Endod J* 2004;37:311–319.
20. de Almeida AP, Souza MA, Miyagaki DC, Dal Bello Y, Cecchin D, Farina AP. Comparative evaluation of calcium hypochlorite and sodium hypochlorite associated with passive ultrasonic irrigation on antimicrobial activity of a root canal system infected with *Enterococcus faecalis*: an in vitro study. *J Endod* 2014;40:1953-1957.
21. Eldeniz AU, Mustafa K, Ørstavik D, Dahl JE. Cytotoxicity of new resin-, calcium hydroxide- and silicone-based root canal sealers on fibroblasts derived from human gingiva and L929 cell lines. *Int Endod J* 2007;40:329–337.
22. Barnhart BD, Chuang A, Dalle Lucca JJ, Roberts S, Liewehr F, Joyce AP. An in vitro evaluation of the cytotoxicity of various endodontic irrigants on human gingival fibroblasts. *J Endod* 2005;31:613–615.
23. Souza MA, Menon CZ, Nery LF, Bertol CD, Rossato-Grando LG, Cecchin D. Effect of root canal preparation techniques on chlorhexidine substantivity on human dentin: a chemical analysis. *Clin Oral Investig* 2018;22:859-865.
24. Souza MA, Lago BLT, Pletsch A, Binotto A, Poletti A, Rodrigues FT, Ricci R, Bischoff KF, Dias CT, Palhano HS, Lago CTR, Farina AP, Cecchin D, Bervian J, de Figueiredo JAP. Association of calcium hypochlorite, reciprocating instrumentation and photodynamic therapy: Antimicrobial analysis and effects on root dentin structure. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2020;29:101625.
25. Siqueira JF Jr, Rôças IN, Paiva SS, Guimarães-Pinto T, Magalhães KM, Lima KC. Bacteriologic investigation of the effects of sodium hypochlorite and chlorhexidine during the endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007;104:122-130.

26. Siqueira JF Jr, Rôças IN. Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. *J Endod* 2008;34:1291-1301.
27. Baumgartner JC, Ibay AC. The chemical reactions of irrigants used for root canal debridement. *J Endod* 1987;13:47-51.
28. del Carpio-Perochena A, Bramante CM, de Andrade FB, Maliza AG, Cavenago BC, Marciano MA, Amoroso-Silva P, Duarte MH. Antibacterial and dissolution ability of sodium hypochlorite in different pHs on multi-species biofilms. *Clin Oral Investig* 2015;19:2067-2073.
29. Mourad KA, Hobro S. Developing chlorine-based antiseptic by electrolysis. *Sci Total Environ* 2020;20:709:136108.

Figure 1: Representative image of the Dentaqua device. A – Water bottle button; B – Ecasol button; C – Upper compartment; D – Smaller bottle with brine solution; E – Larger bottle with HClO solution.

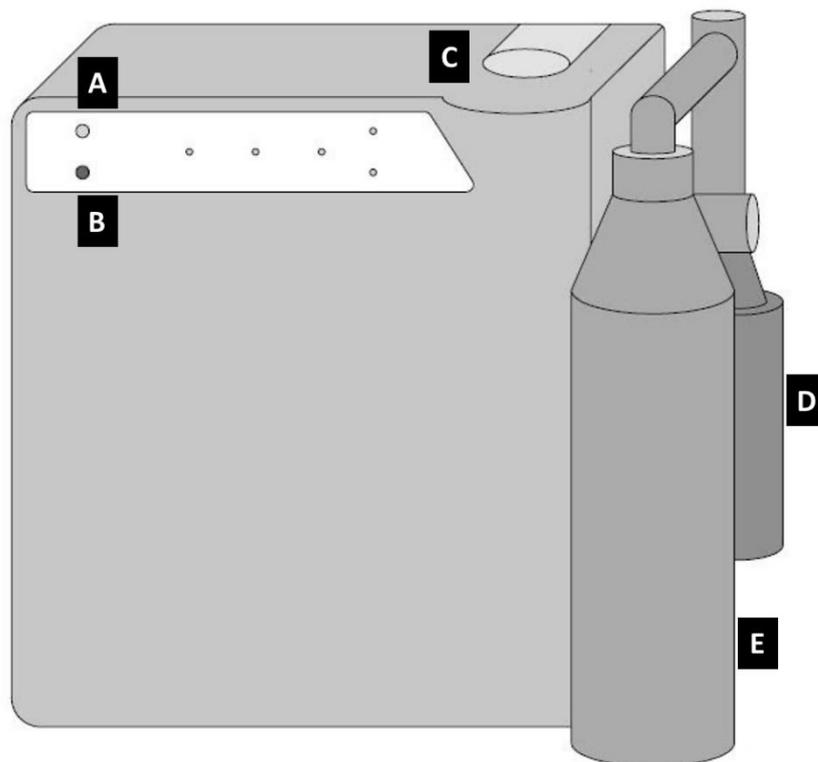


Table 1: Mean (standard deviation) of bacterial reduction (%) and viable cells (%) after treatment with tested irrigants.

Group	Bacterial reduction (%)	Viable cells (%)
1. DW	12.03 (4.37) ^a	97.19 (1.12) ^a
2. CHX 2%	99.65 (0.38) ^b	39.96 (0.23) ^b
3. NaOCl 2.5%	100.00 (0.00) ^b	35.16 (0.26) ^c
4. HClO 250 ppm	97.93 (2.01) ^b	65.23 (1.89) ^d
5. HClO 500 ppm	98.22 (1.99) ^b	41.73 (1.13) ^e

* Different small letters, in the column, indicate significant differences between groups ($p < 0.05$).

** DW, distilled water; CHX, chlorhexidine; NaOCl, sodium hypochlorite; HClO, hypochlorous acid.