

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
Faculdade de Odontologia
Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso (TCC)

Avaliação da citotoxicidade de solução de ácido hipocloroso obtida a partir de dispositivo eletrolítico – estudo *in vitro*

Relatório Final

Apresentado à Faculdade de Odontologia da Universidade de Passo Fundo, como requisito da disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso e para graduação no curso de Odontologia da Universidade de Passo Fundo.

Aluna – Eduarda Rizzon Ferreira

Orientador – Prof. Dr. Matheus Albino Souza

Passo Fundo, Abril de 2023

Sumário

1. TÍTULO	3
2. EQUIPE EXECUTORA	3
2.1. Aluno	3
2.2. Orientador	3
3. RESUMO	3
4. PROBLEMA DE PESQUISA	4
5. JUSTIFICATIVA	5
6. REVISÃO DE LITERATURA	5
7. OBJETIVOS	12
7.1. Objetivos gerais	12
7.2. Objetivos específicos	12
8. MATERIAIS E MÉTODOS	12
9. RESULTADOS	16
10. DISCUSSÃO	16
11. CONCLUSÃO	19
12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19

RELATÓRIO FINAL

1. TÍTULO

Avaliação da citotoxicidade de solução de ácido hipocloroso obtida a partir de dispositivo eletrolítico – estudo *in vitro*.

2. EQUIPE EXECUTORA

2.1. Aluna: Eduarda Rizzon Ferreira

2.2. Orientador: Matheus Albino Souza

2.3. Co-orientadora: Gabriele Nichetti Vanin

3. RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar, *in vitro*, a citotoxicidade de solução de ácido hipocloroso obtido a partir de dispositivo eletrolítico, na concentração de 250 ppm, em comparação com hipoclorito de sódio na concentração de 2,5%. O teste de citotoxicidade foi realizado por meio do ensaio MTT, que corresponde a um teste colorimétrico utilizado para avaliar a viabilidade celular. Os grupos utilizados para realização do presente estudo foram: G1 – água destilada (controle); G2 – hipoclorito de sódio 2,5% (NaOCl 2,5%) e G3 – ácido hipocloroso 250ppm (HClO 250 ppm). Após preparo do meio de cultura celular, 100 uL dos mesmos grupos de tratamento já citados foram adicionados individualmente aos poços contendo o meio, sendo incubados no período de tempo de 3 minutos. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e as porcentagens de viabilidade celular foram calculadas em relação aos controles celulares. A citotoxicidade foi analisada pelo teste de one-way ANOVA seguido por post-hoc de Tukey ($\alpha=0,05$). Os resultados do teste de citotoxicidade revelaram que todas as substâncias químicas testadas foram diferentes estatisticamente quando comparadas ao grupo controle. No entanto, o grupo G3 se mostrou menos citotóxico que o grupo G2. Pode-se concluir que o ácido hipocloroso apresentou-se menos citotóxico quando comparado ao hipoclorito de sódio, além de ser tão efetivo quanto na redução bacteriana.

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

4. PROBLEMA DE PESQUISA

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

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

Diante dos problemas expostos, torna-se necessária a busca de alternativas no que diz respeito a substâncias químicas e recursos auxiliares de descontaminação, que promovam uma adequada neutralização de microorganismos do sistema de canais radiculares, ao mesmo tempo em que alterações estruturais da dentina não sejam promovidas.

5. JUSTIFICATIVA

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). Seu uso na odontologia passou a ser pesquisado recentemente, pois o HOCl é responsável pela ação desinfetante de soluções de cloro (FAIR *et al.*, 1948) e possui estabilidade química ao armazenamento se manuseado de maneira adequada, sendo um irrigante antibacteriano durável no uso clínico diário (CHEN; CHEN; DING, 2016). Além disso, se mostrou eficaz na limpeza de superfícies de implantes contaminadas por biofilme, possui potencial para ser um antisséptico utilizado no tratamento de periimplantite (CHEN; CHEN; DING, 2016) e pode 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 ele pode ser utilizado como uma solução de irrigação endodôntica (ROSSI-FEDELE; STEIER; FIGUEIREDO, 2011). O ácido hipocloroso é um desinfetante eficaz que pode representar uma alternativa ao uso hipoclorito de sódio (CHEN *et al.*, 2019). Este ácido é obtido através de um dispositivo eletrolítico (Dentaqua®), que transforma o hipoclorito de sódio em ácido hipocloroso, porém ainda não existem estudos sobre o uso deste equipamento na odontologia. Diante do exposto, torna-se justificável a realização do presente estudo no intuito de elucidar o real potencial desta solução em canais radiculares.

6. REVISÃO DE LITERATURA

6.1 Hipoclorito de sódio

MARINS *et al.*, em 2012, avaliaram, *in vitro*, a capacidade de alguns irrigantes de canal radicular induzirem dano genético e/ou morte celular. Fibroblastos foram expostos ao ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), hipoclorito de sódio (NaOCl), MTAD e ácido cítrico em concentrações crescentes por 3h a 37°C. O grupo de controle negativo foi tratado com controle de veículo (solução tampão de fosfato - PBS) por 3h a 37°C, e o grupo de controle positivo foi tratado com metilmetanossulfonato, 1 µM. por 3h a 37°C. A citotoxicidade foi avaliada pelo teste do azul de tripano e a genotoxicidade

pelo ensaio de gel de célula única (cometa). Os resultados mostraram que a exposição a 2,5% e 5% de NaOCl e 8,5% de ácido cítrico resultou em um efeito citotóxico significativo. Hipoclorito de sódio, EDTA e o ácido cítrico não produziram efeitos genotóxicos em relação aos dados do ensaio do cometa para todas as concentrações avaliadas. Embora o MTAD não tenha sido um agente citotóxico, apresentou efeitos genotóxicos significativos em todas as concentrações testadas (ANOVA e teste de Tukey; $p < 0,05$). O NaOCl, o EDTA e o ácido cítrico foram considerados citotóxicos de maneira dose-dependente, mas não foram genotóxicos. O MTAD não causou morte celular, mas apresentou efeitos genotóxicos.

MOLLASHAH *et al.*, em 2016, avaliaram o efeito de algumas soluções irrigantes nas células-tronco da papila apical humana (SCAP) após diferentes períodos de exposição. As células-tronco foram isoladas de terceiros molares inferiores impactados imaturos, transferidas para 24 placas, divididos aleatoriamente em 6 grupos experimentais e expostos a BioPure MTAD Cleanser, QMix, EDTA 17%, clorexidina 2% (CHX), hipoclorito de sódio 5,25 % (NaOCl), solução salina estéril e grupo controle. Foi avaliada a citotoxicidade dessas soluções após 1, 5 e 15 min de exposição usando o ensaio de metiltiazol tetrazólio (MTT). A porcentagem média de células viáveis em todos os grupos experimentais foi significativamente diferente dos grupos controle e solução salina estéril em todos os momentos ($P < 0,0001$). A porcentagem média de células viáveis diminuiu significativamente ao longo do tempo nos grupos NaOCl, QMix, EDTA e MTAD, mas nenhuma redução significativa foi observada no grupo CHX. Em todos os pontos de tempo, a maior e a menor citotoxicidade foram observadas nos grupos MTAD e solução salina respectivamente. A citotoxicidade dos materiais em estudo, do mais alto ao mais baixo, foi a seguinte: MTAD > EDTA > QMix = NaOCl > CHX > solução salina estéril. Clorexidina apresentou menor citotoxicidade se comparada com EDTA, MTAD, QMix e NaOCl e sua citotoxicidade não mostrou alterações com o tempo em comparação com outras soluções.

VOUZARA *et al.*, em 2016, avaliaram a capacidade de irrigantes do 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 hipoclorito de sódio (NaOCl), ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), clorexidina

(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 24 h de exposição por meio do ensaio sulforhodamina B, em referência aos controles. Curvas de dose-resposta foram traçadas, e 50% das doses inibitórias (IC50) foram submetidas à análise estatística. Os irrigantes testados foram citotóxicos de maneira dependente da dose e do tempo. 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, investigaram a estabilidade do PCA (para-cloroanilina) na presença de NaOCl e examinaram os efeitos citotóxicos, *in vitro*, das misturas de reação CHX/NaOCl. Volumes distintos de NaOCl foram adicionados a CHX (mix 1) ou PCA (mix 2). Após a centrifugação, o sobrenadante e as frações do precipitado coletadas das amostras foram analisadas 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. A análise por cromatografia líquida de alto desempenho não mostrou nenhum sinal de PCA quando NaOCl foi misturado com CHX (mix 1). Na mistura 2, a intensidade do PCA foi diminuída quando NaOCl foi adicionado ao PCA, e sinais cromatográficos, semelhantes ao de CHX/NaOCl, também foram observados. A mortalidade de precipitados exercida em ambas as linhas celulares foi menor em comparação com a dos sobrenadantes. A mistura de CHX/NaOCl exibe uma gama abundante de efeitos citotóxicos.

KARKEHABADI *et al.*, em 2018, avaliaram as potenciais implicações toxicológicas do NaOCl, EDTA, MTAD, CHX e QMix nos tecidos periapical e periodontal. Foi avaliada a citotoxicidade das soluções em cultura de ligamento periodontal humano (hPDL) que foram cuidadosamente removidos do terço médio das raízes dos pré-molares. A citotoxicidade dos materiais foi avaliada após 1, 5 e 15 min de exposição usando o ensaio Mosmann's Tetrazolium Toxicity (MTT). A densidade óptica da solução foi lida no comprimento de onda de 540-690 nm. A intensidade da cor gerada correlacionou-se com a porcentagem de células viáveis. Os dados foram analisados estatisticamente usando ANOVA de medidas repetidas seguida do teste de Bonferroni. A porcentagem média de células viáveis diminuiu significativamente ao longo do tempo nos grupos MTAD e NaOCl. A menor e a maior citotoxicidade

pertenceram, respectivamente, aos grupos MTAD e EDTA, em todos os momentos ($P < 0,05$). MTAD teve a menor citotoxicidade em comparação com NaOCl, CHX, QMix e EDTA. Esses impactos têm sido dependentes do tempo. Esses fluidos de irrigação podem causar efeitos desfavoráveis nos tecidos vitais.

BALLAL *et al.*, em 2019, testaram se a incorporação de um pó quelante, etidronato, comercializado para irrigação de canal radicular (Dual Rinse HEDP) em uma solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) induziu efeitos citotóxicos e genotóxicos adicionais não observados com o NaOCl sozinho. Foi avaliado misturas frescas e com 24 h de 0,9 g de etidronato em 10 mL de NaOCl a 2,5% quanto às suas características químicas básicas, incluindo pH e capacidade de quelar Ca da hidroxilapatita. NaOCl puro e solução salina tamponada com fosfato (PBS) sem/com etidronato serviram como soluções de controle. Os efeitos citotóxicos e genotóxicos de soluções diluídas (1:10, 1:100 e 1:1000) foram avaliados em fibroblastos de pulmão de hamster chinês (V79) usando os ensaios MTT, clonogênico e de micronúcleo, respectivamente. A ANOVA de uma via e o teste HSD de Tukey foram aplicados com um erro do tipo alfa de 5% ($P < 0,05$). Em misturas de NaOCl e etidronato, o cloro livre disponível foi perdido completamente após 24 h, e o pH caiu mais de 3 unidades. Contudo, a capacidade do etidronato de quelar Ca foi mantida. As misturas frescas de NaOCl e etidronato não foram mais tóxicas do que o NaOCl sozinho ($P > 0,05$), enquanto as misturas de 24 horas foram menos tóxicas ($P < 0,05$) e estatisticamente semelhantes ao etidronato puro. O etidronato mostrou pouca citotoxicidade e nenhuma genotoxicidade nas diluições testadas. A capacidade do etidronato usado, Dual Rinse HEDP, de quelar cálcio não é afetada pelo NaOCl. A citotoxicidade e a genotoxicidade de soluções misturadas são ditadas pela presença de cloro livre disponível nas mesmas.

6.2 Ácido hipocloroso

WANG *et al.*, em 2007, descreveram a produção química, estabilização e atividade biológica de uma formulação de HOCl 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.

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 (*Escherichia coli* e *Porphyromonas gingivalis*) e Gram-positivos (*Enterococcus faecalis* e *Streptococcus sanguinis*). O efeito do volume de irrigação e do tempo de exposição na eficácia antimicrobiana do HOCl foi avaliado e uma análise de durabilidade foi concluída. Coloração viva/morta, observação da 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. Os resultados indicaram que o HOCl exibiu melhor eficácia antibacteriana com o aumento dos volumes de irrigação. HOCl 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 por 1 ou 2 dias. Todos os irrigantes mostraram atividade antibacteriana e mataram a maioria das bactérias nas superfícies de liga de titânio de implantes contaminados com biofilme. HOCl também reduziu significativamente a concentração de LPS de *P. gingivalis* quando comparado com NaOCl e CHX. Assim, o anti-séptico HOCl pode ser eficaz para limpar superfícies de implantes contaminadas por biofilme.

SHAJAHAN *et al.*, em 2017, examinaram a substantividade de um novo desinfetante à base de ácido hipocloroso contra a formação de biofilme nas linhas de água da unidade odontológica. Vinte unidades odontológicas foram selecionadas para o estudo e divididas em dois grupos: Grupo A (linhas de água das unidades odontológicas tratadas com o desinfetante) e Grupo B (linhas de água das unidades não tratadas). A

formação do biofilme foi monitorada em ambos os grupos removendo a linha d'água de uma unidade dentária de cada grupo pelo período de 10 dias. Uma polegada do tubo da linha de água da unidade dentária foi cortada em local aleatório, e o lúmen interno das seções de corte foi analisado usando o microscópio eletrônico de varredura. No exame, as imagens de MEV mostraram que não havia nenhuma camada de limo ou células bacterianas vistas na seção de corte por um período de 7 dias nas linhas de água dentais tratadas, o que significa que não há evidência de formação de biofilme. Na seção de corte de linha d'água da unidade dentária não tratada, a camada de limo foi observada desde o dia 1. A solução desinfetante mostrou-se eficaz por 7 dias contra a formação de biofilme. Essa técnica pode ser usada como um método válido para desinfecção de linhas d'água de unidades odontológicas.

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

SEVERING *et al.*, em 2018, determinaram a eficácia antimicrobiana e citotoxicidade de seis soluções de irrigação de feridas com hipoclorito de sódio (NaOCl) e ácido hipocloroso (HOCl). Para avaliação da citotoxicidade foram utilizados

queratinócitos humanos e fibroblastos de pele humana. *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* foram usados para avaliação da eficácia antimicrobiana. As soluções foram avaliadas após 1, 5 e 15 min de exposição. Além disso, as propriedades físico-químicas (valores de pH e potencial de oxidação-redução) foram investigadas. A eficácia e citotoxicidade variaram substancialmente entre as soluções. Frequentemente, 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 NaOCl/HOCl e tempos de exposição prolongados. Com base nessas avaliações *in vitro*, a seguinte classificação (menor para maior efeito microbicida e impacto citotóxico) foi encontrada: 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 geralmente estão associados a certos efeitos colaterais negativos na proliferação celular. A eficácia e biocompatibilidade das soluções de NaOCl/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 (sobrevida, 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.

7. OBJETIVOS

7.1. Objetivos gerais

Avaliar, *in vitro*, a citotoxicidade de solução de ácido hipocloroso obtida a partir de dispositivo eletrolítico, em comparação com o hipoclorito de sódio.

7.2. Objetivos específicos

Avaliar, *in vitro*, a citotoxicidade de solução de ácido hipocloroso obtido a partir de dispositivo eletrolítico, na concentração de 250 ppm, em comparação com o hipoclorito de sódio 2,5%, por meio de ensaio MTT com células de fibroblastos.

8. MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi submetido à apreciação e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Passo Fundo, sendo aprovado sob o nº 5.783.928.

8.1 Dentaqua

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



Figura 1: Equipamento Dentaqua®



Figura 2: Solução Salina manipulada - brine

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

8.2 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.

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



Figura 1: Placa de 96 poços para distribuição das células

8.4 Exposição as substâncias químicas

Após a incubação durante 24 horas a 37°C em estufa com 5% de CO_2 , foi realizada a observação da confluência do tapete celular através da visualização em microscópio invertido (figura 2). A seguir, o meio DMEM foi retirado por aspiração e 100 μL das seguintes soluções foram adicionadas e incubadas no período de 3 minutos:

- G1 – água destilada (controle);
- G2 – hipoclorito de sódio 2,5% (NaOCl 2,5%);
- G3 – ácido hipocloroso 250ppm (HClO 250 ppm).



Figura 2: Microscópio invertido

8.5 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 3). 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 4). 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 3: Adição de 50ml de solução de MTT

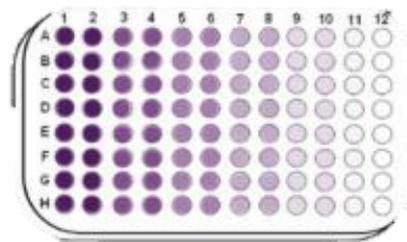


Figura 4: Adição de 100ml de solução de DMSO

8.6 Análise estatística

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

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

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

9. RESULTADOS

A média e o desvio padrão para a porcentagem de células viáveis após o tratamento com as substâncias químicas testadas estão descritos na tabela 1.

Os resultados do teste de citotoxicidade revelaram que todas as substâncias químicas testadas foram diferentes estatisticamente quando comparadas ao grupo controle ($p < 0,05$). No entanto, o grupo G3 mostrou-se menos citotóxico que o grupo G2, havendo diferença estatisticamente significativa entre estes dois grupos ($p < 0,05$).

Tabela 1: média e desvio padrão (\pm) para a porcentagem de células viáveis (%) após o tratamento com as substâncias químicas testadas.

Grupo	Células viáveis (%)
1.DW	98.88 (1.12) ^a
2. NaOCl 2,5%	35.66 (0.43) ^b
3. HClO 250ppm	49.06 (1.99) ^c

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

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

10. DISCUSSÃO

O tratamento endodôntico tem como principal objetivo a desinfecção do sistema de canais radiculares. Para que isso ocorra, além da instrumentação dos canais faz-se necessário o uso de substâncias químicas auxiliares que atuem sobre os microrganismos responsáveis pelo desenvolvimento e perpetuação das doenças pulpares e periapicais (MOHAMMADI, 2008). Um bom preparo mecânico, por si só, não garante o sucesso do tratamento endodôntico. Tecido pulpar residual, bactérias e restos de dentina podem persistir nas irregularidades dos sistemas de canais radiculares.

Para evitar que isso ocorra, várias soluções irrigantes são recomendadas para a utilização em combinação com o uso de instrumentos manuais ou mecanizados para o preparo do canal. No entanto, a eficácia desses procedimentos depende também da vulnerabilidade das espécies envolvidas. Bactérias facultativas, como *Enterococcus faecalis*, que é considerada uma das espécies mais resistentes da cavidade oral e está

constantemente presente como causa do insucesso de tratamentos endodônticos (GOMES *et al.*, 2001).

Para DIOGUARDI *et al.*, em 2018 as substâncias químicas auxiliares devem obter características essenciais, como a promoção de lubrificação dos instrumentos endodônticos e limpeza do sistema de canais radiculares, dissolução de substâncias orgânicas e inorgânicas, ação antimicrobiana, ausência de citotoxicidade e ineficácia na alteração da microestrutura dentária. O hipoclorito de sódio (NaOCl) é a solução mais utilizada para irrigar os canais radiculares durante a terapia endodôntica e tem sido usado em diferentes concentrações (GONÇALVES *et al.*, 2016). Como vantagens associadas ao seu uso, apresenta ação antimicrobiana de amplo espectro, além de dissolver tecido orgânico. Por outro lado, é altamente citotóxico em altas concentrações e tende a induzir irritação tecidual ao contato, representando algumas desvantagens (MOHAMMADI, 2008). Considerando os efeitos citotóxicos dos irrigantes atuais, novos irrigantes devem ser investigados para o uso na endodontia.

O presente estudo se propôs a pesquisar sobre a citotoxicidade de diferentes substâncias químicas auxiliares utilizadas durante o tratamento endodôntico. Uma delas, conhecida como ácido hipocloroso, obtida através de um dispositivo eletrolítico chamado Dentaqua®. Outra, mais conhecida e bastante utilizada, hipoclorito de sódio, na concentração de 2,5%. O ensaio MTT é um dos métodos mais utilizados na literatura para avaliar a citotoxicidade, incluindo soluções irrigantes (CHAVEZ-ANDRADE *et al.*, 2017). Este método colorimétrico é simples, reproduzível, rápido, preciso e, avalia a citotoxicidade de materiais dentários com base nas mudanças nos números de células viáveis, metabolismo celular e morfologia celular (MOLLASHAHY *et al.*, 2016). Para avaliar a viabilidade celular foram selecionados fibroblastos derivados da linha celular de camundongo L929 devido à sua adequação para este tipo de experimento (BARBOSA *et al.*, 2009).

O tempo estabelecido para testar a citotoxicidade é uma variável questionável na literatura, mas sabe-se que os irrigantes possuem sua citotoxicidade relacionada diretamente com o tempo e a dose empregada (VOUZARA *et al.*, 2016). Neste estudo, o tempo empregado foi de 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 o maior dano foi ocasionado pela solução de hipoclorito de sódio. Apesar do NaOCl ser o irrigante mais comumente

usado na endodontia, além de ser considerado o padrão-ouro devido às suas capacidades antibacterianas e de dissolução de tecidos, uma vez que ele é citotóxico para os tecidos periapicais, sua extrusão pode causar uma reação inflamatória, que leva a dano tecidual e sintomatologia pronunciada. Com isso, estudos revelam que seu uso deve ser associado com cautela devido aos efeitos prejudiciais relacionados a citotoxicidade (CAI *et al.*, 2023).

O ácido hipocloroso apresentou os menores índices de citotoxicidade. O estudo de WANG *et al.*, em 2007, descreveu a produção química, estabilização e atividade biológica de uma formulação de HOCl e, segundo os autores, quando comparada aos desinfetantes peróxido de hidrogênio e hipoclorito de sódio esta substância melhorou a atividade antimicrobiana e o índice terapêutico, concluindo que por apresentar ação antimicrobiana e não ter toxicidade o HOCl tem potencial para aplicações farmacêuticas no controle de infecções. Por fim, um estudo desenvolvido por BALL *et al.*, em 2021 utilizando HOCl e NaOCl para lavagem intracavitária, mostrou que ambas as soluções possuem ação antimicrobiana semelhantes, porém NaOCl foi extremamente citotóxico. Estes estudos vêm ao encontro dos resultados da presente pesquisa.

A estabilidade dos irrigantes é um parâmetro essencial na avaliação da eficácia antimicrobiana. Um estudo realizado por GOW *et al.*, em 2022 afirma que as condições ideais de armazenamento para maximizar a estabilidade da solução de hipoclorito de sódio incluiriam a manutenção da solução em um pH de 9 a 11, em temperaturas abaixo de 30°C e em um frasco opaco com pouca ou nenhuma luz ambiente. Em contrapartida, um estudo desenvolvido por CHEN *et al.*, em 2016, avaliaram a estabilidade do ácido hipocloroso. O irrigante foi aberto e deixado em contato com o ar em temperatura ambiente por 1 ou 2 dias. O HOCl mostrou uma perda de eficácia antimicrobiana dependente do tempo quando deixado em contato direto com o ar. Essas informações vem ao encontro do presente estudo, pois através do dispositivo eletrolítico Dentaqua®, é possível produzir a substância antes do seu uso e assim, garantir sua estabilidade e melhor eficácia antimicrobiana. Por outro lado, esse dispositivo é importado e de alto custo, o que pode inviabilizar seu uso.

Diante do exposto, os resultados deste estudo foram satisfatórios pois o ácido hipocloroso mostrou-se menos citotóxico que o hipoclorito de sódio, apresentando maior viabilidade de células testadas. Ressalta-se a importância clínica deste estudo, devido à necessidade atual de buscar novas alternativas de substâncias químicas que possam ser utilizadas na terapia endodôntica com melhores propriedades. Desta forma,

a substância testada mostra-se atraente para o uso clínico, porém mais estudos devem ser realizados sobre esta e outras propriedades.

11. CONCLUSÃO

Diante das limitações do presente estudo, pode-se concluir que o ácido hipocloroso, produzido no dispositivo eletrolítico Dentaqua®, apresentou-se menos citotóxico quando comparado ao hipoclorito de sódio.

12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASLANTAS, E.E.; BUZOGLU, H. D.; ALTUNDASAR, E.; SERPER, A. Effect of EDTA, Sodium Hypochlorite, and Chlorhexidine Gluconate with or without Surface Modifiers on Dentin Microhardness. *Journal of Endodontics*, v. 40, n. 6, p. 876–879, 2014.

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.

BALLAL, N.V.; DAS, S.; RAO, B.S.S.; ZEHNDER, M.; MOHN, D. Chemical, cytotoxic and genotoxic analysis of etidronate in sodium hypochlorite solution. *International Endodontic Journal*, v. 52, n.2, p. 1228-1234, 2019.

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

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

CHÁVEZ-ANDRADE, G.M; TANOMARU-FILHO, M.; RODRIGUES, E. M; GOMES-CORNÉLIO, A. L; FARIA, G; BERNARDI, M. I. B; GUERREIRO-TANOMARU, J.M. Cytotoxicity, genotoxicity and antibacterial activity of poly(vinyl

alcohol)-coated silver nanoparticles and farnesol as irrigating solutions. *Archives of oral biology*, v. 84, p. 89–93, 2017.

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

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

DIOGUARDI, M.; DI GIOIA, G.; ILLUZZI, G.; LANEVE, E.; COCO, A.; TROIANO, G. Endodontic irrigants: different methods to improve efficacy and related problems. *European Journal of Dentistry*, v. 12, n. 3, p. 459-466, 2018.

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

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

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

GOMES, B.P.F.A.; FERRAZ, C.C.R.; VIANNA, M.E.; BARBER, V.B.; TEIXEIRA, F.B.; SOUZA-FILHO, F.J. In vitro antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. *International Endodontic Journal*, v. 34, n. 6, p. 424-428, 2001.

GONÇALVES, L.S.; RODRIGUES, R. C. V.; JUNIOR, C. V. A.; VETTORE, M. V. The effect of sodium hypochlorite and chlorhexidine as irrigant solutions for root canal disinfection: a systematic review of clinical trials. *Journal of Endodontics*, v. 42, n. 4, p. 527-532, 2016.

GOW, C. K.; WEINHOUSE, C.; JOHNSON, G. O.; SAUNDERS, K. Stability of free available chlorine levels in dilute sodium hypochlorite solutions over a 6-week period. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, v. 61, n. 2, p. 181-187, 2022.

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

KARKEHABADI, H.; YOUSEFIFAKHR, H.; ZADSIRJAN, S. Cytotoxicity of Endodontic Irrigants on Human Periodontal Ligament Cells. *Iranian Endodontic Journal*, [S.L.], v. 13, n. 3, 10 jul. 2018.

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

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

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

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

786–793, 2007.

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

MOHAMMADI, Z. Sodium hypochlorite in endodontics: an updated review. *International Dental Journal*, v.58, p. 329-341, 2008.

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

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

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

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

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

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

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

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. *Journal Of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 74, n. 2, p. 365-372, 2018.

SHAJAHAN, I.; KANDASWAMY, D.; LAKSHMINARAYANAN, L.; SELVARAJAN, R. Substantivity of hypochlorous acid-based disinfectant against biofilm formation in the dental unit waterlines. *Journal Of Conservative Dentistry*, v. 20, n. 1, 2017.

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

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

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

**Avaliação da citotoxicidade de solução de ácido hipocloroso obtida a partir de
dispositivo eletrolítico – estudo *in vitro***

**Cytotoxicity evaluation of hypochlorous acid solution obtained from electrolytic
device – *in vitro study***

Eduarda Rizzon Ferreira: Graduanda em Odontologia, Faculdade de Odontologia,
Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS, Brasil.

Matheus Albino Souza: Professor titular, Departamento de Endodontia, Faculdade de
Odontologia, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS, Brasil.

**Autor de Correspondência:
Eduarda Rizzon Ferreira
Rua Estrada do Trigo, 1095, Passo Fundo – RS.**

RESUMO

Objetivo: avaliar, *in vitro*, a citotoxicidade de solução de ácido hipocloroso obtido a partir de dispositivo eletrolítico, na concentração de 250 ppm, em comparação com hipoclorito de sódio na concentração de 2,5%. Métodos: o teste de citotoxicidade foi realizado por meio do ensaio MTT, que corresponde a um teste colorimétrico utilizado para avaliar a viabilidade celular. Os grupos utilizados para realização do presente estudo foram: G1 – água destilada (controle); G2 – hipoclorito de sódio 2,5% (NaOCl 2,5%) e G3 – ácido hipocloroso 250ppm (HClO 250 ppm). Após preparo do meio de cultura celular, 100 uL dos mesmos grupos de tratamento já citados foram adicionados individualmente aos poços contendo o meio, sendo incubados no período de tempo de 3 minutos. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e as porcentagens de viabilidade celular foram calculadas em relação aos controles celulares. A citotoxicidade foi analisada pelo teste de one-way ANOVA seguido por post-hoc de Tukey ($\alpha=0,05$). Resultados: todas as substâncias químicas testadas foram diferentes estatisticamente quando comparadas ao grupo controle. No entanto, o grupo G3 se mostrou menos citotóxico que o grupo G2. Conclusão: o ácido hipocloroso apresentou-se menos citotóxico quando comparado ao hipoclorito de sódio, além de ser tão efetivo quanto na redução bacteriana.

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

ABSTRACT

Objective: to evaluate, *in vitro*, the cytotoxicity of a hypochlorous acid solution obtained from an electrolytic device, at a concentration of 250 ppm, in comparison with sodium hypochlorite at a concentration of 2.5%. Methods: the cytotoxicity test was

performed using the MTT assay, which corresponds to a colorimetric test used to assess cell viability. The groups used to carry out this study were: G1 – distilled water (control); G2 – 2.5% sodium hypochlorite (2.5% NaOCl) and G3 – 250ppm hypochlorous acid (250 ppm HClO). 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 were calculated relative to cell controls. Cytotoxicity was analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test ($\alpha=0.05$). Results: all chemical substances tested were statistically different when compared to the control group. However, the G3 group was less cytotoxic than the G2 group. Conclusion: hypochlorous acid was less cytotoxic when compared to sodium hypochlorite, in addition to being as effective as bacterial reduction.

Keywords: cytotoxicity, hypochlorous acid, sodium hypochlorite.

INTRODUÇÃO

Os microorganismos desempenham um papel fundamental na indução e, principalmente, na perpetuação das alterações patológicas que acometem a polpa e os tecidos periapicais¹. Sendo assim, o uso de substâncias químicas e recursos auxiliares se torna necessário, pois visa contribuir no processo de descontaminação do sistema de canais radiculares.

O hipoclorito de sódio (NaOCl) é a solução irrigante mais utilizada na endodontia para a realização do preparo químico-mecânico. Esta substância apresenta atividade antimicrobiana de amplo espectro² e capacidade de promover a dissolução da matéria orgânica³. Porém, é citotóxico quando utilizado em elevadas concentrações⁴, instável

quimicamente⁵ e interfere negativamente na adesão do material restaurador à dentina⁶. Também tem sido demonstrado que o NaOCl promove desintegração do colágeno dentinário⁷, reduz a resistência flexural e o módulo de elasticidade da dentina⁸, e promove alterações na microdureza da estrutura dentinária⁹, podendo trazer como consequência uma redução da resistência à fratura do elemento dentário após a realização do tratamento endodôntico.

O ácido hipocloroso é um desinfetante eficaz que pode representar uma alternativa ao uso hipoclorito de sódio¹⁰. É uma substância endógena de todos os mamíferos e é eficaz contra uma ampla gama de microrganismos¹¹, sendo gerado pelas células imunológicas do corpo para combater patógenos invasores e infecções¹². Não é uma substância irritante e não sensibiliza células devido à sua baixa citotoxicidade quando comparado com NaOCl¹¹. Este ácido é obtido através de um dispositivo eletrolítico (Dentaqua®), que transforma o hipoclorito de sódio em ácido hipocloroso, porém ainda não existem estudos sobre o uso deste equipamento na odontologia.

Diante do exposto, o presente estudo tem como objetivo geral avaliar, *in vitro*, a citotoxicidade de solução de ácido hipocloroso obtida a partir de dispositivo eletrolítico, em comparação com o hipoclorito de sódio. O objetivo específico consiste em avaliar, *in vitro*, a citotoxicidade de solução de ácido hipocloroso obtida a partir de dispositivo eletrolítico, na concentração de 250 ppm, em comparação com o hipoclorito de sódio 2,5%, por meio de ensaio MTT com células de fibroblastos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi submetido à apreciação e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Passo Fundo, sendo aprovado sob o nº 5.783.928.

Dentaqua

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



Figura 1: Equipamento Dentaqua®

O Dentaqua® foi conectado à tomada, e então preencheu-se o tanque com água até o recobrimento completo do seu último sensor. O compartimento da solução brine também foi preenchido completamente. Em seguida o botão “Water Bottle” foi acionado por 3 segundos para iniciar um ciclo, ao fim da produção a substância produzida foi descartada. Foi conferido se o último sensor ainda estava coberto com água, e caso não estivesse seria preenchido com mais até recobri-lo. Então foi acionado o botão “Ecasol” por 2 segundos, dando início à produção do ácido hipocloroso. A produção durou em torno de 10 a 12 minutos, preenchendo de pouco em pouco a garrafa, quando houve um último depósito de maior tempo e volume; neste momento o ciclo encerrou-se, preenchendo metade da garrafa de ácido hipocloroso. A solução produzida (250ppm) foi inserida em um frasco becker para saber a quantidade exata da

produção em ml. Após foi transferida para um frasco devidamente identificado (solução 250ppm) e em seguida iniciou-se a produção da outra metade da garrafa. . O tanque foi preenchido com água novamente até cobrir o último sensor, e, neste momento, pressionou-se, novamente, “Ecasol” por 2 segundos, para produzir mais metade da garrafa. Procedeu-se dessa maneira até completar quatro litros de ácido hipocloroso 250ppm. Um litro de 250ppm foi dividido em dois frascos de 500 ml, destinando um frasco para o teste de ação antimicrobiana e 1 frasco para o teste de citotoxicidade e os três litros restantes foram usados na produção da solução de 500ppm.

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.

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

Exposição as substâncias químicas

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

G1 – água destilada (controle);

G2 – hipoclorito de sódio 2,5% (NaOCl 2,5%);

G3 – ácido hipocloroso 250ppm (HClO 250 ppm).

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. 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. 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.

Análise estatística

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

% de viabilidade = (absorbância da amostra - média da absorbância do branco) x100

(absorbância do controle - média da absorbância do branco)

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

RESULTADOS

A média e o desvio padrão para a porcentagem de células viáveis após o tratamento com as substâncias químicas testadas estão descritos na tabela 1.

Os resultados do teste de citotoxicidade revelaram que todas as substâncias químicas testadas foram diferentes estatisticamente quando comparadas ao grupo controle ($p<0,05$). No entanto, o grupo G3 mostrou-se menos citotóxico que o grupo G2, havendo diferença estatisticamente significativa entre estes dois grupos ($p<0,05$).

Tabela 1: média e desvio padrão (\pm) para a porcentagem de células viáveis (%) após o tratamento com as substâncias químicas testadas.

Grupo	Células viáveis (%)
1.DW	98.88 (1.12) ^a
2. NaOCl 2,5%	35.66 (0.43) ^b
3. HClO 250ppm	49.06 (1.99) ^c

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

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

DISCUSSÃO

O tratamento endodôntico tem como principal objetivo a desinfecção do sistema de canais radiculares. Para que isso ocorra, além da instrumentação dos canais faz-se necessário o uso de substâncias químicas auxiliares que atuem sobre os microrganismos responsáveis pelo desenvolvimento e perpetuação das doenças pulpares e periapicais¹³. Um bom preparo mecânico, por si só, não garante o sucesso do tratamento endodôntico. Tecido pulpar residual, bactérias e restos de dentina podem persistir nas irregularidades dos sistemas de canais radiculares.

Para evitar que isso ocorra, várias soluções irrigantes são recomendadas para a utilização em combinação com o uso de instrumentos manuais ou mecanizados para o preparo do canal. No entanto, a eficácia desses procedimentos depende também da vulnerabilidade das espécies envolvidas. Bactérias facultativas, como *Enterococcus faecalis*, que é considerada uma das espécies mais resistentes da cavidade oral e está constantemente presente como causa do insucesso de tratamentos endodônticos¹⁴.

As substâncias químicas auxiliares devem obter características essenciais, como a promoção de lubrificação dos instrumentos endodônticos e limpeza do sistema de canais radiculares, dissolução de substâncias orgânicas e inorgânicas, ação antimicrobiana, ausência de citotoxicidade e ineficácia na alteração da microestrutura dentária¹⁵. O hipoclorito de sódio (NaOCl) é a solução mais utilizada para irrigar os canais radiculares durante a terapia endodôntica e tem sido usado em diferentes concentrações¹⁶. Como vantagens associadas ao seu uso, apresenta ação antimicrobiana de amplo espectro, além de dissolver tecido orgânico. Por outro lado, é altamente citotóxico em altas concentrações e tende a induzir irritação tecidual ao contato, representando algumas desvantagens¹³. Considerando os efeitos citotóxicos dos irrigantes atuais, novos irrigantes devem ser investigados para o uso na endodontia.

O presente estudo se propôs a pesquisar sobre a citotoxicidade de diferentes substâncias químicas auxiliares utilizadas durante o tratamento endodôntico. Uma delas, conhecida como ácido hipocloroso, obtida através de um dispositivo eletrolítico chamado Dentaqua®. Outra, mais conhecida e bastante utilizada, hipoclorito de sódio, na concentração de 2,5%. O ensaio MTT é um dos métodos mais utilizados na literatura para avaliar a citotoxicidade, incluindo soluções irrigantes¹⁷. Este método colorimétrico é simples, reproduzível, rápido, preciso e, avalia a citotoxicidade de materiais dentários com base nas mudanças nos números de células viáveis, metabolismo celular e morfologia celular¹⁸. Para avaliar a viabilidade celular foram selecionados fibroblastos derivados da linha celular de camundongo L929 devido à sua adequação para este tipo de experimento¹⁹.

O tempo estabelecido para testar a citotoxicidade é uma variável questionável na literatura, mas sabe-se que os irrigantes possuem sua citotoxicidade relacionada diretamente com o tempo e a dose empregada²⁰. Neste estudo, o tempo empregado foi de 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 o maior dano foi ocasionado pela solução de hipoclorito de sódio. Apesar do NaOCl ser o irrigante mais comumente usado na endodontia, além de ser considerado o padrão-ouro devido às suas capacidades antibacterianas e de dissolução de tecidos, uma vez que ele é citotóxico para os tecidos periapicais, sua extrusão pode causar uma reação inflamatória, que leva a dano tecidual e sintomatologia pronunciada. Com isso, estudos revelam que seu uso deve ser associado com cautela devido aos efeitos prejudiciais relacionados a citotoxicidade²¹.

O ácido hipocloroso apresentou os menores índices de citotoxicidade. Um estudo descreveu a produção química, estabilização e atividade biológica de uma

formulação de HOCl e, segundo os autores, quando comparada aos desinfetantes peróxido de hidrogênio e hipoclorito de sódio esta substância melhorou a atividade antimicrobiana e o índice terapêutico, concluindo que por apresentar ação antimicrobiana e não ter toxicidade o HOCl tem potencial para aplicações farmacêuticas no controle de infecções¹¹. Por fim, outro estudo utilizando HOCl e NaOCl para lavagem intracavitária, mostrou que ambas as soluções possuem ação antimicrobiana semelhantes, porém NaOCl foi extremamente citotóxico²². Estes estudos vêm ao encontro dos resultados da presente pesquisa.

A estabilidade dos irrigantes é um parâmetro essencial na avaliação da eficácia antimicrobiana. Um estudo afirma que as condições ideais de armazenamento para maximizar a estabilidade da solução de hipoclorito de sódio incluiriam a manutenção da solução em um pH de 9 a 11, em temperaturas abaixo de 30°C e em um frasco opaco com pouca ou nenhuma luz ambiente²³. Em contrapartida, outro estudo avaliou a estabilidade do ácido hipocloroso²⁴. O irrigante foi aberto e deixado em contato com o ar em temperatura ambiente por 1 ou 2 dias. O HOCl mostrou uma perda de eficácia antimicrobiana dependente do tempo quando deixado em contato direto com o ar²⁴. Essas informações vem ao encontro do presente estudo, pois através do dispositivo eletrolítico Dentaqua®, é possível produzir a substância antes do seu uso e assim, garantir sua estabilidade e melhor eficácia antimicrobiana. Por outro lado, esse dispositivo é importado e de alto custo, o que pode inviabilizar seu uso.

Diante do exposto, os resultados deste estudo foram satisfatórios pois o ácido hipocloroso mostrou-se menos citotóxico que o hipoclorito de sódio, apresentando maior viabilidade de células testadas. Ressalta-se a importância clínica deste estudo, devido à necessidade atual de buscar novas alternativas de substâncias químicas que possam ser utilizadas na terapia endodôntica com melhores propriedades. Desta forma,

a substância testada mostra-se atraente para o uso clínico, porém mais estudos devem ser realizados sobre esta e outras propriedades.

CONCLUSÃO

Diante das limitações do presente estudo, pode-se concluir que o ácido hipocloroso, produzido no dispositivo eletrolítico Dentaqua®, apresentou-se menos citotóxico quando comparado ao hipoclorito de sódio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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(3):340–349.
2. 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* 2014;40(4):509–514.
3. 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 End J* 2004;37(1):38–41.
4. 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* 2012; 23(5):527-533.
5. LEONARDO, N.G.S.; CARLOTTO, I.B.; LUISI, S.B.; KOPPER, P.M.P.; GRECCA, F.S.; MONTAGNER, F. Calcium Hypochlorite Solutions: Evaluation of Surface Tension and Effect of Different Storage Conditions and

- Time Periods over pH and Available Chlorine Content. *J Endod* 2016;42(4): 641–645.
6. FARINA, A.P.; CECCHIN, D.; BARBIZAM, J.V.B.; CARLINI, B.J. Influence of endodontic irrigants on bond strength of a self-etching adhesive. *Aust Endod J* 2011;37(1):26–30.
 7. MOREIRA, D.M.; ALMEIDA, J.F.A.; FERRAZ, C.C.R.; GOMES, B.P.F.A.; LINE, S.R.P.; ZAIA, A.A. Structural Analysis of Bovine Root Dentin after Use of Different Endodontics Auxiliary Chemical Substances. *J Endod* 2009;35(7):1023–1027.
 8. 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 End J* 2007;40(10):786–793.
 9. 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* 2014;40(6):876–879.
 10. CHEN, K.K.; WU, J.H.; WEI, S.I; DU, J.K. Influence of the acidity of electrolyzed water on the microhardness of inner layer dentin. *J Dent Sci* 2019;14(4):419–425.
 11. WANG, L.; BASSIRI, M.; NAJAFI, R.; NAJAFI, K.; YANG, J.; KHOSROVI, B.; HWONG, W.; BARATI, E.; BELISLE, B.; CELERI, C., ROBSON, MC. Hypochlorous Acid as a Potential Wound Care Agent Part I . Stabilized Hypochlorous Acid : A Component of the Inorganic Armamentarium of Innate Immunity. *J Queimaduras* 2007;6:65–79.

12. LAPENNA, D.; CUCCURULLO, F. Hypochlorous Acid and its Pharmacological Antagonism: An Update Picture. *Gen Pharmacol* 1996;27(7): 1145–1147.
13. MOHAMMADI, Z. Sodium hypochlorite in endodontics: an updated review. *Int Dent J* 2008;58(6):329-341.
14. GOMES, B.P.F.A.; FERRAZ, C.C.R.; VIANNA, M.E.; BARBER, V.B.; TEIXEIRA, F.B.; SOUZA-FILHO, F.J. In vitro antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. *Int End J* 2001;34(6):424-428.
15. DIOGUARDI, M.; DI GIOIA, G.; ILLUZZI, G.; LANEVE, E.; COCO, A.; TROIANO, G. Endodontic irrigants: different methods to improve efficacy and related problems. *Eur J Dent* 2018;12(3):459-466.
16. GONÇALVES, L.S.; RODRIGUES, R. C. V.; JUNIOR, C. V. A.; VETTORE, M. V. The effect of sodium hypochlorite and chlorhexidine as irrigant solutions for root canal disinfection: a systematic review of clinical trials. *J Endod* 2016;42(4):527-532.
17. 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* 2017;84:89–93.
18. MOLLASHAHI, N.F.; SABERI, E.; KARKEHABADI, H.; Evaluation of Cytotoxic Effects of Various Endodontic Irrigation Solutions on the Survival of Stem Cell of Human Apical Papilla. *Ira Endod J* 2016;11(4):293-297.

19. BARBOSA, S.V; BARROSO, C.M; RUIZ, P.A. Cytotoxicity of endodontic irrigants containing calcium hydroxide and sodium lauryl sulphate on fibroblasts derived from mouse L929 cell line. *Braz Dent J* 2009;20(2):118–121.
20. VOUZARA, T.; KOULAOUZIDOU, E.; ZIOUTI, F.; ECONOMIDES, N. Combined and independent cytotoxicity of sodium hypochlorite, ethylenediaminetetraacetic acid and chlorhexidine. *Int End J* 2016;49(8):764–773.
21. 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* 2023;2023.
22. 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* 2021;21:1.
23. GOW, C. K.; WEINHOUSE, C.; JOHNSON, G. O.; SAUNDERS, K. Stability of free available chlorine levels in dilute sodium hypochlorite solutions over a 6-week period. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2022;61(2):181-187.
24. 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* 2016;17(7):1161.