

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

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIMICROBIANA DO ÁCIDO
HIPOCLOROSO OBTIDO A PARTIR DE DISPOSITIVO
ELETROLÍTICO EM CANAIS RADICULARES INFECTADOS
COM *ENTEROCOCCUS FAECALIS***

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.

Aluno – Felipe Gomes Dallepiane

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. Co-orientadora.....	3
2.3. Orientador.....	3
3. RESUMO.....	3
4. PROBLEMA DE PESQUISA	4
5. JUSTIFICATIVA	5
6. REVISÃO DE LITERATURA.....	5
6.1. Hipoclorito de sódio.....	5
6.2. Ácido hipocloroso	10
7. OBJETIVOS	14
7.1. Objetivos gerais	14
7.2. Objetivos específicos.....	14
8. MATERIAIS E MÉTODOS	14
8.1 Obtenção e preparo das amostras.....	14
8.2. Controle de esterilização	15
8.3. Preparo do inóculo	15
8.4. Contaminação dos canais radiculares	16
8.5. Avaliação de descontaminação dos protocolos testados.....	16
8.6. Realização das coletas e análise microbiológica	17
8.7. Análise estatística.....	17
9. RESULTADOS	18
10. DISCUSSÃO	18
11. CONCLUSÃO.....	20
12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21
13. AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DO ALUNO.....	25
14. ANEXO:	26

RELATÓRIO FINAL

1. TÍTULO

Avaliação da ação antimicrobiana do ácido hipocloroso obtido a partir de dispositivo eletrolítico em canais radiculares infectados com *Enterococcus faecalis*.

2. EQUIPE EXECUTORA

2.1. Aluno

Nome: Felipe Gomes Dallepiane

Matrícula: 182537

2.2. Co-orientadora

Nome: Mylena Lazareti Zanella

Matrícula: 160716

2.3. Orientador

Nome: Prof. Dr. Matheus Albino Souza

Matrícula: 8948

3. RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar, *in vitro*, a ação antimicrobiana do ácido hipocloroso em canais radiculares infectados contra *Enterococcus faecalis*. Trinta dentes humanos extraídos unirradiculares foram utilizados para o presente estudo. A porção coronária foi seccionada na junção amelo-cementária, de forma que a raiz remanescente apresente um comprimento de 15 mm. Em seguida, as amostras foram esterilizadas em autoclave por 30 minutos a uma temperatura de 120°C. Em seguida, as amostras foram inoculadas com 100 µl de cultura de *Enterococcus faecalis* e imersas em microtubos contendo 2 ml de BHI. As amostras foram mantidas imersas em cultura bacteriana por quatorze dias e armazenadas em estufa bacteriológica a uma temperatura de 37°C, com renovação do meio de cultura a cada 48 horas. Após o período de contaminação, as amostras foram divididas em três grupos (n=10) de acordo com o protocolo de irrigação final testado: G1: água destilada (controle); G2: hipoclorito de sódio 2,5% (NaOCl 2,5%); G3: ácido hipocloroso (Dentaqua). A contagem de unidade formadoras de colônia (UFCs) foi realizada para avaliar a eficácia de descontaminação dos tratamentos propostos. A análise estatística foi realizada através de análise de variância (ANOVA), seguido pelo

post-hoc de tukey ($\alpha=0,05$). As substâncias testadas foram efetivas na redução bacteriana, quando comparadas ao grupo controle, sem diferença estatística entre eles ($p<0,05$). Concluindo que o ácido hipocloroso produzido pelo dispositivo Dentaqua, foi efetivo na redução bacteriana.

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

4. PROBLEMA DE PESQUISA

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). 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 e Uppin, 2011), o que pode 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 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.

5. JUSTIFICATIVA

Diante das limitações expostas presentes nas soluções de NaOCl, novas substâncias têm sido pesquisadas para serem utilizadas na endodontia, no intuito de promover uma adequada descontaminação do sistema de canais radiculares. 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 e 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 ácido hipocloroso pode ser utilizado como uma solução de irrigação endodôntica (Rossi-Fedele *et al.*, 2011). Diante do exposto, torna-se justificável a realização do presente estudo no intuito de elucidar o real potencial desta solução no combate ao *E. faecalis* em canais radiculares, altamente resistente ao tratamento químico-mecânico convencional e é encontrado em casos em que o tratamento endodôntico falha.

6. REVISÃO DE LITERATURA

6.1. Hipoclorito de sódio

Maekawa *et al.*, em 2011, analisaram a eficácia de substâncias químicas auxiliares e medicamentos intracanal sobre *Escherichia coli* e sua endotoxina em canais radiculares. Para o desenvolvimento do estudo, foram contaminados dentes com suspensão de *E. coli* por 14 dias e de acordo com a substância química auxiliar utilizada, foram divididos em 3 grupos, tais como: G1) hipoclorito de sódio 2,5% (NaOCl); G2) gel de clorexidina 2% (CLX); G3) solução apirogênica. Posteriormente, esses grupos foram subdivididos de acordo com a medicação intracanal (ICM): A) Pasta de hidróxido de cálcio (Calen®), B)

polimixina B e C) Pasta de hidróxido de cálcio + gel CLX 2%. Para o grupo controle (G4), foi empregada solução salina apirogênica. Amostras do conteúdo do canal radicular foram coletadas após o preparo biomecânico (BMP), 7 dias após a BMP, 14 dias após a atividade da medicação intracanal e 7 dias após a remoção da medicação intracanal. Os resultados foram avaliados pelos testes de Kruskal-Wallis e Dunn com nível de significância de 5%. O NaOCl a 2,5% e o CLX foram capazes de eliminar a *E. coli* do lúmen do canal radicular e reduzir a quantidade de endotoxina em comparação com a solução salina. Assim, concluiu-se que NaOCl e CLX 2,5% foram eficazes na eliminação de *E. coli* e apenas os medicamentos intracanaís estudados reduziram a quantidade de endotoxina presente nos canais radiculares.

Tyagi *et al*, em 2013, avaliaram diferentes meios de irrigação, com isso, pré-molares inferiores humanos extraídos foram preparados, seccionados, colocados em poços de cultura de tecidos expondo a superfície do canal radicular a *C. albicans* cultivada em Sabouraud Dextrose Agar para formar um biofilme. Após 2 dias, os grupos foram tratados com soluções de teste e controle por 10 min e avaliados quanto ao crescimento de *Candida* e número de unidades formadoras de colônias. As leituras foram submetidas à análise estatística por meio de variância e testes post hoc de Tukey. Os grupos hipoclorito de sódio e própolis exibiram maior eficácia antimicrobiana contra *C. albicans* sem diferença estatisticamente significativa. Foi seguido pelo grupo *A. indica* (*Neem*). *M. citrifolia* teve ação antifúngica limitada, seguido pelo grupo de controle negativo de solução salina. Verificou-se que a própolis pode ser utilizada como um antifúngico eficaz semelhante ao hipoclorito de sódio.

Bukhary e Balto, em 2017, avaliaram a eficácia antibacteriana do Octenisept (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, 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.

Hasna *et al*, em 2020, avaliaram o efeito da solução de NaOCl (2,5%) e gel (3%) com e sem irrigação ultrassônica passiva (PUI). No estudo, foram contaminados 40 pré-molares inferiores humanos com *E. coli* por 28 dias e *E. faecalis* por 21 dias. As amostras foram divididas em quatro grupos: (1) NaOCl 2,5% irrigando os canais sem ativação de PUI; (2) NaOCl 2,5% com PUI; (3) gel de NaOCl a 3% irrigando os canais sem PUI; e (4) gel de NaOCl a 3% com PUI. Após o tratamento, todas as amostras foram preenchidas com 3mL de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 17% por 3min e depois lavadas com solução salina. As amostras foram avaliadas para *E. coli* e *E. faecalis* unidades formadoras de colônias e lipopolissacarídeo (LPS) e ácido lipoteicóico (LTA) foram avaliados usando ensaio cinético cromogênico LAL e ELISA. Os dados foram analisados pelos testes de Kruskal-Wallis, Friedmann e Dunn com $\alpha \leq 0,05$. Todos os grupos foram eficazes na redução da carga microbiana de *E. coli* e *E. faecalis* após o tratamento, sem diferença significativa entre os grupos. Os grupos de gel NaOCl e NaOCl não tiveram diferença significativa na redução de LPS e LTA. Redução estatisticamente aumentada foi observada para NaOCl + PUI e NaOCl gel + PUI em comparação com os grupos sem PUI. O gel de NaOCl e a solução NaOCl de tem a mesma ação antimicrobiana e pode desintoxicar parcialmente endotoxinas.

Wright *et al*, em 2021, analisaram as ações antimicrobianas do hipoclorito de sódio (NaOCl) misturado com clodronato ou etidronato na irrigação do canal radicular, no qual, foram cultivados em discos de hidroxiapatita, biofilmes de *Enterococcus faecalis* de sete dias. Os discos foram desinfetados com clodronato 0,26 M-NaOCl 5%, etidronato 0,26 M-NaOCl 5%, NaOCl 5% ou tratados com solução salina tamponada com fosfato (PBS). As avaliações foram realizadas usando contagem de colônias, SEM e o ensaio de redução XTT. A avaliação do XTT usou os mesmos grupos, mas com NaOCl a 2,5%. Para a contagem de colônias, as bactérias foram removidas dos discos por mistura de vórtice, seguida de plaqueamento. Em seguida, os discos foram fixados para imagiologia SEM e pontuaram as micrografias SEM para bactérias remanescentes. As

ações do antibiofilme foram avaliadas com os testes de comparação múltipla de Kruskal-Wallis e Dunn. As Micrografias SEM e o ensaio XTT não revelaram diferenças entre os controles NaOCl e as misturas de clodronato ou etidronato com NaOCl ($P > 0,05$). Concluiu-se que as misturas quelantes com NaOCl tiveram ações antibiofilme comparáveis ao NaOCl.

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.

Xu *et al.*, em 2022 avaliaram o uso de hipoclorito de sódio de diferentes concentrações, com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 2 min como o irrigante final, nas propriedades da dentina radicular. Foi utilizado incisivos bovinos para obter discos de dentina radicular, já os canais radiculares foram preparados com diâmetro médio de 2,90 mm com conicidade de 0,06, sendo divididos em cinco grupos ($n = 20$) e tratados com diferentes concentrações de NaOCl (5,25%, 2,5% e 1,3%) por 30 min mais 17% EDTA por 2 min. Em seguida os discos foram carregados até a fratura por uma haste de aço com o mesmo cone através do orifício central, os fragmentos fraturados foram examinados por microscopia eletrônica de varredura para avaliar alterações nas

dimensões da dentina intertubular remanescente e no raio tubular. Já a microdureza foi avaliada com um penetrador de diamante Knoop para analisar a profundidade da dentina corroída pela irrigação. Os resultados foram analisados por anova de uma via e pelo teste de Tukey. O nível de significância foi $\alpha = 0,05$. Como resultado o dano por NaOCl 5,25% reduziram muito a resistência à fratura da dentina radicular de $172,10 \pm 30,13$ MPa para $114,58 \pm 26,74$ Mpa, na microdureza na parede do canal radicular foi de 34,1%, atingindo uma profundidade de até 400 μm ($p < 0,05$). Conseqüentemente levando aumento dos túbulos dentinários e à perda de dentina intertubular. Concluindo que com o uso combinado com EDTA, NaOCl causou destruição na superfície intratubular, reduzindo a resistência mecânica da dentina radicular. Quanto maior a concentração de NaOCl, maior o efeito.

Khanvilkar *et al.*, em 2023 avaliaram a a resistência de união push out do NaOCl, CHX e tintura-mãe homeopática (*Arnica montana*) como irrigantes. Para realização da pesquisa foi utilizado 60 dentes humanos extraídos unirradiculares, os canais foram preparados usando o rotatório universal Pro taper e foram preparados até o tamanho apical F3, sendo divididas aleatoriamente em três grupos de acordo com a solução irrigadora ($n = 20$), sendo: Grupo I: 3 mL de NaOCl 5,25% seguido de 3 mL de soro fisiológico (controle); Grupo II: 3 mL *Arnica montana* (10%, p / v) seguido de 3 mL de solução salina; Grupo III: 3 mL de CHX seguido de 3 mL de solução salina. Sendo utilizado pontas de papel para secagem dos canais, e em seguida foram revestidos com cimento AH Plus e obturados com guta-percha #F3, então cada raiz foi cortada horizontalmente em três fatias, medindo 2 mm de espessura. A velocidade de cruzeta para realizar o teste foi de 2 mm/min, O NaOCl 5,25% diminuiu significativamente a resistência de união do AH Plus à dentina, a CHX e *Arnica montana* foram capazes de reverter o push out comprometido de AH Plus para dentina tratada com NaOCl. Depois de usar NaOCl como um irrigante, surge o perigo de diminuir a capacidade de ligação do AH Plus às paredes do canal radicular. A irrigação final com *Arnica montana* e CHX reduz esse risco. Concluindo que NaOCl como um irrigante final reduz muito a resistência ao deslocamento de AH Plus para a dentina do canal radicular. A resistência de união prejudicada de AH Plus à dentina tratada com NaOCl também é mitigada quando *Arnica montana* e CHX são usados como soluções de irrigação final.

6.2. Ácido hipocloroso

Kunawarote *et al*, em 2011, avaliaram a adesão de um adesivo autocondicionante de duas etapas à dentina normal e afetada por cárie após o pré-tratamento com soluções de ácido hipocloroso levemente ácido (HOCl). Foi aplicado um teste de resistência de união por microtração (μ TBS) para comparar o μ TBS de Clearfil SE Bond com a dentina afetada por cárie ou com a dentina normal, após o pré-tratamento por 5 s com uma das três soluções (NaOCl 806 mM ou HOCl 0,95 ou 1,91 mM) o μ TBS do adesivo autocondicionante foi significativamente menor na dentina afetada por cárie do que na dentina normal. Assim, o Pré-tratamento com 0. HOCl 95 mM melhorou o μ TBS do adesivo autocondicionante na dentina afetada por cárie, mas não houve diferença significativa em comparação com a dentina normal. O pré-tratamento com NaOCl 806 mM ou HOCl 1,91 mM não demonstrou uma melhora significativa no μ TBS para dentina afetada por cárie. Assim, verificou-se que nenhum dos pré-tratamentos demonstrou um efeito negativo na adesão à dentina normal.

Thanatvarakorn *et al*, em 2014, investigaram o efeito desproteinizante do pré-tratamento com hipoclorito de sódio (NaOCl) e ácido hipocloroso (HOCl) na dentina coberta por *smear layer*. Para o estudo foi aplicado discos de dentina coronal humana com *smear layer* foram pré-tratados com NaOCl 6% ou HOCl 50ppm por 15s ou 30s. Além disso, usando microscopia eletrônica de transmissão (TEM), as alterações micro morfológicas do complexo hibridizado e a expressão de nanoinfiltração foram avaliadas na interface de um adesivo autocondicionante para a superfície da dentina pré-tratada com ou sem aplicação subsequente de um agente redutor. Ambos os pré-tratamentos de NaOCl e HOCl reduziram significativamente a razão amida: fosfato em comparação com o grupo não pré-tratado ($p < 0,05$), coincidindo com a eliminação da camada de esfregaço hibridizada em suas interfaces ligadas. Nanoinfiltração dentro da camada híbrida foi encontrada nos grupos não pré-tratados e pré-tratados com NaOCl, enquanto a aplicação subsequente de agente redutor mudou a nanoinfiltração reticular para o tipo manchado. Os grupos pré-tratados com HOCl mostraram menos expressão de nanoinfiltração em um padrão pontilhado, independentemente da aplicação do agente redutor. As soluções de NaOCl e HOCl podem remover o componente orgânico da dentina coberta por *smear layer*, o que pode eliminar a *smear layer* hibridizada criada pelo adesivo autocondicionante, levando à redução da expressão de nanoinfiltração dentro da camada híbrida.

Chen *et al*, em 2016, avaliaram os agentes quimioterápicos, para o tratamento da peri-implantite. O estudo *in vitro* avaliou a eficácia do ácido hipocloroso (HOCl), hipoclorito de sódio (NaOCl) e clorexidina (CHX) na eliminação de Gram-negativos (*E. coli* e *P. gingivalis*) e Gram-positivos (*E. faecalis* e *S. 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 e 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. Todos os irrigantes mostraram atividade antibacteriana e mataram a maioria das bactérias nas superfícies de liga de titânio de implantes contaminados com biofilme. Além disso, o HOCl diminuiu significativamente a concentração de lipopolissacarídeo de *P. gingivalis* quando comparado com NaOCl e CHX. Assim, um anti-séptico HOCl pode ser eficaz para limpar superfícies de implantes contaminadas por biofilme.

Lafaurie *et al*, em 2018, analisaram a substantividade dos enxaguantes bucais HOCl em comparação com os enxaguatórios com CHX e um placebo. Foi realizado um ensaio clínico randomizado com 75 participantes, em que, 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 coletadas no início do estudo e após 30 segundos, 1, 3, 5 e 7 horas para avaliar a substantividade, e 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 em 7 horas, e os eventos adversos também foram avaliados. 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. 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, além de ter um efeito inicial na viabilidade bacteriana na saliva, mas sem substantividade.

Paing *et al*, em 2020, avaliaram o efeito do pré-tratamento desproteínizante de *smear layer* usando ácido hipocloroso (HOCl) nas resistências de micro-cisalhamento (μ SBS) de cimentos de ionômero de vidro convencionais e modificados por resina (GIC) para dentina foi investigado e comparado com o pré-tratamento de desmineralização com ácido poliacrílico (PAA). No qual, 150 molares humanos foram divididos em grupos, o μ SBS foi testado e os dados foram analisados estatisticamente pela ANOVA, seguida do teste post-hoc de Tukey. O pré-tratamento com HOCl aumentou o μ SBS de GIC convencional em comparação com o grupo de controle. Para GIC restaurador modificado por resina, a desproteínização de HOCl de 5s aumentou o μ SBS, enquanto tempos de aplicação mais longos não apresentaram aumento. Não se obteve diferença nos grupos pré-tratados com HOCl e controle de CIV de cimentação modificado com resina. O pré-tratamento com PAA aumentou significativamente o μ SBS de todos os cimentos. Concluiu-se que a desproteínização da *smear layer* com HOCl pode melhorar a adesão à dentina do GIC convencional. No entanto, podem afetar adversamente a polimerização de GICs modificados por resina.

Hsieh *et al*, em 2020, avaliaram a viabilidade da água oxidante eletrolisada (EO) como enxaguatório bucal por meio da avaliação de sua toxicidade *in vivo* pelo peixe-zebra embrionário e da eficácia antimicrobiana contra *S. mutans*. Cada 1,5-3,0 g de cloreto de sódio (NaCl), brometo de sódio (NaBr) ou cloreto de cálcio (CaCl_2) foram adicionados para produzir água oxidante eletrolisada (EO). Entre a água EO produzida a partir de NaCl, NaBr e CaCl_2 , a água EO de NaCl apresentou uma taxa de mortalidade relativamente baixa de embriões de peixe-zebra e foi escolhida para uma investigação detalhada. As taxas de mortalidade para os grupos tratados com água EO contendo 0,0125% e 0,0250% de HOCl não foram diferentes estaticamente daquelas de um controle negativo, no entanto, a taxa de mortalidade foi de $66,7 \pm 26,2\%$ em 0,2% de CHX gluconato para o mesmo tempo de tratamento de 0,5 min. Todos os grupos de HOCl ou gluconato de CHX 2,0% mostraram > 99,9% de eficácia antimicrobiana contra *S. mutans*; enquanto o grupo de gluconato de CHX 0,2% mostrou uma taxa de redução bacteriana de 87,5% e 97,1% para tempos de tratamento de 0,5 min e 1,0 min, respectivamente. Exceto para o gluconato de CHX a 0,2%, todas as amostras de HOCl e o gluconato de CHX a 2,0% revelaram propriedades antimicrobianas semelhantes (> 99,9%) contra *S. mutans*. A água EO composta por 0,0125% e 0,0250% de HOCl mostrou > 99,9% de eficácia antimicrobiana, mas com pouca toxicidade *in vivo*, iluminando a possibilidade como um enxaguatório bucal alternativo.

Koluman et al., em 2022 compararam os efeitos do Ankaferd BloodStopper, ácido hipocloroso e gluconato de clorexidina em microrganismos específicos, como *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Actinomyces israelii* e *Lactobacillus casei*. Para *A. israelii*, o efeito de gluconato de clorexidina é maior do que Ankaferd BloodStopper e ácido hipocloroso para todos os organismos em exposição de curto prazo. No entanto, na exposição a longo prazo, ácido hipocloroso é mais eficaz para *L. casei* e *S. aureus* do que Ankaferd BloodStopper, mas para *A. israelii* e *S. mutans*, não houve diferença significativa. Embora o efeito de gluconato de clorexidina em *S. mutans* tenha começado em 120 s, Ankaferd BloodStopper e ácido hipocloroso precisou de mais tempo para agir. Observou-se que o tempo necessário para a eficácia do Ankaferd BloodStopper é superior ao gluconato de clorexidina e ácido hipocloroso. Concluindo que na exposição a longo prazo, todas as substâncias testadas têm efeitos antimicrobianos semelhantes e podem ser preferidos com sucesso.

Sanon et al., em 2022 investigou a influência dos tempos de aplicação e lavagem de hipoclorito de sódio e ácido hipocloroso na resistência de união à dentina de adesivos autocondicionantes de passo único. Para realizar o estudo discos de dentina coronal humana com uma smear layer padronizada foram pré-tratados com NaOCl 6% ou 100 ppm HOCl por 5 s, 15 s ou 30 s e lavados com água por 5 s, 15 s ou 30 s com ou sem a aplicação de Clearfil DC Activator. Os discos foram colados com 1-SEA e a resistência de união à microtração (μ TBS) foi realizada após 24 h. Resultando o pré-tratamento com NaOCl por 15 s e 30 s diminuiu significativamente μ TBS ($p < 0,05$), em qualquer tempo de lavagem. Já aplicação de Clearfil DC Activator recuperou μ TBS, mas não superou o grupo controle. Entretanto o pré-tratamento com HOCl por 15 s e 30 s seguido por 30 s de tempo de wash-out teve um bom aumento μ TBS de 1-SEAs ($p < 0,05$), independentemente da aplicação de Clearfil DC Activator. Concluindo que solução de 100 ppm de HOCl exibiu um efeito desproteínizante mais forte do que a solução de 6% de NaOCl. Além disso, a solução de HOCl pode ser lavada mais facilmente, deixando menos resíduos oxidativos na superfície da dentina pré tratada.

7. OBJETIVOS

7.1. Objetivos gerais

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

7.2. Objetivos específicos

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

8. MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Passo Fundo, sendo aprovado sob o parecer de número 5.783.928.

8.1 Obtenção e preparo das amostras

Trinta dentes unirradiculares humanos extraídos obtidos através do Biobanco da Faculdade de Odontologia da Universidade de Passo Fundo foram utilizados para o presente estudo.

A porção coronária foi seccionada na junção amelocementária, de forma que o remanescente radicular apresente um comprimento de 15 mm. E 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

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 seja visualizada no forame apical. A partir desta medida foi reduzido 1 mm, estabelecendo o comprimento de trabalho. O preparo cervical foi realizado com broca Largo nº 3 (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Suíça) e a ampliação apical com o sistema rotatório ProTaper (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça), seguindo a sequência de limas S1, S2, F1, F2 e F3. 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 (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça). A substância química auxiliar utilizada durante a instrumentação das raízes foi a água destilada (Decloquimis, São Paulo, SP,

Brasil) e, após a instrumentação, realizou-se uma lavagem final com 3 mL de EDTA 17% (Iodontosul, Porto Alegre, RS, Brasil), para a remoção de *smear layer*.

Após a conclusão da padronização do diâmetro dos canais radiculares, decorreu-se o vedamento do forame apical com resina fotopolimerizável Opallis (FGM, Joinville, SC, Brasil), para evitar o extravasamento das substâncias testadas. A impermeabilização externa das raízes também foi realizada através de duas aplicações de adesivo a base de cianoacrilato. (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 fique posicionada para cima.

As amostras foram alocadas em caixas de polipropileno (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.

8.2. Controle de esterilização

Um dente era selecionado aleatoriamente e submetido ao controle de esterilização. O dente selecionado foi preenchido com 2 mL de solução salina estéril (Decloquimis, São Paulo, SP, Brasil), e, após 5 minutos, um cone de papel estéril com calibre #45 (Tanari, Manaus, AM, Brasil) era colocado em contato com as paredes do canal durante 30 segundos. Em seguida, o cone de papel será 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 e semeado em placas de Petri com meio de cultura PCA (Plate Count Agar) através da técnica da gota, sendo pingadas cinco gotas de 15 µL. A placa foi incubada a 37 °C durante 48h, a fim de verificar o crescimento bacteriano.

8.3. 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 era ajustado de acordo com a escala 1,0 de McFarland, que corresponde a $3,0 \times 10^8$ UFC/ml, referente a uma densidade óptica de 0,25 a 550 nm.

8.4. Contaminação dos canais radiculares

Uma alíquota de 100 µL do inóculo de *Enterococcus faecalis* contido no tubo de ensaio foi inserida no interior dos canais radiculares 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 ocorreram sob condições assépticas em uma câmara de fluxo laminar.

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) era introduzido no canal radicular e mantido em contato com as paredes do canal radicular, durante 30 segundos. Em seguida, o cone era transferido para um microtubo de plástico estéril contendo 1 mL de solução salina estéril, que era homogeneizada em um agitador e, então, realizada a semeadura através da técnica das gotas, sendo pingadas cinco gotas de 15 µL em placas de Petri contendo PCA. 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*.

8.5. Avaliação de descontaminação dos protocolos testados

Após o período de 14 dias de contaminação com *Enterococcus faecalis*, as trinta amostras foram divididas em três grupos (n=10), de acordo com os protocolos de descontaminação testados, como segue:

G1: água destilada (controle);

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

G3: ácido hipocloroso (HClO) 250 ppm obtido a partir do dispositivo Dentaqua.

Os canais radiculares foram preenchidos com a substância química auxiliar testada, que permaneceu em contato com as paredes do canal radicular pelo período de 5 minutos, sendo renovada após esse período. No total, foram realizados 6 ciclos de irrigação, totalizando 30 minutos de contato das substâncias testadas com as paredes do canal radicular. Após este período, foi realizada irrigação com 5 ml de água destilada. Para a inserção das substâncias químicas auxiliares testadas no interior dos canais

radiculares foi utilizada seringa descartável estéril e agulha de calibre 30 (Navi-Tip - Ultradent, South Jordan, UT, Estados Unidos).

Ao término dos protocolos de irrigação final, os canais radiculares de todos os grupos foram aspirados e secos com cones de papel absorvente (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suíça).

8.6. Realização das coletas e análise microbiológica

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

As coletas (S1 e S2) foram realizadas da mesma forma. O canal radicular foi preenchido com solução salina estéril e uma ponta de papel absorvente estéril calibre #35 era 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} . Alíquotas foram semeadas em placas de Petri contendo PCA através da técnica das gotas, no local correspondente da diluição utilizada. As placas foram incubadas durante 24 horas a uma temperatura de 37°C. Após o período de incubação, a contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFCs) foram realizadas nas placas.

8.7. 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 irrigação final, 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).

9. RESULTADOS

A média e o desvio padrão da porcentagem de redução bacteriana de *E.faecalis* após o tratamento com as substâncias químicas testadas estão disponíveis na Tabela 1.

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

Tabela 1: Média (desvio) padrão da redução bacteriana (%) após os tratamentos de irrigantes testados.

Grupos	Redução bacteriana (%)
1. DW	12,03 (4,37) ^a
2. NaOCl 2,5%	100,00 (0,00) ^b
3. HClO 250 ppm	97,93 (2,01) ^b

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

**Letras minúsculas diferentes, na mesma coluna, representam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

10. DISCUSSÃO

O objetivo deste estudo foi analisar a ação antimicrobiana do ácido hipocloroso em canais radiculares. O grupo 2, foi usado no presente estudo *in vitro* porque é mais comumente utilizado na endodontia, e na maioria dos estudos na área (Maekawa *et al.*, 2011; Tyagi *et al.*, 2013; Hasna *et al.*, 2020; Karataş *et al.*, 2021; Wright *et al.*, 2021; Xu *et al.*, 2022; Khanvilkar *et al.*, 2023). A concentração mais utilizada é de 2,5% (Dutner *et al.*, 2012), há qual foi escolhida para realizar o seguinte estudo, para ser comparada com o ácido hipocloroso.

A ação antimicrobiana é uma propriedade extremamente importante quando se fala em uma substância química auxiliar. Contudo, o microrganismo de escolha para infecção dos canais radiculares do presente estudo, foi *E. faecalis*, pois tem capacidade de penetrar nos túbulos dentinários, colonizando o sistema de canais radiculares e formando biofilmes, sendo um dos principais patógenos ligados ao insucesso dos tratamentos endodônticos (Alghamdi *et al.*, 2020). Segundo Guerreiro-Tanomaru *et al.*, 2013

o período de 14 ou 21 dias é um tempo suficiente para formação do biofilme de *E. faecalis* no substrato dentinário (Guerreiro-Tanomaru *et al.*, 2013). No presente estudo, o período de cultura de *E. faecalis* foi de 14 dias, permitindo o crescimento bacteriano e conseqüentemente a realização dos protocolos de descontaminação com água destilada, hipoclorito de sódio e ácido hipocloroso. Para avaliar a ação antimicrobiana no presente estudo foi utilizado o teste contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) como utilizado em outros estudos (Souza *et al.*, 2018; Souza *et al.*, 2019; Souza *et al.*, 2021). As substâncias de NaOCl e HOCl demonstraram excelentes efeitos bactericidas contra o *E. faecalis*, exceto a água destilada, que foi utilizada como substância controle.

O presente estudo testou um dispositivo eletrolítico chamado Dentaqua®, que produziu a substância do ácido hipocloroso, avaliando sua capacidade antimicrobiana como substância química auxiliar na endodontia. O ácido hipocloroso possui propriedades adequadas para desinfecção (Tazawa *et al.*, 2023) e um mecanismo de desinfecção que envolve a destruição da parede celular de micróbios ou vírus, permitindo que o os destrua ou os inative (Block and Rowan 2020). O hipoclorito de sódio como no estudo de (Moradi *et al.*, 2022) apresentou redução máxima na contagem de colônias, devido à sua excelência na eficácia antimicrobiana, contudo pode levar ao aumento da citotoxicidade e conseqüentemente irritação dos tecidos periapicais (Ruksakiet *et al.*, 2020). Para o protocolo de descontaminação do canal radicular, através da simulação de um tratamento endodôntico, as substâncias permaneceram por 30 min em contato com as amostras, de forma ininterrupta.

KOLUMAN *et al.*, em 2022, realizou um estudo *in vitro* onde teve por objetivo analisar a atividade antimicrobiana do ácido hipocloroso e outras substâncias contra alguns microrganismos, onde destacou que HOCl é um importante agente antimicrobiano, que foi eficaz contra *Staphylococcus aureus* utilizando 100 e 200 ppm, e sendo mais eficaz para *Lactobacillus casei* e *Staphylococcus aureus* em longo prazo, também a enfatizou onde a maior a concentração de ppm, melhor será sua eficiência (Koluman *et al.*, 2022). Já no presente estudo o HOCl foi extremamente eficaz contra o *Enterococcus faecalis* reduzindo 97,93% das bactérias no canal radicular na concentração de 250 ppm.

SANON *et al* em 2022, realizou um estudo com os mesmos irrigantes testados no presente estudo sendo hipoclorito de sódio e ácido hipocloroso, onde teve por objetivo analisar a desproteinização da smear layer com NaOCl e HOCl, onde a solução de 100 ppm de HOCl foi significativamente mais eficaz na dissolução de componentes orgânicos da smear layer do que a solução de 6% de NaOCl, e o HOCl demonstrou não ser irritante

e não sensibilizante ao contrário do NaOCl, além de ser lavado com mais facilidade do que o NaOCl, deixando menos resíduos de cloro nas superfícies tratadas (Sanon *et al.*, 2022). Essa pesquisa comprova que o ácido hipocloroso pode entrar na odontologia, não só como desinfetante ou enxaguante bucal (Tazawa *et al.*, 2022), e sim como um suporte na desproteção da smear layer no tratamento de lesões de cáries. E como substância química auxiliar através dos resultados do presente estudo.

Diante os objetivos e hipóteses do estudo podemos observar que os resultados foram satisfatórios, onde conseguimos ressaltar que o ácido hipocloroso obtido pelo dispositivo eletrolítico Dentaqua é uma ótima alternativa para irrigação do sistema de canais radiculares. Entretanto, outros estudos devem ser realizados para avaliar outras propriedades desta substância.

11. CONCLUSÃO

Pode-se concluir que o ácido hipocloroso produzido pelo dispositivo Dentaqua, foi efetivo na redução bacteriana, comparando com a solução de hipoclorito de sódio, contudo mais estudos devem ser realizados para avaliar a substância.

12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALGHAMDI, F.; SHAKIR, M. The influence of *Enterococcus faecalis* as a dental root canal pathogen on endodontic treatment: A systematic review. *Cureus*, v. 12, n. 3, 2020.

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. *Int Endod J*, v. 40, n. 6, p. 876-879, 2014.

BLOCK, M.S.; ROWAN, B.G. Hypochlorous acid: a review. *J Oral Maxillofac Surg*, v. 78, n. 9, p. 1461-1466, 2020.

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.

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, p. 1161, 2016.

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.

DUTNER, J.; MINES, P.; ANDERSON, A. Irrigation trends among American Association of Endodontists members: a web-based survey. *J Endod*, v. 38, n. 1, p. 37-40, 2012.

FAIR, G.M.; MORRIS, J.C.; CHANG, S.L.; WEIL, I.; BURDEN, R.P. The Behavior of Chlorine as a Water Disinfectant. *J Am Water Works Assoc*, v. 40, n. 10, p. 1051-1061, 1948.

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, 2010.

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.

HASNA, A.A.; DA SILVA, L.P.; PELEGRINI, F.C.; FERREIRA, C.L.R.; DE OLIVEIRA, L.D.; CARVALHO, C.A.T. Effect of sodium hypochlorite solution and gel with/without passive ultrasonic irrigation on *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* and their endotoxins. *F1000Research*, v. 9, p. 642, 2020.

HSIEH, Y.L.; YAO, J.C.; HSIEH, S.C.; TENG, N.C.; CHU, Y.T.; YU, W.X.; CHEN, C.H.; CHANG, L.Y.; HUANG, C.S.; LEE, T.H. The *In Vivo* Toxicity and Antimicrobial Properties for Electrolyzed Oxidizing (EO) Water-Based Mouthwashes. *Materials*, v. 13, n. 19, p. 4299, 2020.

KAKEHASHI, S.; STANLEY, H.R.; FITZGERALD, R.J. The effects of surgical

exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med, Oral Pathol*, v. 20, n. 3, p. 340-349, 1965.

KARATAŞ, E.; AYAZ, N.; ULUKÖYLÜ, E.; BALTAÇI, MÖ.; 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.

KHANVILKAR, U.; PATIL, H.; BANDEKAR, S.; KSHIRSAGAR, S.; PAWAR, A.M.; WAHJUNINGRUM, D.A.; PAGNONI, F.; REDA, R.; ZANZA, A.; TESTARELLI, L. Pushout Bond Strength of Root Fillings after Irrigation of Root Canals Utilizing Sodium Hypochlorite, Chlorhexidine, and Homeopathic Mother Tincture (Arnica Montana). *Clin. Pract*, v. 13, n. 1, p. 305-314, 2023.

KOLUMAN, A.; AKTAŞ, A.; ADILOĞLU, S. Antimicrobial activities of Ankaferd BloodStopper, hypochlorous acid, and chlorhexidine against specific organisms. *Turk J Med Sci*, v. 52, n. 1, p. 276-278, 2022.

KUNAWAROTE, S.; NAKAJIMA, M.; FOXTON, R.M.; TAGAMI, J. Effect of pretreatment with mildly acidic hypochlorous acid on adhesion to caries-affected dentin using a self-etch adhesive. *Eur J Oral Sci*, v. 119, n. 1, p. 86-92, 2011.

LAFaurIE, G.I.; ZAROR, C.; DÍAZ-BÁEZ, D.; CASTILLO, D.M.; DE AVILA, 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.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.

MAEKAWA, L.E.; VALERA, M.C.; OLIVEIRA, L.D.D.; CARVALHO, C.A.T.; KOGA-ITO, C.Y.; JORGE, A.O.C. *In vitro* evaluation of the action of irrigating solutions associated with intracanal medications on Escherichia coli and its endotoxin in root canals. *J Appl Oral Sci*, v. 19, n. 2, p. 106-112, 2011.

MAINNEMARE, A.; MÉGARBANE, B.; SOUEIDAN, A.; DANIEL, A.; CHAPPLE, I.L.C. Hypochlorous Acid and Taurine-N-Monochloramine in Periodontal Diseases. *J. Dent. Res*, 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. *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.

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*, v. 35, n. 7, p. 1023-1027, 2009.

MORADI, M.; FAZLYAB, M.; POURHAJIBAGHER, M.; CHINIFORUSH, N. Antimicrobial action of photodynamic therapy on *Enterococcus faecalis* biofilm using curing light, curcumin and riboflavin. *Aust Endo J*, v. 48, n. 2, p. 274-282, 2022.

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.

PAING, S.Y.; TICHY, A.; HOSAKA, K.; NAGANO, D.; NAKAJIMA, M.; TAGAMI, J. Effect of smear layer deproteinization with HOCl solution on the dentin bonding of conventional and resin-modified glass-ionomer cements. *Eur. J. Oral Sci*, v. 128, n. 3, p. 255-262, 2020.

PATIL, C.; 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, 2011.

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

RUKSAKIET, K.; HANÁK, L.; FARKAS, N.; HEGYI, P.; SADAENG, W.; CZUMBEL, L. M.; SANG-NGOEN. T.; GARAMI, A.; MIKÓ, A.; VARGA, G.; LOHINAI, Z. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine and sodium hypochlorite in root canal disinfection: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *J Endod*, v. 46, n. 8, p. 1032-1041. e7, 2020.

SANON, K., HATAYAMA, T., TICHY, A., THANATVARAKORN, O., PRASANSUTTIPORN, T., WADA, T., IKEDA, M., HOSAKA, M.; NAKAJIMA, M. Smear layer deproteinization with NaOCl and HOCl: Do application/wash-out times affect dentin bonding of one-step self-etch adhesives?. *Dent Mater J*, v. 41, n. 3, p. 353-362, 2022.

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.; 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, p. 347-352, 2018.

SOUZA, M.A.; HOFFMANN, I.P.; MENCHIK, V.H.S.; ZANDONÁ, J.; DIAS, C.T.; PALHANO, H.S.; BERTOL, C.D.; ROSSATO-GRANDO, L.G. Influence of ultrasonic

activation using different final irrigants on antimicrobial activity, smear layer removal and bond strength of filling material. *Aust Endod J*, v. 45, n. 2, p. 209-215, 2019.

SOUZA, M.A.; PALHANO, H.S.; MACCI, D.; BROCH, G.M.; TISSIANI, L.; RAUBER, B.F.; CECCHIN, D.; BERVIAN, J.; DE ALMEIDA GOMES, B.P.F.; GABRIELLI, E. S. Influence of ultrasonic activation on antimicrobial activity of a new final irrigant containing glycolic acid: An in vitro study. *Aust Endod J*, v. 47, n. 3, p. 531-537, 2021.

TAZAWA, K.; JADHAV, R.; AZUMA, M.M.; FENNO, J.C.; MCDONALD, N.J.; SASAKI, H. Hypochlorous acid inactivates oral pathogens and a SARS-CoV-2-surrogate. *BMC Oral Health*, v. 23, n. 1, p. 1-9, 2023.

THANATVARAKORN, O.; NAKAJIMA, M.; PRASANSUTTIPORN, T.; ICHINOSE, S.; FOXTON, R.M.; TAGAMI, J. Effect of smear layer deproteinizing on resin–dentine interface with self-etch adhesive. *J Dent*, v. 42, n. 3, p. 298-304, 2014.

TYAGI, S.P.; SINHA, D.J.; GARG, P.; SINGH, U.P.; MISHRA, C.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, 2013.

WANG, L.; BASSIRI, M.; NAJAFI, R.; NAJAFI, K.; YANG, J.; KHOSROVI, B.; HWONG, W.; BARATI, E.; BELISLE, B.; CELERI, C.; ROBSON, M. 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. n. 6, p. 65–79, 2007.

WRIGHT, P.P.; COOPER, C.; KAHLER, B.; WALSH, L.J. Multiple assessment methodologies in determining the antibiofilm actions of sodium hypochlorite mixed with clodronate or etidronate in endodontic irrigation. *J. Microbiol. Methods* v. 180, p. 106107, 2021.

XU, H.; YE, Z.; ZHANG, A.; LIN, F.; FU, J.; FOK, A.S. Effects of concentration of sodium hypochlorite as an endodontic irrigant on the mechanical and structural properties of root dentine: A laboratory study. *Int Endod J*, v. 55, n. 10, p. 1091-1102, 2022.

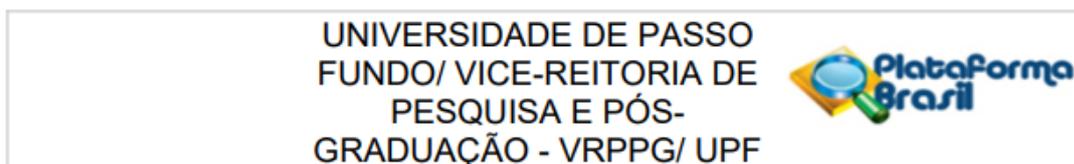
13. AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DO ALUNO


Prof. Dr. Matheus Albino Souza

10,0

14. ANEXO:

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



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

realização do estudo

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_ao_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 and cytotoxicity of hypochlorous acid obtained from an innovative electrolytic device – an *in vitro* study

Running Head: Antimicrobial action and cytotoxicity of hypochlorous acid

Article Category: Original article

Matheus Albino Souza¹, Mylena Lazareti Zanella¹, Gabriele Nichetti Vanin¹, Felipe Gomes Dallepiane¹, Camila Yasmin Monteiro Pizzi¹, Eduarda Rizzon Ferreira¹, Marciele Cristiane Spanenberg Fuhr¹, Nathan Mateus Piccolo¹, Huriel Scartazzini Palhano¹, Jordana da Silva Koch², Kellyn Rocca Souza², Ubirajara Maciel da Costa³, Vanessa Valgas dos Santos⁴, Liviu Steier^{5,6}, José Antônio Poli de Figueiredo².

From of ¹School of Dentistry, University of Passo Fundo, Passo Fundo, RS, Brazil;

²School of Dentistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil;

³School of Veterinary Medicine, State University of Santa Catarina, Lages, SC, Brazil;

⁴School of Medicine, University of Planalto Catarinense, Lages, SC, Brazil; ⁵School of

Dental Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, USA; ⁶Saveetha Dental

College and Hospitals, Saveetha Institute of Medical and Technical Sciences, Chennai,

India.

Corresponding Author: Matheus Albino Souza, Post-Graduate Program in Dentistry, University of Passo Fundo, BR 285/São José, Building A7, Suite 2, Zip code: 99052-900, Passo Fundo-RS-Brazil. Telephone: +55 54 3316-8402. E-mail: matheus292@yahoo.com.br or matheussouza@upf

Abstract

This study evaluated the antimicrobial effect and cytotoxicity of hypochlorous acid(HClO) obtained from an innovative 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 high antimicrobial activity and low cytotoxicity at both tested concentrations.

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

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 this previous results of the literature reveal a promising future for the use of HClO, 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 null hypotheses were that (i) HClO does not present antimicrobial activity and (ii) low cytotoxicity, when compared to other chemical auxiliary substances under investigation.

Methods

This study was appreciated and 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.

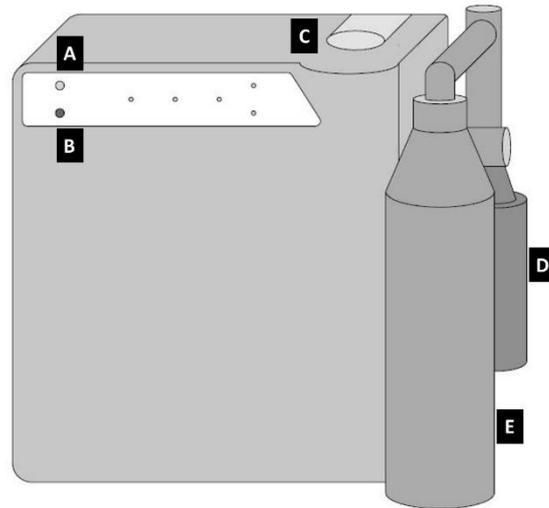
The reference strain was *Enterococcus faecalis* (*E.faecalis*) (ATCC 19433), which was cultivated in brain-heart infusion (BHI) broth (Acumedia–Neogen, Lansing, MI, USA) for 24 hours at 37 °C in bacteriological incubator (Kavo, Joinville, SC, Brazil). The turbidity degree was adjusted to the McFarland's 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). This number of samples was based on previous study that focused on antimicrobial strategies in endodontics [14].

The 250 ppm and 500 ppm HClO solutions was obtained by specific Dentaqua device (Dentaqua, Conmel, Ireland) for each concentration. 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.

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.



The upper compartment is filled with sterile DW. The smaller bottle on the back is filled with brine solution, which is composed of sodium chloride. 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 and 500 ppm in the larger bottle, respectively, being ready to use.

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 tested 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 cm² culture flasks under humidity at 37 °C and 5% CO₂.

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% CO₂, 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 µL 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 (SPSS, Chicago, IL, United States). 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.

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.

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 [15]. 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 [16]. 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 [17]. 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 [18], 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 [14,19,20].

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 rejects the first null 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 rejects the second null 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 [10-13], 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 high antimicrobial activity and low cytotoxicity at both tested concentrations.

Compliance with Ethical Standards

Conflict of Interest: Dr. Liviu Steier owns IP rights on the Dentaqua device. The rest of authors state that they have no financial affiliation (e.g., employment, direct payment, stock holdings, retainers, consultantships, patent licensing arrangements or honoraria) or involvement with any commercial organization with direct financial interest in the subject or materials discussed in this manuscript, nor have any such arrangements existed in the past three years.

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

Funding: This work has no financial support.

Informed consent: Informed consent is not applicable due to the fact that samples were composed of extracted bovine teeth that would be discarded.

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. 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.
15. 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.
16. Kim SG, Kahler B, Lin LM. Current developments in regenerative endodontics. *Curr Oral Health Rep* 2016;3:293–301.
17. Sedgley CM, Lennan SL, Appelbe OK. Survival of *Enterococcus faecalis* in root canals ex vivo. *Int Endod J* 2005;38:735–742.
18. 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.
19. 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.
20. 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.
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.