

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO

Carolina Bianchi Farina

**INFLUÊNCIA DO ÁCIDO HIPOCLOROSO OBTIDO
A PARTIR DE UM DISPOSITIVO ELETROLÍTICO NAS
PROPRIEDADES DA DENTINA RADICULAR – ESTUDO
*IN VITRO***

Passo Fundo

2023

Carolina Bianchi Farina

**INFLUÊNCIA DO ÁCIDO HIPOCLOROSO OBTIDO
A PARTIR DE UM DISPOSITIVO ELETROLÍTICO NAS
PROPRIEDADES DA DENTINA RADICULAR – ESTUDO
*IN VITRO***

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

Passo Fundo

2023

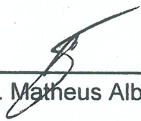
A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Tese de doutorado.

“Influência do ácido hipocloroso obtido a partir de um dispositivo eletrolítico nas propriedades da dentina radicular-estudo in vitro”


Elaborada por
Carolina Farina

Como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Odontologia
– Área de Concentração em Clínica Odontológica

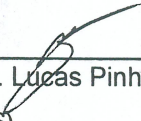
Aprovado em 13/12/2023, pela Comissão Examinadora:




Prof. Dr. Matheus Albino Souza
Orientador UPF




Prof. Dr. Carolina Steiner Oliveira
(Unicamp)



Prof. Dr. Lucas Pinheiro
(UFRGS)



Prof. Dr. Yuri Dal Bello
(UPF)



Prof. Dr. Álvaro della Bona
Coordenador do PPGOdonto

CIP – Catalogação na Publicação

F225i Farina, Carolina Bianchi
Influência do ácido hipocloroso obtido a partir de um
dispositivo eletrolítico nas propriedades da dentina radicular :
estudo *in vitro* / Carolina Bianchi Farina. – 2024.
611 KB : PDF.

Orientador: Prof. Dr. Matheus Albino Souza.
Tese (Doutorado em Odontologia) – Universidade de
Passo Fundo, 2024.

1. Endodontia. 2. Canal radicular - Tratamento.
3. Dentina. 4. Hipoclorito de sódio. 5. Ácido hipocloroso.
I. Souza, Matheus Albino, orientador. II. Título.

CDU: 616.314-18

Catalogação: Bibliotecária Juliana Langaro Silveira – CRB 10/2427

BIOGRAFIA DO AUTOR

Carolina Bianchi Farina

- Filiação: Rozi Cler Bianchi
Valdir Farina
- Nascimento: 16 de janeiro de 1996
- 2013 - 2017 Curso de Graduação em Odontologia na Faculdade de Odontologia - Universidade de Passo Fundo - UPF.
- 2018 - 2020 Curso de Pós-Graduação em Odontopediatria, nível Mestrado, na Faculdade São Leopoldo Mandic, Campinas SP
- 2021 - 2023 Curso de Pós-Graduação em Clínica Odontológica, nível Doutorado, na Faculdade de Odontologia da Universidade de Passo Fundo – UPF

Atuação profissional

- 2017- Atual Cirurgiã-Dentista, odontopediatra em consultório particular, em Erechim - RS
- 2019 - Atual Professora do Curso de Odontologia da Faculdade Empresariaral de Chapecó, UCEFF, em Chapecó
- 2020 - Atual Professora do Curso de Especialização em Odontopediatria, IOA – Chapecó-SC.
- 2023-2023 Professora do Curso de Odontologia da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, URI, em Erechim - RS

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer a Deus, por ser maravilhoso e tão presente na minha vida.

À minha família. Meu pai, minha mãe e meu irmão, vocês são tudo para mim, obrigada por acreditarem em mim mais uma vez e por sempre me apoiarem.

Ao meu namorado que me motiva, me incentiva e acredita que posso sempre mais.

Aos meus amigos e colegas, todo apoio foi fundamental para chegar ao fim desta etapa, agradeço pela troca que tivemos durante esses anos.

Ao meu orientador Prof Dr. Matheus Souza, pelo incentivo, pela paciência, por toda ajuda e suporte para que esse trabalho acontecesse. Saiba que admiro muito o profissional que és.

Aos colegas Nathan Piccolo, Camila Pizzi, Ana Zart, Leonardo Rissardo e Vincenzo, obrigada pela dedicação na execução dessa pesquisa, a disponibilidade de vocês foi essencial.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	9
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE ABREVIATURAS.....	11
RESUMO	12
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
3 PROPOSIÇÃO	25
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
6 CONCLUSÕES	49
REFERÊNCIAS	50
ARTIGO I.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Média (desvio padrão) dos valores de microdureza dentinária (pré-tratamento e pós-tratamento) e redução da microdureza dentinária (%) após protocolos de irrigação testados.....49

Tabela 2 - Valores da média (desvio padrão) da resistência à flexão, resistência coesiva e resistência a fratura da dentina radicular após os protocolos de irrigação testados.....51

Tabela 3 - Média (desvio padrão) da profundidade máxima de penetração (μm) nos túbulos dentinários radiculares dos protocolos de irrigação testados.....52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Dente bovino seccionado.....	30
Figura 2 – Raízes seccionadas	30
Figura 3 – Fragmento de raízes.....	30
Figura 4 – Palitos de dentina.....	30
Figura 5 – Paquímetro com palito de dentina em 0,18mm de espessura	31
Figura 6 - Palito de dentina inserido no vão de suporte do dispositivo de três pontos.....	32
Figura 7 – Dentina em formato de ampulheta	33
Figura 8 – Teste de resistência a tração	34
Figura 9 – Raiz do dente bovino	35
Figura 10 – Teste de resistência a fratura	37
Figura 11– Espécimes divididos em 3 blovos.....	39
Figura 12 – Avaliação da amostra.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS

- diâmetro

% - percentagem

µm – micrômetros

CHX - digluconato de clorexidina

DW – água destilada

EDTA - ácido etileno diamino tetracético

G – grama

HClO – ácido hipocloroso

min – minuto

Mm – milímetro

Mpa – megapascais

NaOCl – hipoclorito de sódio

Ppm – parte por milhão

RESUMO¹

Esse estudo teve como objetivo avaliar, *in vitro*, a influência do ácido hipocloroso obtido através de um dispositivo eletrolítico nas propriedades da dentina radicular. Cento e cinquenta dentes bovinos extraídos foram utilizados para a realização de 5 diferentes avaliações: 30 para análise da microdureza, 15 para análise de resistência a flexão, 15 para análise da resistência coesiva, 60 para análise da resistência a fratura e 30 para análise da penetração dentinária. As substâncias químicas auxiliares avaliadas foram divididas em seis grupos: água deionizada, NaOCl 1%, NaOCl 2,5%, NaOCl 5,25%, ácido hipocloroso 250 ppm e ácido hipocloroso 500 ppm. Os resultados demonstraram que os grupos tratados com água destilada e ácido hipocloroso não tiveram diferença significativa na microdureza da dentina radicular ($p>0,05$). No entanto, os grupos tratados com NaOCl demonstraram diferenças significativas na microdureza dentinária ($p<0,05$). Nos testes mecânicos foi possível observar que na resistência a flexão e resistência coesiva, o grupo controle e o ácido hipocloroso não obtiveram diferença estatística entre si ($p>0,05$). Porém, os grupos com NaOCl demonstraram diferença significativa ($p<0,05$), quando comparado as demais substâncias. No teste de resistência à fratura, pode-se observar que não houve diferença estatística entre nenhum grupo testado ($p>0,05$). E, por fim, no teste de penetração dentinária os grupos testados foram diferentes estatisticamente do grupo controle ($p<0,05$), porém, sem diferenças estatisticamente significantes entre si ($p>0,05$). Pode-se concluir que o ácido hipocloroso não teve influência na microdureza, bem como na resistência flexural, coesiva e à fratura, além de apresentar satisfatória penetração dentinária.

Palavras-chave: hipoclorito de sódio, ácido hipocloroso, estrutura dentinária

¹ Carolina Bianchi Farina

ABSTRACT²

This study aimed to evaluate, *in vitro*, the influence of hypochlorous acid obtained through an electrolytic device on the properties of root dentin. One hundred and thirty-five extracted bovine teeth were used to carry out 5 different evaluations: 30 for microhardness analysis, 15 for flexural strength analysis, 15 for cohesive strength analysis, 50 for fracture resistance analysis and 25 for analysis of dentin penetration. The auxiliary chemical substances evaluated were divided into six groups: deionized water, NaOCl 1%, NaOCl 2.5%, NaOCl 5.25%, hypochlorous acid 250ppm and hypochlorous acid 500ppm. The results found demonstrated that the groups treated with distilled water and hypochlorous acid had no significant difference in the microhardness of the root dentin ($p > 0.05$). However, the groups treated with NaOCl demonstrated significant differences in dentin microhardness ($p < 0.05$). In the mechanical tests, it was possible to observe that in terms of flexural strength and cohesive strength, the control group and hypochlorous acid did not obtain any statistical difference between them ($p > 0.05$). However, the groups tested with NaOCl demonstrated a significant difference ($p < 0.05$) when compared to the other substances. In the fracture resistance test, it can be observed that there was no statistical difference between any group tested ($p > 0.05$). Finally, in the dentin penetration test, the tested groups were statistically different from the control group ($p < 0.05$), without statistically significant differences between them ($p > 0.05$). It can be concluded that hypochlorous acid had no influence on microhardness, as well as flexural, cohesive and fracture resistance, in addition to presenting satisfactory dentin penetration.

Keywords: sodium hypochlorite, hypochlorous acid, dentin structure.

² Influence of hypochlorous acid obtained from an electrolytic device on the properties of root dentin – *in vitro* study

1 INTRODUÇÃO

O hipoclorito de sódio (NaOCl) é a substância química mais utilizada na descontaminação de canais radiculares pela sua ação antimicrobiana e pelo seu potencial de dissolução em tecido orgânico (Virdee et al., 2020). No entanto, não fornece a remoção adequada da smear layer da superfície dentinária (Tatari et al., 2018), é citotóxico, pode causar necrose local do tecido em caso de extrusão para a área periapical e também pode causar alteração dos componentes orgânicos e inorgânicos da dentina, enfraquecendo a estrutura dentinária (Cardoso et al., 2018).

Diante disso, torna-se necessária a busca de alternativas no que diz respeito a substâncias químicas auxiliares de descontaminação, que promovam uma adequada neutralização de microorganismos do sistema de canais radiculares, criando condições favoráveis para o sucesso do tratamento endodôntico sem trazer prejuízos aos tecidos adjacentes.

O ácido hipocloroso (HClO) é um poderoso agente oxidante e é uma substância endógena em todos os mamíferos, sendo eficaz contra uma ampla gama de microorganismos. Pode ser utilizado para higienização de mãos, higienização de superfície, enxaguatório bucal, na remoção de biofilme e na descontaminação de canais radiculares (Block e Rowan, 2020).

Recentemente foi desenvolvido um equipamento (Dentaqua) com potencial de promover a eletrólise e formar o ácido hipocloroso. De acordo com estudos prévios, o ácido hipocloroso, obtido a partir do dispositivo Dentaqua, apresentou efetiva ação antimicrobiana no combate ao *Enterococcus faecalis*, sendo similar ao hipoclorito de sódio em

diferentes concentrações. Além disso, o ácido hipocloroso obtido a partir deste dispositivo se mostrou menos citotóxico quando comparado às diferentes concentrações de hipoclorito de sódio (Vanin *et al.*, 2023; Zanella *et al.*, 2023).

No entanto, não existem estudos na literatura que comprovem a influência do ácido hipocloroso, obtido a partir do dispositivo Dentaqua, nas propriedades mecânicas da dentina radicular, bem como a sua habilidade de penetração na profundidade dos túbulos dentinários da dentina radicular. Portanto, torna-se justificável a realização do presente estudo no intuito de elucidar o real potencial do ácido hipocloroso nas diferentes propriedades da dentina radicular.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Hipoclorito de sódio

Keine *et al.* (2019) realizaram um estudo com o objetivo de comparar a microdureza, rugosidade e erosão do ácido periacético comparado com o hipoclorito de sódio, como irrigante único e associado com EDTA. Quarenta raízes unirradiculares foram seccionadas longitudinalmente no sentido vestibulo/lingual para a realização desse experimento. O teste de Knoop foi utilizado para avaliar a microdureza e a medição foi realizado no terço médio do canal na região vestibular e lingual, após protocolos de irrigação. O grupo do hipoclorito de sódio foi o que apresentou maior redução da microdureza. Sendo assim, o hipoclorito de sódio utilizado como irrigante único promoveu maior redução da microdureza, possivelmente devido à sua ação sobre alguns componentes orgânicos da dentina, como colágeno e à sua interação e posterior remoção parcial do fosfato já presente na composição dentinária.

Além deste, outro estudo foi realizado para avaliar os protocolos finais de irrigação na redução da microdureza da dentina no canal radicular. Baldasso *et al.* (2017) utilizaram 60 incisivos inferiores com a coroa previamente seccionada da raiz, aproveitando um segmento de 6mm de comprimento das partes médias e apical da raiz. Antes da aplicação das soluções de teste, a microdureza dentinária foi medida com um indentador Knoop, usando ampliação de 40x, com carga de 10 gramas e 20 segundos de permanência. O valor de dureza representativo para cada amostra em cada distância foi obtido pela média dos três recortes. As amostras foram

aleatoriamente divididas em seis grupos (n=20): Qmix, EDTA 17%, ácido cítrico, ácido periacético, hipoclorito de sódio e água destilada. Todos os protocolos reduziram significativamente a microdureza dentinária, enquanto a medição de 500um, foi detectado somente nos grupos do EDTA e QMix. Logo, pode-se concluir que QMix e EDTA 17% reduziram a microdureza dentinária em maior profundidade.

Pedersen, Ozyurek e Buzoglu (2019) realizaram um trabalho com o objetivo de avaliar os diferentes protocolos de irrigação na resistência à flexão da dentina coronária jovem e envelhecida. Cento e vinte barras de dentina (8mmx2mmx2mm) de dentes humanos extraídos (60 de pacientes jovens e 60 de pacientes mais velhos) foram aleatoriamente divididas em seis grupos: 2,5% NaOCl + 5% EDTA, 2,5% NaOCl + 15% EDTA, 2,5% NaOCl, 5% EDTA, 15% EDTA e solução salina. A resistência flexural foi avaliada por uma máquina de teste universal em três pontos. Os valores de resistência à flexão de amostras de controle jovens foram estatisticamente maiores que as amostras de controle envelhecidas. Nenhum protocolo de irrigação causou diferença significativa nos valores da resistência flexural. Os materiais de irrigação associados 2,5% NaOCl + 5% EDTA e 2,5% NaOCl + 15% EDTA produziram uma diminuição nos valores de resistência flexural de amostras de dentes jovens. Portanto, concluiu-se que os valores foram alterados pela idade e esta mudança pode afetar as características de resistência à fratura de dentes tratados endodonticamente.

Wang *et al.* (2017), realizaram um estudo com o objetivo de avaliar o hipoclorito de sódio em diferentes concentrações e tempo de exposição nas propriedades estruturais, composicionais e mecânicas da dentina. Foram selecionados pré-molares extraídos e destes, foram confeccionadas sessenta barras de dentina (4mmx3mmx2mm). As concentrações de NaOCl utilizadas

foram 1%, 5%, 10%, divididos em quatro grupos, juntamente com o controle (água destilada). Os testes realizados foram: espectroscopia, microscopia eletrônica de varredura e teste de resistência à flexão. Os resultados mostraram que houve alteração morfológica nos grupos de hipoclorito de sódio e não no grupo controle. A resistência flexural permaneceu inalterada e as alterações morfológicas eram imperceptíveis após o tratamento com o grupo 1%. Estes resultados indicaram que o hipoclorito de sódio a 1% não tem efeito significativo no mineral inorgânico da dentina e pode prejudicar e eliminar a concentração do conteúdo orgânico, podendo também influenciar na resistência à flexão e tenacidade da dentina.

Para a avaliação da resistência a tensão, Leonardo *et al.* (2016) realizaram uma pesquisa com o objetivo de avaliar o pH e o conteúdo de cloro disponível a partir de soluções de hipoclorito de sódio e de cálcio e a tensão superficial das mesmas soluções. Os grupos foram divididos nas concentrações selecionadas 0,5%, 1%, 2,5% e 5,25%. O nível de pH e teor de cloro foram avaliados por um medidor de pH digital e por titulação, respectivamente. A tensão superficial foi testada por um tensiômetro Du Nouy. Os resultados encontrados foram de que o hipoclorito de cálcio a 0,5 e 1% tiveram maior concentração de cloro presente, enquanto as concentrações mais altas de hipoclorito de sódio obtiveram o maior pH. O hipoclorito de sódio demonstrou valores da tensão superficial mais baixos que o hipoclorito de cálcio. Portanto, concluiu-se que as soluções de hipoclorito de cálcio são extremamente alcalinas e tendem a ter mais conteúdo de cloro do que o hipoclorito de sódio, mas possuem uma tensão superficial maior do que o mesmo.

Outro estudo com o mesmo objetivo, foi realizado por Giardino *et al.* (2019) que compararam a atividade antimicrobiana em dentina infectada e a

tensão superficial de uma solução de hipoclorito de sódio associada a um pó de etidronato (Dual Rinse®/HEDP), hipoclorito de sódio 5% e hipoclorito de sódio + EDTA. A tensão superficial foi medida pela técnica de Wilhelmy e a atividade antimicrobiana foi avaliada por 36 dentes humanos extraídos contaminados por *E. faecalis* durante cinco dias. Os resultados encontrados foram de que a tensão superficial média do EDTA foi significativamente menor do que a dos outros irrigantes testados, no entanto, a solução de NaOCl / Dual Rinse HEDP foi a maior das soluções testadas. A viabilidade bacteriana foi significativamente menor no grupo NaOCl / Dual Rinse. Portanto, a relevância clínica da adição de etidronato ao NaOCl aumenta seu efeito antimicrobiano nos túbulos dentinários, embora aumente sua tensão superficial.

Com o objetivo de avaliar a resistência a fratura de coroas dentais irrigadas endodonticamente com diferentes protocolos, um estudo foi realizado Baechtold *et al.* (2018). Setenta e seis incisivos bovinos foram divididos em quatro grupos: água destilada (controle), irrigação convencional com pressão apical positiva, irrigação ultrassônica passiva com enxágue contínuo e irrigação com pressão apical positiva e solução aquecida com hipoclorito de sódio. A força necessária para fraturar a coroa foi medida em uma máquina de teste universal em um ângulo de 45°. Os resultados encontrados foram que o grupo controle teve maior resistência a fratura, já o grupo que teve associação do hipoclorito de sódio, teve menor resistência. Sendo assim, concluiu-se dentes submetidos à irrigação com hipoclorito de sódio aquecido, apresentaram diminuição na resistência a fratura, isso ocorre porque o contato da solução irrigante com as paredes do canal radicular pode potencializar sua fraqueza, determinando a fratura coronária.

Além deste estudo, Seraj *et al.* (2019) realizaram uma pesquisa para avaliar a resistência à fratura de restaurações de dentes decíduos anteriores após a irrigação do canal radicular com hipoclorito de sódio e clorexidina. Foram utilizados noventa e quatro dentes extraídos e posteriormente, realizado o tratamento endodôntico, colocação de pino intraradicular (com e sem utilização de brocas) e restauração. A resistência à fratura foi determinada por uma máquina de teste universal. O grupo do hipoclorito de sódio apresentou resultados maiores para resistência à fratura, porém, não foram significativamente relevantes. Desse modo, a solução irrigante não afetou significativamente a resistência à fratura de dentes decíduos anteriores.

Cardoso *et al.* (2018) avaliaram a influência dos protocolos de irrigação no componente inorgânico da dentina do canal radicular. Sessenta raízes foram divididas aleatoriamente em seis grupos: solução salina (controle), solução salina + EDTA 17%, hipoclorito de cálcio 5,25%, hipoclorito de cálcio + EDTA 17%, hipoclorito de sódio 5,25%, hipoclorito de sódio 5,25% + EDTA 17%. Os espécimes foram seccionados longitudinalmente analisados por microscopia eletrônica de varredura. Os túbulos dentinários foram observados no sentido transversal (terço médio e apical) e classificados em escores, de acordo com a remoção da smear layer e alteração da dentina peritubular. Os resultados encontrados foram de que no terço médio, todos os grupos com EDTA apresentaram melhor remoção da smear layer com alteração da dentina peritubular e no terço apical o mesmo aconteceu com grupo do hipoclorito de sódio + EDTA. O hipoclorito de cálcio, apresentou melhor desempenho na remoção da smear layer no terço apical.

Souza *et al.* (2020) avaliaram a ação antimicrobiana do hipoclorito de cálcio e do hipoclorito de sódio com instrumentação recíproca e terapia fotodinâmica na influência da estrutura da dentina radicular. Foi realizada a

análise antimicrobiana, microdureza e componentes orgânicos. Concluiu-se que a associação do hidróxido de cálcio, instrumentação reciprocante e terapia fotodinâmica promovem ação antimicrobiana efetiva. Além disso, a menor modificação foi induzida na microdureza e componentes orgânicos da raiz, pelo uso de hidróxido de cálcio em baixa concentração, associada a terapia fotodinâmica.

Videe *et al.* (2020) realizaram um estudo com objetivo de avaliar se a ativação dinâmica manual, irrigação ultrasônica passiva e irrigação sônica, melhoram a penetração tubular do hipoclorito de sódio na dentina radicular quando comparado com a irrigação convencional e investigar se o aumento da concentração de NaOCl e/ou do tempo e contato influencia no desempenho dessas técnicas. Oitenta espécimes foram divididos aleatoriamente em 16 grupos (n=5) de acordo com a técnica de ativação irrigante, a concentração do hipoclorito de sódio (2% e 5,25%) e tempo de contato (10 e 20 minutos). Todos os espécimes foram posteriormente dissecados, observados em microscópio de luz e profundidade de penetração de NaOCl. Os resultados obtidos foram que a irrigação ultrassônica passiva, irrigação sônica e ativação dinâmica manual resultaram em infiltração tubular significativamente maior que a irrigação convencional. No entanto, quando a concentração do irrigante e o tempo de contato foram aumentados juntos, uma interação significativa foi observada na penetração de NaOCl. Desse modo, concluiu-se que agitando irrigantes, bem como utilizar maiores concentrações ou tempo de contato, potencializou a penetração de hipoclorito de sódio na dentina radicular.

2.2 Ácido hipocloroso

Lopes *et al.* (2015) realizaram um estudo com o objetivo de avaliar histologicamente o efeito da irrigação com 400ppm de Sterilox e hipoclorito de sódio a 2 e 5%, com e sem terapia fotoativada em dentes de cães com periodontite apical. 134 canais radiculares foram abertos e deixados expostos ao meio bucal por 14 dias e selados por 60 dias para a indução de periodontite apical. Posteriormente, os canais foram tratados de acordo com cada protocolo de desinfecção e obturados na mesma sessão. Após 120 dias, os eventos inflamatórios periapicais foram avaliados em microscopia de luz. A terapia fotoativada não produziu diferenças significativas para inflamação apical, quando utilizado após o preparo químico-mecânico. Todos os grupos foram estatisticamente diferentes do grupo controle, o que significa que Sterilox 400 ppm pode ser considerado uma alternativa ao hipoclorito de sódio no tratamento de canais radiculares.

Ghisi *et al.* (2014) avaliaram a influência das seguintes soluções de irrigação sobre a microdureza da dentina radicular: hipoclorito de sódio 2 e 5%, água superoxidada (Sterilox 400ppm) e EDTA 17%. A preparação do canal radicular foi realizada por instrumentos manuais, utilizando um dos protocolos de irrigação por 30 minutos. Em seguida, 5mm do terço da raiz cervical foram cortados de cada amostra e submetidos ao teste de microdureza Vickers, em dois pontos, um mais próximo da luz do canal (distância 1) e outro da raiz (distância 2). Os valores de microdureza na distância 1 foram significativamente menores do que os da distância 2 para todos os grupos, exceto hipoclorito de sódio 5% e hipoclorito de sódio 5% + EDTA. Concluiu-se que todas as soluções testadas apresentaram menor microdureza na camada de dentina do canal radicular mais superficial, em comparação com a encontrada perto da camada

externa da superfície radicular, exceto hipoclorito de sódio 5% e hipoclorito de sódio 5% + EDTA que promoveram menores valores de microdureza quando comparados ao Sterilox.

Chen *et al.* (2019) realizaram uma pesquisa com o objetivo de avaliar a influência de águas eletrolisadas com diferentes pHs na desmineralização da dentina interna. A dentina superficial da coroa de 20 molares humanos foi exposta e posteriormente dividida em duas partes perpendiculares à superfície da dentina. As amostras foram imersas em água eletrolisada fortemente ácida, água eletrolisada neutra, hipoclorito de sódio a 5% (grupo controle positivo) e água deionizada (grupo controle negativo). A microdureza da dentina foi medida a uma profundidade de 25 e 50mm abaixo da camada superficial a cada 5 até 60 minutos. Os resultados encontrados foram que a microdureza diminuiu com o aumento do tempo e imersão em todos os grupos, menos o grupo de controle negativo na profundidade de 25mm. Água eletrolisada neutra e hipoclorito de sódio exibiram significativamente menos desmineralização do que o grupo da água eletrolisada ácida após 15 min de imersão em 25mm de profundidade. Nenhuma mudança significativa de microdureza foi encontrada a uma profundidade de 50mm.

Sajahan *et al.* (2017) examinaram a substantividade de um novo desinfetante (a base de ácido hipocloroso) contra a formação de biofilme nas linhas de água de unidade odontológica. Vinte unidades odontológicas foram selecionadas para este estudo e divididas em dois grupos, A (linhas de água das unidades odontológicas tratadas com o desinfetante) e B (linhas de água das unidades não tratadas). A formação do biofilme foi monitorada em ambos os grupos pelo período de 10 dias. Uma polegada do tubo da linha de água da unidade dentária foi cortada

em local aleatório e analisado utilizando microscópio eletrônico de varredura. Não foi encontrado nenhuma camada de limo ou células bacterianas por um período de 7 dias nas linhas de água tratada. Na amostra do grupo B foi observado uma camada de limo a partir do dia 1. Portanto, concluiu-se que a solução desinfetante se mostrou eficaz por 7 dias contra a formação de biofilme.

Chen; Chen; Ding, em 2016, avaliaram a eficácia do ácido hipocloroso, hipoclorito de sódio e clorexina na eliminação de bactérias gram-negativas e gram-positivas na superfície de implantes. O efeito do volume de irrigação e do tempo de exposição na eficácia antimicrobiana do ácido hipocloroso foi avaliado juntamente com uma análise de durabilidade. Os resultados indicaram que o ácido hipocloroso exibiu melhor eficácia antibacteriana com o aumento dos volumes de irrigação e, também, alcançou maior eficácia antibacteriana conforme o tempo de tratamento foi aumentado. Todos os irrigantes mostraram atividade antibacteriana e mataram a maioria das bactérias nas superfícies de liga de titânio de implantes contaminados com biofilme. Desse modo, um anti-séptico a base de ácido hipocloroso pode ser eficaz para limpar superfícies de implantes contaminadas por biofilme.

3 PROPOSIÇÃO

Este estudo avaliou, *in vitro*, a influência de uma substância química auxiliar composta por ácido hipocloroso obtida através de um dispositivo eletrolítico nas propriedades mecânicas da dentina radicular.

Avaliou-se, por meio do método Vickers, a microdureza da dentina radicular.

Avaliou-se, por meio da máquina de estudos universal, a resistência flexural, resistência coesiva e resistência a fratura da dentina radicular.

Avaliou-se, por meio de microscopia confocal de varredura a laser, a penetração dentinária da dentina radicular.

** As hipóteses foram de que o (i) ácido hipocloroso obtido através de um dispositivo eletrolítico não tem influência nas propriedades mecânicas da dentina radicular e (ii) possui satisfatória penetração na dentina radicular.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo dispensa a apreciação do comitê de ética em pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de Passo Fundo, por utilizar dentes bovinos obtidos de animais abatidos para fins comerciais.

4.1 Teste de microdureza

Trinta dentes anteriores bovinos foram obtidos. A porção coronária foi seccionada na junção amelocementária, de modo que se obteve um remanescente radicular de 16 mm de comprimento. Dois sulcos longitudinais foram confeccionados nas faces vestibular e lingual, em toda a extensão do remanescente radicular, utilizando disco de diamante. As raízes foram clivadas em duas metades com o auxílio de uma lâmina de micrótomo, provendo duas amostras de cada raiz, totalizando 60 amostras. Os 3 mm cervicais iniciais e os 3 mm apicais finais foram removidos de cada amostra, provendo um bloco do terço médio radicular com 10 mm de comprimento.

As 60 amostras foram fixadas em resina acrílica, deixando a porção dentinária exposta para cima. Na sequência, as amostras foram lixadas com lixas abrasivas de papel de granulação 180, 320 e 600 (Metkon, Bursa, Turquia) e polidas com lixas de diamante (Metkon, Bursa, Turquia) sob constante refrigeração com água destilada, promovendo o nivelamento da amostra dentinária.

As amostras foram colocadas em recipientes plásticos contendo água destilada, de forma que estivessem totalmente cobertas.

4.1.1 Análise da microdureza inicial

Cada uma das amostras foi submetida inicialmente à avaliação de microdureza da dentina radicular. A microdureza da dentina radicular foi inicialmente mensurada utilizando um microdurômetro Vickers (Emco Test, Kuchl, Austria), em uma magnificação de 250x, profundidade de 300 μm , carga de 300 g e um tempo de permanência de 20 segundos do dispositivo. Em cada amostra, três endentações foram realizadas conforme descrito por Cruz-Filho *et al.*, em 2011. A primeira endentação foi feita a uma distância de 1.000 μm da entrada do canal radicular, e duas outras endentações foram feitas a uma distância de 200 μm uma da outra. O valor de microdureza representativo de cada amostra foi obtido por meio da média dos valores de microdureza obtidos de cada endentação.

4.1.2 Grupos Experimentais

Em seguida as amostras foram divididas aleatoriamente em 6 grupos (n=10), sendo eles: G1: água deionizada; G2: NaOCl 1%; G3: NaOCl 2,5%; G4: NaOCl 5,25%; G5: HClO 250 ppm; G6: HClO 500 ppm.

A água deionizada e as soluções de hipoclorito de sódio foram obtidas em farmácia de manipulação local (Natupharma, Passo Fundo, RS, Brasil). O ácido hipocloroso é obtido através de um dispositivo eletrolítico (Dentaqua®), que transforma, por um processo de eletrólise, uma solução chamada de *brine*, composta por água deionizada, cloreto de

sódio e ácido hidroclórico, em ácido hipocloroso, em diferentes concentrações.

A solução de 250 ppm de HClO foi obtida pelo aparelho Dentaqua (Dentaqua, Conmel, Irlanda). Este dispositivo consiste em um compartimento na parte superior, um conector para a garrafa menor na parte traseira e um conector para a garrafa maior na frente. A tecnologia de ativação eletroquímica envolve a geração de soluções ativadas eletroquimicamente pela passagem de uma solução diluída de NaCl através de um campo elétrico em um Módulo Eletrolítico de Fluxo (FEM), segregando os íons formados e produzindo duas soluções de carga oposta com propriedades físicas e químicas alteradas. A solução carregada positivamente (anólito) consiste em uma mistura de oxidantes mistos instáveis, como o HClO, em estado fisicamente excitado, que é capaz de penetrar em biofilmes e é altamente microbicida. A solução antioxidante carregada negativamente (católito) consiste predominantemente em hidróxido de sódio em estado excitado.

O compartimento superior foi preenchido com água deionizada estéril. O frasco menor no verso do aparelho foi preenchido com solução denominado de *brine* obtido em farmácia de manipulação, composta por três componentes: água deionizada, solução de cloreto de sódio e ácido clorídrico a 9%. A proporção em volume de água desionizada, cloreto de sódio e ácido clorídrico a 9% é de 17:2:1. Após o preenchimento, o frasco menor foi conectado à parte traseira do aparelho, enquanto o frasco maior foi conectado à parte frontal do aparelho. O botão *Bottle Water* foi pressionado, realizando um ciclo de lavagem do aparelho com água deionizada por um período de 3 minutos, que foi dispensada no frasco maior e imediatamente descartada. O frasco maior foi novamente

conectado ao dispositivo para produção de HClO. O botão *Ecasol* foi pressionado para a produção de HClO por um período de 10 minutos, que foi obtido pela eletrólise da solução salina misturada com água deionizada no aparelho, dispensando a solução de HClO a 250 ppm no frasco maior, ficando pronta para uso. Para a produção da solução de HClO a 500 ppm, foi realizado o mesmo procedimento, substituindo a água deionizada pela solução de HClO a 250 ppm durante o procedimento de produção.

As amostras foram depositadas em recipientes plásticos onde foram imersas em 2 ml da substância testada, de modo que estivessem totalmente cobertas com a substância testada para a realização do tratamento. O tratamento foi realizado durante 30 minutos, em cada grupo, onde a cada 5 minutos as substâncias eram renovadas, totalizando 6 ciclos.

4.1.3 Análise da microdureza final

Após o protocolo de tratamento, a microdureza da dentina radicular de cada amostra foi novamente determinada como descrito anteriormente, em locais próximos às endentações iniciais realizadas. A comparação dos valores de microdureza da dentina radicular entre os grupos foi realizada por meio do teste ANOVA, seguido pelo *post-hoc* de Tukey, com nível de significância de 5%.

4.2 Teste de resistência flexural

Para a avaliação da resistência flexural foram selecionados 15 dentes bovinos (Figura1), os quais tiveram suas coroas removidas com o

auxílio de uma cortadora de precisão Isomet 1000 (Buehler, Illinois, Estados Unidos), sob constante refrigeração com água (Figura 2).



Figura 1. Dente bovino seccionado



Figura 2. Raízes seccionadas

Logo após, as raízes foram seccionadas no longo eixo do dente para produzir fragmentos de dentina radicular, totalizando 3 fragmentos por raiz (Figura 3). A parte correspondente ao terço médio foi utilizada para produzir 2 palitos de dentina (Figura 4). Para a padronização no tamanho das amostras foram utilizadas lixas abrasivas obedecendo uma sequência de granulações decrescentes. Ao todo, foram obtidos 60 palitos de dentina em formato retangular (0,18 mm de espessura X 1,8 mm de largura X 5,0 mm de comprimento) (Figura 5).



Figura 3. Fragmentos de raízes



Figura 4. Palitos de dentina



Figura 5. Paquímetro com palito de dentina em 0,18mm de espessura

As amostras obtidas foram distribuídas aleatoriamente em seis grupos, de acordo com os protocolos de irrigação testados ($n = 10$), conforme descrito previamente.

As amostras foram depositadas em recipientes plásticos onde foram imersas em 2 ml da substância testada, de modo que estivessem totalmente cobertas com a substância testada para a realização do tratamento. O tratamento foi realizado durante 30 minutos, em cada grupo, onde a cada 5 minutos as substâncias eram renovadas, totalizando 6 ciclos. Ao final dos protocolos de irrigação, todas as amostras foram lavadas com 5 ml de água destilada para evitar a ação contínua das substâncias nas superfícies dentinárias e secas com gaze.

O teste de resistência flexural foi realizado utilizando um dispositivo de três pontos em miniatura com uma extensão de suporte de 3 mm, no qual cada palito foi inserido no vão de suporte (Figura 6). Uma carga em MPa foi aplicada na porção central do palito por meio de uma Máquina Universal de Ensaio (EMIC DL 2000) à uma velocidade de 0,5 mm/minuto até ocorrer a fratura.

A resistência à flexão (FS) foi calculada utilizando a seguinte fórmula:

$$FS = 3PL/2bd^2$$

Nesta fórmula, P representa a carga máxima até o momento da fratura (N), L representa a distância entre os pontos de apoio (mm), b representa a largura do palito (mm) e d representa a espessura do palito (mm). Os dados obtidos foram expressos em Megapascals (MPa).

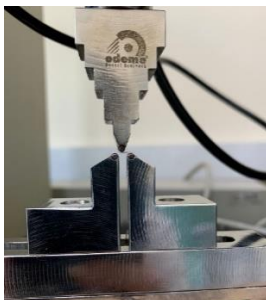


Figura 6. Palito de dentina inserido no vão de suporte do dispositivo de três pontos.

A comparação dos valores de resistência flexural da dentina radicular entre os grupos foi realizada por meio do teste ANOVA, seguido pelo *post-hoc* de Tukey, com nível de significância de 5%.

4.3 Teste de resistência coesiva

Para o teste de resistência coesiva foram selecionados 15 dentes bovinos. Uma cortadora de precisão Isomet 1000 (Buehler, Illinois, Estados Unidos) foi utilizada sob constante refrigeração para a remoção

das coroas e realização de um corte paralelo ao longo eixo, a fim de obter duas metades do canal radicular. Em seguida, cada metade foi seccionada no centro perpendicular ao longo eixo para obter 4 espécimes de cada raiz. Os espécimes foram cortados manualmente em formato de ampulheta usando uma broca cilíndrica com área transversal de aproximadamente 0,8 mm². Ao todo, foram obtidas 60 amostras de dentina em formato de ampulheta (Figura 7).



Figura 7. Dentina em formato de ampulheta.

As amostras obtidas foram distribuídas aleatoriamente em seis grupos, de acordo com os protocolos de irrigação testados (n = 10).

As amostras foram depositadas em recipientes plásticos onde foram imersas em 2 ml da substância testada, de modo que estivessem totalmente cobertas com a substância testada para a realização do tratamento. O tratamento foi realizado durante 30 minutos, em cada grupo, onde a cada 5 minutos as substancias eram renovadas, totalizando 6 ciclos. Ao final dos protocolos de irrigação, todas as amostras foram lavadas com 5 ml de água destilada.

A seguir, cada espécime foi fixado em uma alça de teste microtênsil com cola de cianoacrilato (Loctite Super Bonder; Henkel Loctite Corporation, Rocky Hill, CT, EUA) e submetido à uma carga de tração a 0,5 mm/ min em uma máquina de teste (EMIC DL 2000) (Figura 8). A área da seção transversal no local da fratura foi medida com paquímetro digital e a resistência à tração (σ) foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\sigma = F / A$$

Nesta fórmula, F (N) representa a força usada e A (mm²) representa a área no local da fratura. Os dados obtidos serão expressos em MPa.



Figura 8. Teste de resistência à tração.

A comparação dos valores de resistência coesiva da dentina radicular entre os grupos foi realizada por meio do teste ANOVA, seguido pelo *post-hoc* de Tukey, com nível de significância de 5%.

4.4 Teste de resistência à fratura

Para a realização do teste de resistência à fratura, 60 dentes bovinos foram utilizados. As 60 raízes foram segmentadas das coroas utilizando uma cortadora de precisão Isomet 1000 (Buehler, Illinois, Estados Unidos) sob constante refrigeração, de modo que se obtenham raízes retas de 15 mm de comprimento (Figura 9). Para a padronização das raízes, foram realizadas marcações de referência nas superfícies radiculares por meio de uma caneta de retroprojeter, cuja localização foi obtida a partir da utilização de uma régua-paquímetro digital. A primeira marcação foi realizada 2 mm abaixo do corte superior, a segunda marcação foi feita 2 mm acima do ápice radicular e a terceira marcação na metade das distâncias, entre as duas marcas.



Figura 9. Raiz do dente bovino

Os canais radiculares foram instrumentados com limas manuais e preparados com brocas Largo que se adaptaram ao diâmetro do canal radicular. Durante esse procedimento foram realizadas medições constantes com paquímetro digital adaptado para canais internos, até a obtenção de paredes dentinárias de 1 mm de espessura em todas as raízes, sendo água destilada, a substância utilizada para remover o material

proveniente da preparação do canal radicular. As raízes foram embebidas em resina acrílica utilizando moldes cilíndricos plásticos de PVC com ½ polegada de espessura com 20 mm de altura, mantendo uma exposição radicular de 3 mm para simular o espaço biológico.

As amostras obtidas foram distribuídas aleatoriamente em seis grupos, de acordo com os protocolos de irrigação testados (n = 10), conforme descrito previamente.

Com o auxílio de uma seringa e agulha descartável 25 x 0,7mm (Descarpack, São Paulo, Brasil), os condutos foram preenchidos com 2 mL da substância testada que permaneceu em contato com a paredes do canal radicular pelo tempo de 30 minutos, sendo renovadas a cada 5 minutos, totalizando 6 ciclos de irrigação. Ao final dos protocolos de irrigação, todas as amostras foram lavadas com 5 ml de água destilada e em seguida foram secas com cânula de aspiração.

As amostras foram posicionadas na parte inferior de uma Máquina Universal de Ensaio (EMIC DL 2000). Uma carga compressiva foi aplicada verticalmente às superfícies coronais das raízes com uma velocidade de carregamento de 1 mm/minuto até a ocorrência da fratura (Figura 9). A carga em que ocorrerá a fratura foi registrada e expressa em Newtons (N).

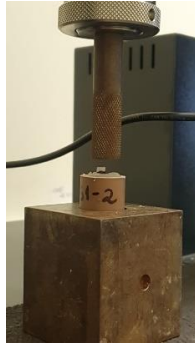


Figura 10. Teste de resistência à fratura

A comparação dos valores de resistência à fratura da dentina radicular entre os grupos foi realizada por meio do teste ANOVA, seguido pelo *post-hoc* de Tukey, com nível de significância de 5%.

4.5 Avaliação da penetração dentinária

Trinta dentes anteriores bovinos foram obtidos para o preparo das amostras. Para a confecção das amostras, a porção coronária foi seccionada da junção amelocementária e foram realizadas duas marcações para a padronização das raízes, sendo uma 2 mm abaixo do corte e outra 2 mm acima do ápice. As mostras foram instrumentadas nos três terços com a lima Reciproc #50, e, a cada terço foi interrompida a instrumentação e feita uma irrigação com 5ml de água destilada. Após o fim da instrumentação, foi feita uma lavagem final do canal radicular com 5 ml de água destilada e secagem com cones de papel absorvente (Dentsply Maillefer). O ápice foi fechado com resina composta para impedir a extrusão da substância química auxiliar, durante a irrigação.

4.5.1 Protocolos de irrigação

Posteriormente, os canais radiculares foram preenchidos com cristal violeta e mantidos a temperatura ambiente por 72 h. O cristal violeta foi renovado a cada 12 h. Na sequência, os canais radiculares foram lavados com 20ml de solução salina 0,9% (Eurofarma, SP, Brasil).

As amostras foram distribuídas aleatoriamente em seis grupos, de acordo com os protocolos de irrigação testados (n=5), conforme descrito previamente.

Com o auxílio de uma seringa e agulha descartável 25 x 0,7mm (Descarpack, São Paulo, Brasil), os condutos foram preenchidos até o extravasamento com a substância testada, que permaneceu em contato com a paredes do canal radicular pelo tempo de 30 minutos, sendo renovadas a cada 5 minutos, totalizando 6 ciclos de irrigação. Ao final dos protocolos de irrigação, todas as amostras foram lavadas com 5 ml de água destilada e em seguida foram secas com cânula de aspiração.

4.5.2 Avaliação da penetração linear

Após os protocolos de irrigação, todos os espécimes foram seccionados perpendicularmente ao seu longo eixo a uma distância de 3 mm e 7 mm do ápice (Figura 10), utilizando um disco diamantado adaptado em uma máquina de corte de baixa velocidade (Isomet 1000, São Paulo, SP, Brasil), obtendo-se assim 3 blocos (cervical, médio e apical). Foi realizado o polimento manual dos blocos de dentina por meio de lixas d'água de granulações 400, 600, 1200 (3M do Brasil, Sumaré, SP, Brasil), respectivamente. Imagens da superfície mais cervical de cada

bloco foram capturadas com o auxílio de um estéreo microscópio (LeicaM80; Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha).



Figura 11. Espécimes divididos em 3 blocos

A extensão da penetração linear das soluções testadas, em μm , na dentina radicular (mancha cristalina que foi clareada nas superfícies de cada secção dentinária = área + clara) foi medida em 4 regiões (M, D, V, e L), nos blocos cervical, médio e apical de cada raiz, usando o programa 145 ImageJ (National Institutes of Health, NIH, Bethesda, MD, EUA). O valor médio das medidas das 4 regiões foi considerado o valor final para cada bloco e a soma dos valores médios de cada bloco determinou o valor médio de penetração na dentina de cada amostra, em cada grupo experimental (Figura 11).

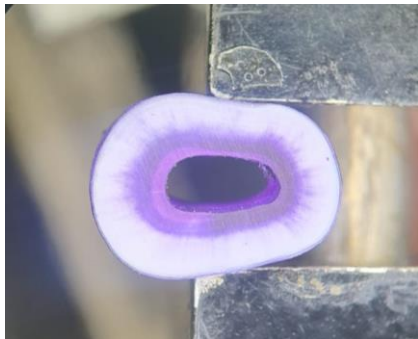


Figura 12. Avaliação da amostra

A comparação dos valores de penetração na dentina radicular entre os grupos foi realizada por meio do teste ANOVA, seguido pelo *post-hoc* de Tukey, com nível de significância de 5%.

5. RESULTADOS

5.1 Análise da microdureza

A média e o desvio padrão dos valores de microdureza estão dispostos na Tabela 1. De acordo com os resultados do presente estudo, foi possível observar que os grupos tratados com água destilada e ácido hipocloroso não tiveram diferença significativa na microdureza da dentina radicular ($p>0,05$). No entanto, os grupos tratados com NaOCl demonstraram diferenças significativas na microdureza dentinária ($p<0,05$).

Tabela 1: Média (desvio padrão) dos valores de microdureza dentinária (pré-tratamento e pós-tratamento) e redução da microdureza dentinária (%) após protocolos de irrigação testados.

Grupos	Pré- tratamento	Pós-tratamento	(%) redução
AD	44.43 (5.94) ^{A,a}	43.21 (3.84) ^{A,a}	2.37 (0.99) ^A
NaOCl 1%	39.87 (1.87) ^{A,a}	34.17 (1.12) ^{B,b}	16.69 (1.82) ^B
NaOCl 2.5%	42.14 (3.49) ^{A,a}	30.05 (2.72) ^{C,b}	28.33 (1.07) ^C
NaOCl 5.25%	40.20 (4.18) ^{A,a}	25.64 (0.89) ^{D,b}	39.13 (3.04) ^D
HClO 250 ppm	40.35 (2.24) ^{A,a}	39.29 (1.91) ^{A,a}	2.32 (3.16) ^A
HClO 500 ppm	40.41 (3.61) ^{A,a}	39.98 (2.86) ^{A,a}	2.06 (2.94) ^A

** Letras maiúsculas diferentes, na coluna, indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$); letras minúsculas diferentes, na linha, indicam diferenças significativas dentro dos grupos ($p < 0,05$).*

*** AD, água destilada; NaOCl, hipoclorito de sódio; HClO, ácido hipocloroso.*

5.2 Análise da resistência flexural, resistência coesiva e resistência a fratura

A média e o desvio padrão dos testes mecânicos estão dispostos na Tabela 2. De acordo com os resultados do presente estudo, foi possível observar que no teste de resistência a flexão e resistência coesiva, o grupo controle e o ácido hipocloroso (HClO 250 e 500ppm) não obteve diferença estatística entre si ($p > 0,05$). Porém, os grupos testados com NaOCl demonstraram diferença significativa ($p < 0,05$), quando comparado às demais substâncias.

No teste de resistência fratura, pode-se observar que não houve diferença estatística entre os grupos testados ($p > 0,05$).

Tabela 2. Valores da média (desvio padrão) da resistência à flexão, resistência coesiva e resistência a fratura da dentina radicular após os protocolos de irrigação testados.

Grupos	Resistência flexural	Resistência coesiva	Resistência a fratura
AD	9.26 (1.54) ^A	53.23 (4.89) ^A	257.26 (40.02) ^A
NaOCl 1%	8.74 (1.16) ^A	54.32 (5.98) ^A	302.55 (39.70) ^A
NaOCl 2.5%	5.57 (0.87) ^B	39.23 (2.71) ^B	313.41 (42.48) ^A
NaOCl 5.25%	4.94 (1.03) ^B	38.60 (2.82) ^B	258.29 (37.14) ^A
HClO 250 ppm	9.33 (1.79) ^A	46.20 (4.17) ^A	327.68 (34.96) ^A
HClO 500 ppm	8.16 (1.08) ^A	48.53 (3.45) ^A	257.63 (31.64) ^A

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

** *AD, água destilada; NaOCl, hipoclorito de sódio; HClO, ácido hipocloroso.*

5.3 Avaliação da penetração dentinária

A média e o desvio padrão da máxima profundidade de penetração no interior dos túbulos dentinários dos protocolos de irrigação testados estão expressos em micrometros (μm) na tabela 3.

De acordo com os resultados do presente estudo, a penetração dentinária dos grupos testados foram diferentes estatisticamente do grupo controle ($p < 0,05$), porém, sem diferenças estatisticamente significantes entre si ($p > 0,05$).

Table 3: Média (desvio padrão) da profundidade máxima de penetração (μm) nos túbulos dentinários radiculares dos protocolos de irrigação testados.

Grupos	Máxima profundidade de penetração (μm)
1. AD	00.00 (00.00) ^A
2. NaOCl 1%	104.00 (38.00) ^B
3. NaOCl 2.5%	117.00 (34.00) ^B
4. NaOCl 5.25%	125.00 (24.00) ^B
5. HClO 250 ppm	123.00 (28.00) ^B
6. HClO 500 ppm	106.00 (35.00) ^B

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

** *AD, água destilada; NaOCl, hipoclorito de sódio; HClO, ácido hipocloroso.*

6. DISCUSSÃO

Diante das limitações das substâncias químicas auxiliares que são utilizadas atualmente, houve a necessidade de pesquisar novas alternativas, visando melhores propriedades químicas e mecânicas. Dessa forma, nesse estudo, pesquisou-se uma nova substância, obtida através de um dispositivo eletrolítico (Dentaqua) e, estudos prévios mostraram que ele foi tão efetivo quanto o hipoclorito de sódio e a clorexidina na redução bacteriana e se apresentou menos citotóxico aos tecidos periapicais quando comparado a essas substâncias (SOUZA *et al.*, 2023).

A redução da microdureza da dentina resulta em substrato menos resistente e mais quebradiço, propagando trincas por fadiga durante tensões cíclicas (Kruzic; Ritchie, 2008). Assim, a determinação da dureza pode fornecer evidências importantes sobre os efeitos das soluções irrigadoras na dentina e conseqüentemente na sua resistência à fratura.

Os testes mecânicos do presente estudo se mostram importantes para avaliar a resistência da dentina radicular após o uso de diferentes substâncias químicas auxiliares. Sendo assim, a redução na resistência flexural resulta em menor estresse em relação ao estresse que a estrutura dentária pode ser submetida antes da fratura e a redução na resistência coesiva interfere nos tecidos conjuntivos duros e no módulo de elasticidade. Finalmente, a redução na resistência à fratura leva à propagação de fissuras e erosão na dentina peritubular e intertubular. Então, a modificação de todas essas propriedades mecânicas aumenta a suscetibilidade à fratura vertical da raiz, diminuindo a longevidade da

estrutura dental (Sideridou *et al.*, 2007; Marending *et al.*, 2007; Uzunoglu *et al.*, 2016).

Em relação às amostras, o substrato humano é muitas vezes difícil de obter em quantidade suficiente e com qualidade adequada porque os dentes geralmente são extraídos devido a extensas lesões de cárie. Dessa forma, substratos alternativos têm sido propostos e utilizados em pesquisas odontológicas, como dentes bovinos (Penelas *et al.*, 2019). A utilização de substrato bovino para testes laboratoriais em odontologia teve um aumento significativo nos últimos 30 anos devido às suas características como propriedades mecânicas, composição mineral e orgânica semelhantes aos dentes humanos (Fonseca *et al.*, 2008).

No presente estudo, foi realizado ciclos de irrigação no tratamento das amostras, previamente aos testes executados, assim como Ghisi *et al.* (2014) e Slutzky-Goldberg *et al.* (2002). Esses ciclos tiveram o intuito de simular o período em que as substâncias químicas auxiliares ficam em contato com a dentina radicular durante o tratamento endodôntico convencional para promover a descontaminação e, assim, foram utilizados ciclos de trinta minutos, renovando as substâncias a cada cinco minutos.

Ao longo dos anos, os estudos têm-se centrado na avaliação da influência das soluções irrigantes endodônticas e dos agentes químicos utilizados nas propriedades mecânicas da dentina coronal e radicular. Hoje, existem descobertas bem fundamentadas de que esses produtos químicos ou soluções alteram a estrutura da dentina (Baruwa *et al.*, 2022). Os resultados do teste de microdureza nesse trabalho, mostrou que o ácido hipocloroso, assim como o grupo controle, não obteve diferença pós tratamento das amostras. No entanto, o hipoclorito de sódio 1%, 2,5% e

5,25% alterou significativamente a microdureza dentinária, indo de encontro aos estudos publicados por Keine *et al.* (2019), Garcia *et al.* (2013) e Baldasso *et al.* (2017).

Como é sabido, a resistência à flexão reflete a tenacidade (Wang *et al.*, 2017), que é a capacidade de um material resistir a grandes deformidades antes de se romper. E a resistência coesiva refere-se à capacidade da dentina em resistir a forças de tração sem sofrer fraturas ou falhas significativas. Os resultados desse trabalho demonstraram que o ácido hipocloroso nas concentrações de 250 e 500ppm não obtiveram alterações significativas nas amostras, em contrapartida, o hipoclorito de sódio 1%, 2,5% e 5,25% apontaram diferenças significativas estatisticamente, esses resultados se assemelham aos encontrados por Pedersen *et al.*, em 2019.

A resistência contra a fratura radicular e a durabilidade das restaurações coronárias podem desempenhar um papel importante na sobrevivência dos dentes tratados endodonticamente (Pedersen *et al.*, 2019). Os resultados desse teste, mostraram que não houve diferença entre nenhum dos grupos testados, o mesmo ocorreu no teste descrito por Souza *et al.*, em 2022.

O sucesso a longo prazo da terapia endodôntica depende da remoção completa de microrganismos e seus subprodutos. Isto pode ser efetivamente alcançado pela capacidade do irrigante e substâncias químicas auxiliares de penetrar nos túbulos dentinários, o que é limitado no desbridamento mecânico convencional do sistema de canais radiculares (Arathi *et al.*, 2019). Dessa forma, foi testado nesse estudo a capacidade de penetração dentinária do ácido hipocloroso comparado com o hipoclorito de sódio e o resultado encontrado foi que não houve

diferença entre as duas substâncias. Isso demonstra mais um avanço nos testes desse novo material e a possibilidade de utilização do ácido hipocloroso no tratamento endodôntico convencional.

Duas concentrações de ácido hipocloroso foram testadas nesse estudo e, concluiu-se que não houve diferença significativa nos resultados dos experimentos utilizando o HOCl 250ppm ou 500 ppm. No entanto, no trabalho de Souza et al. (2023) que avaliou a ação antimicrobiana e citotoxicidade da mesma substância, constatou que quando a concentração é aumentada existe uma melhora no potencial antimicrobiano, mas, em contrapartida, a viabilidade das células sofre uma diminuição, demonstrando que uma maior concentração gera um potencial citotóxico.

Diante do exposto, vale ressaltar a importância clínica desse estudo, visto a necessidade de buscar novas alternativas para as substâncias químicas auxiliares utilizadas durante a terapia endodôntica. O resultado dos testes mostrou-se satisfatório, comprovando que o ácido hipocloroso obtido através de um dispositivo eletrolítico possui propriedades mecânicas superiores ao hipoclorito de sódio. Apesar das vantagens apresentadas, novos estudos devem ser realizados para avaliar *in vivo* as características do ácido hipocloroso na prática clínica.

6 CONCLUSÕES

Diante das limitações do presente estudo, pode-se concluir que o ácido hipocloroso obtido a partir de um dispositivo eletrolítico não teve influência na microdureza, bem como na resistência flexural, coesiva e à fratura, além de apresentar satisfatória penetração dentinária.

REFERÊNCIAS

BAECHTOLD, Marina et al. Effect of Endodontic Irrigation Protocols on Crown Fracture Resistance. **The journal of contemporary dental practice**, v. 19, n. 7, p. 768-772, 2018.

BALDASSO, Flávia Emi Razera et al. Effect of final irrigation protocols on microhardness reduction and erosion of root canal dentin. **Brazilian oral research**, v. 31, 2017.

BARUWA, Abayomi Omokeji et al. Effect of Endodontic Irrigating Solutions on Radicular Dentine Structure and Matrix Metalloproteinases-A Comprehensive Review. **Dentistry journal**, v. 10, n.12, p. 219, 2022.

BLOCK, Michael S.; ROWAN, Brian G. Hypochlorous acid: a review. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 78, n. 9, p. 1461-1466, 2020.

CARDOSO, Luana Roletto et al. Effect of EDTA, sodium, and calcium hypochlorite on the inorganic component of root canal dentin: A SEM analysis. **Microscopy research and technique**, v. 82, n. 2, p. 128-133, 2019.

CARLOTTO, Israel Bangel et al. 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.

CHEN, Chun-Ju; CHEN, Chun-Cheng; DING, Shinn-Jyh. 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, Ker-Kong et al. 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.

FONSECA, R.B. et al. Radiodensity and hardness of enamel and dentin of human and bovine teeth, varying bovine teeth age. **Arch Oral Biol**. 53, 1023-1029, 2008.

GARCIA, Arturo JA et al. Effect of sodium hypochlorite under several formulations on root canal dentin microhardness. **Journal of investigative and clinical dentistry**, v. 4, n. 4, p. 229-232, 2013.

GHISI, Alexandre Corrêa et al. Effect of super-oxidized water, sodium hypochlorite and EDTA on dentin microhardness. **Brazilian dental journal**, v. 25, p. 420-424, 2014.

GIARDINO, Luciano et al. Dual Rinse® HEDP increases the surface tension of NaOCl but may increase its dentin disinfection efficacy. **Odontology**, v. 107, n. 4, p. 521-529, 2019.

GUIDA, A. Mechanism of action of sodium hypochlorite and its effects on dentin. **Minerva stomatologica**, v. 55, n. 9, p. 471-482, 2006.

IANDOLO, Alfredo et al. Dentinal tubule penetration and root canal cleanliness following ultrasonic activation of intracanal-heated sodium hypochlorite. **Australian Endodontic Journal**, v. 46, n. 2, p. 204-209, 2020.

KEINE, Kátia C. et al. Peracetic acid as a single endodontic irrigant: effects on microhardness, roughness and erosion of root canal dentin. **Microscopy research and technique**, v. 83, n. 4, p. 375-380, 2020.

KÜÇÜK, Meltem; KERMEOĞLU, Fatma. Efficacy of different irrigation methods on dentinal tubule penetration of Chlorhexidine, QMix and Irritrol: A confocal laser scanning microscopy study. **Australian Endodontic Journal**, v. 45, n. 2, p. 202-208, 2019.

KRUZIC JJ, Ritchie RO. Fatigue of mineralized tissues: cortical bone and dentin. **J Mech Behav Biomed Mater** 1:3–17, 2008.

LÓPEZ, Fernanda Ullmann et al. Effect of different irrigating solutions and photo-activated therapy for in vivo root canal treatment. **Brazilian dental journal**, v. 26, p. 228-233, 2015.

MARENDING M et al. Impact of irrigant sequence on mechanical properties of human root dentin. **J Endod**, v. 33, p.1325–1328, 2007.

PEDERSEN, Nurab Deniz; UZUNOGLU-ÖZYÜREK, Emel; DOGAN BUZOGLU, Hatice. Influence of different irrigation protocols on microhardness and flexural strength values of young and aged crown dentin. **Gerodontology**, v. 37, n. 1, p. 53-58, 2020.

PENELAS, Alice Gonçalves; Alves, Amanda Cypriano; Simões, Isis Ingrid Nogueira; da Silva, Eduardo Moreira; Poskus, Laiza Tatiana; Hass, Viviane; Guimarães, José Guilherme Antunes. Development and characterization of biological bovine dentin posts. **J Mech Behav Biomed Mater**, 2019.

ROSSI-FEDELE, G. et al. The effect of surface tension reduction on the clinical performance of sodium hypochlorite in endodontics. **International endodontic journal**, v. 46, n. 6, p. 492-498, 2013.

SIDERIDOU, ID et al. Aging studies of light cured dimethacrylate-based dental resins and a resin composite in water or ethanol/water. **Dent Mater**, v. 23, p. 1142–1149, 2007.

SHAJAHAN, Irfana Fathima et al. Substantivity of hypochlorous acid-based disinfectant against biofilm formation in the dental unit waterlines. **Journal of conservative dentistry: JCD**, v. 20, n. 1, p. 2, 2017.

SLUTZKY-GOLDBERG, I, Liberman R, Heling I. The effect of instrumentation with two different file types, each with 2.5% NaOCl irrigation on the microhardness of root dentin. **J Endod**, v. 28, n. 4, p. 311-312, 2002.

SOUZA, Erick Miranda et al. Similar influence of stabilized alkaline and neutral sodium hypochlorite solutions on the fracture resistance of root canal–treated bovine teeth. **Journal of endodontics**, v. 40, n. 10, p. 1600-1603, 2014.

SOUZA, Matheus Albino et al. Association of calcium hypochlorite, reciprocating instrumentation and photodynamic therapy: Antimicrobial analysis and effects on root dentin structure. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 29, p. 101625, 2020.

SOUZA, Matheus Albino et al. Effectiveness of ultrasonic activation over glycolic acid on microhardness, cohesive strength, flexural strength, and fracture resistance of the root dentin. **Clin Oral Investig**, v. 27, n.4, p.1659-1664, 2023.

TARTARI, T. et al. Analysis of the effects of several decalcifying agents alone and in combination with sodium hypochlorite on the chemical composition of dentine. **International endodontic journal**, v. 51, p. e42-e54, 2018.

UZUNOGLU E et al. Final irrigation regimens affect fracture resistance values of root-filled teeth. **J Endod**, n. 42, p. 493–495, 2016.

VANIN, G. N. **Avaliação da ação antimicrobiana e citotoxicidade de solução de ácido hipocloroso obtida a partir de um dispositivo eletrolítico em comparação com diferentes concentrações de hipoclorito de sódio**. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Faculdade de odontologia, Universidade de Passo Fundo. Passo Fundo, 2023.

VIRDEE, S. S. et al. The influence of irrigant activation, concentration and contact time on sodium hypochlorite penetration into root dentine: an ex vivo experiment. **International endodontic journal**, v. 53, n. 7, p. 986-997, 2020.

WANG, Tian-Feng et al. Effects of different concentrations and exposure time of sodium hypochlorite on the structural, compositional and mechanical properties of human dentin. **Journal of Huazhong University of Science and Technology [Medical Sciences]**, v. 37, n. 4, p. 568-576, 2017.

ZANELLA, M. Avaliação da ação antimicrobiana e toxicidade do ácido hipocloroso obtido a partir de dispositivo eletrolítico em canais radiculares infectados com *Enterococcus faecalis*. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Faculdade de odontologia, Universidade de Passo Fundo. Passo Fundo, 2023.

ARTIGO I

Influence of hypochlorous acid obtained from an electrolytic device on the properties of root dentin – in vitro study

Running Head: Use the hypochlorous acid in endodontics

Article Category: Original Article

Matheus Albino Souza¹, Carolina Bianchi Farina¹,
Camila Pizzi¹, Nathan Mateus Piccolo¹, Ana Beatriz Zart¹,
Leonardo Rissardo¹, Vincenzo Ghisleni Arenhard¹,

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

Corresponding Author: Matheus Albino Souza,
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.
Email: matheus292@yahoo.com.br or matheussouza@upf.br
(endereço em Português)

Abstract

Objectives: This study evaluated, in vitro, the influence of hypochlorous acid obtained through an electrolytic device on the properties of root dentin.. *Methods:* One hundred and fifty extracted bovine teeth were used to carry out 5 different evaluations: 30 for microhardness analysis, 15 for flexural strength analysis, 15 for cohesive strength analysis, 60 for fracture resistance analysis and 30 for penetration analysis dentin. The auxiliary chemical substances evaluated were divided into six groups: deionized water, 1% NaOCl, 2.5% NaOCl, 5.25% NaOCl, 250 ppm hypochlorous acid and 500 ppm hypochlorous acid. The data obtained was subjected to statistical analysis, using specific tests for each assessment.

Results: The results demonstrated that the groups treated with distilled water and hypochlorous acid had no significant difference in the microhardness of the root dentin ($p>0.05$). However, the groups treated with NaOCl

demonstrated significant differences in dentin microhardness ($p < 0.05$). In the mechanical tests, it was possible to observe that in terms of flexural strength and cohesive strength, the control group and hypochlorous acid did not obtain any statistical difference between them ($p > 0.05$). However, the groups tested with NaOCl demonstrated a significant difference ($p < 0.05$) when compared to the other substances. In the fracture resistance test, it can be observed that there was no statistical difference between any group tested ($p > 0.05$). And, finally, in the dentin penetration test, the tested groups were statistically different from the control group ($p < 0.05$), however, without statistically significant differences between them ($p > 0.05$).

Conclusions: It can be concluded that the hypochlorous acid obtained from an electrolytic device had no influence on microhardness, as well as flexural, cohesive and fracture

resistance, in addition to presenting satisfactory dentin penetration.

Clinical significance: Hypochlorous acid is a promising auxiliary chemical substance for use in endodontic treatment.

Keywords: sodium hypochlorite, hypochlorous acid, dentin structure, mechanical tests.

Introduction

Sodium hypochlorite (NaOCl) stands as the most widely employed chemical substance in root canal decontamination due to its antimicrobial action and potential for organic tissue dissolution (1). Nevertheless, it falls short in providing adequate removal of the smear layer from dentin surfaces (2). Sodium hypochlorite is cytotoxic, may lead to localized tissue necrosis upon periapical extrusion, and can alter both organic and inorganic components of dentin, thereby compromising dentin structure integrity (3).

Consequently, there arises a necessity to explore alternatives concerning auxiliary decontamination chemicals that facilitate effective neutralization of microorganisms within the root canal system, creating favorable conditions for the success of endodontic treatment without detriment to adjacent tissues.

Hypochlorous acid (HClO) emerges as a potent oxidizing agent and is an endogenous substance in all mammals, demonstrating efficacy against a broad spectrum of microorganisms. It finds applications in hand hygiene, surface sanitization, mouthwash formulations, biofilm removal, and root canal decontamination (4).

A recently developed device, Dentaqua, exhibits the potential to promote electrolysis and generate hypochlorous acid. Previous studies indicate that hypochlorous acid produced by the Dentaqua device effectively demonstrates antimicrobial action against *Enterococcus faecalis*, akin to sodium hypochlorite at various concentrations. Furthermore, the hypochlorous acid derived from this device exhibits lower cytotoxicity compared to various concentrations of sodium hypochlorite (5,6).

However, there is a paucity of literature substantiating the impact of hypochlorous acid, obtained from the Dentaqua

device, on the mechanical properties of root dentin, as well as its ability to penetrate the depth of dentinal tubules within root dentin. Hence, the present study is justified to elucidate the true potential of hypochlorous acid in various properties of root dentin.

Materials and Methods

This study is exempt from review by the research ethics committee of the School of Dentistry at the University of Passo Fundo, as it involves bovine teeth obtained from animals slaughtered for commercial purposes.

Microhardness Test

Thirty bovine anterior teeth were obtained, and the coronal portion was sectioned at the amelocemental junction, resulting in a radicular remnant of 16 mm in length. Longitudinal grooves were made on the buccal and lingual

faces throughout the radicular remnant using a diamond disc. The roots were split into two halves with a microtome blade, providing two samples from each root, totaling 60 samples. The initial 3 mm cervical and final 3 mm apical were removed from each sample, resulting in a block of the radicular middle third with a length of 10 mm.

The 60 samples were embedded in acrylic resin, leaving the dentin portion exposed upwards. Subsequently, the samples were ground with abrasive paper of grits 180, 320, and 600 (Metkon, Bursa, Turkey) and polished with diamond burs (Metkon, Bursa, Turkey) under constant cooling with distilled water, ensuring the leveling of the dentin sample.

The samples were placed in plastic containers filled with distilled water, ensuring complete coverage. Each sample underwent an initial evaluation of radicular dentin microhardness. Radicular dentin microhardness was initially measured using a Vickers microhardness tester (Emco Test,

Kuchl, Austria) at a magnification of 250x, a depth of 300 μm , a load of 300 g, and a dwell time of 20 seconds. Three indentations were made in each sample, as described by Cruz-Filho et al. in 2011. The first indentation was made 1,000 μm from the root canal entrance, and two additional indentations were made 200 μm apart. The representative microhardness value of each sample was obtained by averaging the microhardness values from each indentation.

Subsequently, the samples were randomly divided into 6 groups (n=10): G1: deionized water; G2: NaOCl 1%; G3: NaOCl 2.5%; G4: NaOCl 5.25%; G5: HClO 250 ppm; G6: HClO 500 ppm. Deionized water and sodium hypochlorite solutions were obtained from a local compounding pharmacy (Natupharma, Passo Fundo, RS, Brazil). Hypochlorous acid was obtained through an electrolytic device (Dentaqua®), which, through electrolysis, transforms a solution called brine, composed of deionized water, sodium chloride, and

hydrochloric acid, into hypochlorous acid at different concentrations.

The 250 ppm HClO solution was obtained using the Dentaqua device (Dentaqua, Conmel, Ireland). This device consists of an upper compartment, a connector for the smaller bottle at the back, and a connector for the larger bottle at the front. Electrochemical activation technology involves generating electrochemically activated solutions by passing a diluted NaCl solution through an electric field in an Electrolytic Flow Module (EFM), segregating the formed ions 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, capable of penetrating biofilms and highly microbicidal. The negatively charged antioxidant solution (catholyte) consists predominantly of excited sodium hydroxide.

The upper compartment was filled with sterile deionized water. The smaller bottle on the back of the device was filled with a solution called brine obtained from a compounding pharmacy, composed of three components: deionized water, sodium chloride solution, and 9% hydrochloric acid. The volume ratio of deionized water, sodium chloride, and 9% hydrochloric acid is 17:2:1. After filling, the smaller bottle was connected to the back of the device, while the larger bottle was connected to the front. The Bottle Water button was pressed, initiating a washing cycle of the device with deionized water for a period of 3 minutes, which was dispensed into the larger bottle and immediately discarded. The larger bottle was then reconnected to the device for HClO production. The Ecasol button was pressed to produce HClO for a period of 10 minutes, obtained by electrolyzing the saline solution mixed with deionized water in the device, dispensing the 250 ppm HClO solution into the

larger bottle, ready for use. For the production of the 500 ppm HClO solution, the same procedure was followed, replacing deionized water with the 250 ppm HClO solution during the production process.

The samples were placed in plastic containers and immersed in 2 ml of the tested substance, ensuring complete coverage for treatment. The treatment was performed for 30 minutes in each group, with the substances renewed every 5 minutes, totaling 6 cycles.

After the treatment protocol, the radicular dentin microhardness of each sample was determined again, as previously described, in locations near the initial indentations made. The comparison of radicular dentin microhardness values between groups was performed using ANOVA, followed by Tukey's post-hoc test, with a significance level of 5%.

Flexural strength test

For the evaluation of flexural strength, 15 bovine teeth were selected (Figure 1), and their crowns were removed using a precision cutter, Isomet 1000 (Buehler, Illinois, United States), under constant cooling with water.

Immediately afterward, the roots were sectioned along the long axis of the tooth to produce fragments of radicular dentin, totaling 3 fragments per root. The portion corresponding to the middle third was used to produce 2 dentin sticks. To standardize the sample size, abrasive papers were used in a sequence of decreasing grits. In total, 60 rectangular dentin sticks were obtained (0,18 mm thickness x 1,18 mm width x 5,0 mm length).

The obtained samples were randomly distributed into six groups, according to the tested irrigation protocols (n = 10), as previously described. The samples were placed in plastic containers, immersed in 2 ml of the tested substance, ensuring complete coverage for the treatment. The treatment

was conducted for 30 minutes in each group, with the substances renewed every 5 minutes, totaling 6 cycles. After the irrigation protocols, all samples were washed with 5 ml of distilled water to prevent the continuous action of the substances on dentin surfaces and dried with gauze.

The flexural strength test was performed using a miniature three-point device with a support span of 3 mm, where each stick was inserted into the support gap. A load in MPa was applied to the central portion of the stick using a Universal Testing Machine (EMIC DL 2000) at a speed of 0.5 mm/minute until fracture. Flexural strength (FS) was calculated using the following formula:

$$FS = 3PL/2bd^2$$

In this formula, P represents the maximum load until the moment of fracture (N), L represents the distance between the support points (mm), b represents the width of the stick

(mm) and d represents the thickness of the stick (mm). The data obtained were expressed in Megapascals (MPa).

Comparison of root dentin flexural strength values between groups was carried out using the ANOVA test, followed by Tukey's post-hoc test, with a significance level of 5%.

Cohesive strength test

For the cohesive strength test, 15 bovine teeth were selected. An Isomet 1000 precision cutter (Buehler, Illinois, United States) was used under constant cooling to remove the crowns and make a cut parallel to the long axis, obtaining two halves of the root canal. Each half was then sectioned at the center perpendicular to the long axis to obtain 4 specimens from each root. The specimens were manually cut into an hourglass shape using a cylindrical drill with a cross-sectional area of approximately 0.8 mm^2 . In total, 60 hourglass-shaped dentin samples were obtained

The obtained samples were randomly distributed into six groups, according to the tested irrigation protocols (n = 10).

The samples were placed in plastic containers, immersed in 2 ml of the tested substance, ensuring complete coverage for the treatment. The treatment was conducted for 30 minutes in each group, with the substances renewed every 5 minutes, totaling 6 cycles. After the irrigation protocols, all samples were washed with 5 ml of distilled water.

Next, each specimen was fixed to a microtensile test holder using cyanoacrylate glue (Loctite Super Bonder; Henkel Loctite Corporation, Rocky Hill, CT, USA) and subjected to a tensile load at 0.5 mm/min in a testing machine (EMIC DL 2000)

The cross-sectional area at the fracture site was measured with a digital caliper and the tensile strength (σ) was calculated using the following formula:

$$\sigma = F/A$$

In this formula, F (N) represents the force used and A (mm²) represents the area at the fracture site. The data obtained will be expressed in MPa.

The comparison of cohesive strength values of radicular dentin between groups was conducted through ANOVA, followed by Tukey's post-hoc test, with a significance level of 5%.

Fracture resistance test

For the fracture resistance test, 60 bovine teeth were used. The 60 roots were sectioned from the crowns using an Isomet 1000 precision cutter (Buehler, Illinois, United States) under constant cooling, obtaining straight roots of 15 mm in length. For standardization of the roots, reference markings were made on the root surfaces using an overhead projector pen, the location of which was determined using a digital

caliper ruler. The first mark was made 2 mm below the upper cut, the second mark was made 2 mm above the root apex, and the third mark at the midpoint between the two marks.

The root canals were instrumented with hand files and prepared with Largo burs that adapted to the root canal diameter. During this procedure, constant measurements were made with a digital caliper adapted for internal channels, until walls of 1 mm thickness were obtained in all roots, with distilled water used to remove material from root canal preparation. The roots were embedded in acrylic resin using cylindrical PVC plastic molds with ½ inch thickness and 20 mm height, maintaining a root exposure of 3 mm to simulate the biological space.

The obtained samples were randomly distributed into six groups, according to the tested irrigation protocols (n = 10), as previously described.

Using a syringe and a disposable needle (Descarpack, São Paulo, Brazil), the canals were filled with 2 mL of the tested substance, which remained in contact with the root canal walls for 30 minutes, renewed every 5 minutes, totaling 6 irrigation cycles. After the irrigation protocols, all samples were washed with 5 ml of distilled water and then dried with an aspiration cannula. The samples were positioned at the bottom of a Universal Testing Machine (EMIC DL 2000). A compressive load was applied vertically to the coronal surfaces of the roots at a loading speed of 1 mm/minute until fracture. The load at which fracture occurred was recorded and expressed in Newtons (N).

The comparison of fracture resistance values of root dentin among the groups was performed using ANOVA, followed by Tukey's post-hoc test, with a significance level of 5%.

Evaluation of dentin penetration

Thirty bovine anterior teeth were obtained for sample preparation. For sample fabrication, the coronal portion was sectioned from the amelocemental junction, and two markings were made for root standardization, one 2 mm below the cut and another 2 mm above the apex. The samples were instrumented in three thirds with Reciproc #50 file, and at each third, instrumentation was halted, and irrigation with 5 ml of distilled water was performed. After instrumentation, a final flush of the root canal was done with 5 ml of distilled water, followed by drying with absorbent paper points (Dentsply Maillefer). The apex was sealed with composite resin to prevent extrusion of the auxiliary chemical substance during irrigation.

Subsequently, the root canals were filled with crystal violet and kept at room temperature for 72 h. Crystal violet

was renewed every 12 h. Next, the root canals were flushed with 20 ml of 0.9% saline solution (Eurofarma, SP, Brazil).

The samples were randomly distributed into six groups, according to the tested irrigation protocols (n=5), as previously described.

Using a disposable syringe and a 25 x 0.7 mm needle (Descarpack, São Paulo, Brazil), the canals were filled to overflow with the tested substance, which remained in contact with the root canal walls for 30 minutes, renewed every 5 minutes, totaling 6 irrigation cycles. At the end of the irrigation protocols, all samples were flushed with 5 ml of distilled water and then dried with a suction cannula.

After the irrigation protocols, all specimens were sectioned perpendicular to their long axis at distances of 3 mm and 7 mm from the apex (Figure 10), using a diamond disk adapted to a low-speed cutting machine (Isomet 1000, São Paulo, SP, Brazil), resulting in three blocks (cervical,

middle, and apical). Manual polishing of dentin blocks was performed using water sandpapers with grits 400, 600, 1200 (3M do Brasil, Sumaré, SP, Brazil), respectively. Images of the most cervical surface of each block were captured with a stereomicroscope (LeicaM80; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

The extent of linear penetration of the tested solutions, in μm , into radicular dentin (crystal-stained and cleared on the surfaces of each dentin section = clear + area) was measured in four regions (M, D, V, and L), in the cervical, middle, and apical blocks of each root, using ImageJ software (National Institutes of Health, NIH, Bethesda, MD, USA). The average value of measurements from the four regions was considered the final value for each block, and the sum of the average values of each block determined the mean penetration value into dentin for each sample in each experimental group.

The comparison of values for penetration into radicular dentin among groups was conducted using ANOVA, followed by Tukey's post-hoc test, with a significance level of 5%.

Results

Microhardness analysis

The mean and standard deviation of microhardness values are presented in Table 1. According to the results of this study, it was observed that groups treated with distilled water and hypochlorous acid showed no significant difference in radicular dentin microhardness ($p>0.05$). However, groups treated with NaOCl demonstrated significant differences in dentin microhardness ($p<0.05$).

Table 1: Mean (standard deviation) of dentin microhardness values (pre-treatment and post-treatment) and percentage reduction in dentin microhardness after tested irrigation protocols.

Group	Pretreatment	Post-treatment	(%) reduction
DW	44.43 (5.94) ^{A,a}	43.21 (3.84) ^{A,a}	2.37 (0.99) ^A
NaOCl 1%	39.87 (1.87) ^{A,a}	34.17 (1.12) ^{B,b}	16.69 (1.82) ^B
NaOCl 2.5%	42.14 (3.49) ^{A,a}	30.05 (2.72) ^{C,b}	28.33 (1.07) ^C
NaOCl 5.25%	40.20 (4.18) ^{A,a}	25.64 (0.89) ^{D,b}	39.13 (3.04) ^D
HClO 250 ppm	40.35 (2.24) ^{A,a}	39.29 (1.91) ^{A,a}	2.32 (3.16) ^A
HClO 500 ppm	40.41 (3.61) ^{A,a}	39.98 (2.86) ^{A,a}	2.06 (2.94) ^A

* Different uppercase letters in the column indicate significant differences between groups ($p < 0.05$); different lowercase letters in the row indicate significant differences within groups ($p < 0.05$).

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

Analysis of flexural strength, cohesive strength and fracture resistance

The mean and standard deviation of mechanical test values are presented in Table 2. According to the results of this study, it was observed that in the flexural strength and cohesive strength tests, the control group and hypochlorous acid (HClO 250 and 500 ppm) showed no statistical difference between them ($p>0.05$). However, groups tested with NaOCl demonstrated a significant difference ($p<0.05$) when compared to the other substances. In the fracture resistance test, it can be observed that there was no statistical difference between the tested groups ($p>0.05$).

Table 2: Mean values (standard deviation) of flexural strength, cohesive strength, and fracture resistance of radicular dentin after tested irrigation protocols.

Group	Flexural strength	Cohesive strength	Fracture resistance
DW	9.26 (1.54) ^A	53.23 (4.89) ^A	257.26 (40.02) ^A

NaOCl 1%	8.74 (1.16) ^A	54.32 (5.98) ^A	302.55 (39.70) ^A
NaOCl 2.5%	5.57 (0.87) ^B	39.23 (2.71) ^B	313.41 (42.48) ^A
NaOCl 5.25%	4.94 (1.03) ^B	38.60 (2.82) ^B	258.29 (37.14) ^A
HClO 250 ppm	9.33 (1.79) ^A	46.20 (4.17) ^A	327.68 (34.96) ^A
HClO 500 ppm	8.16 (1.08) ^A	48.53 (3.45) ^A	257.63 (31.64) ^A

* Different uppercase letters in the column indicate significant differences between groups ($p < 0.05$); different lowercase letters in the row indicate significant differences within groups ($p < 0.05$).

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

Assessment of dentin penetration

The mean and standard deviation of the maximum penetration depth into dentinal tubules of the tested irrigation protocols are expressed in micrometers (μm) in Table 3.

According to the results of this study, the dentin penetration of the tested groups was statistically different

from the control group ($p < 0.05$), but without statistically significant differences among themselves ($p > 0.05$).

Table 3: Mean (standard deviation) of the maximum penetration depth (μm) into radicular dentinal tubules of the tested irrigation protocols.

Group	Maximum penetration depth (μm)
1. DW	00.00 (00.00) ^A
2. NaOCl 1%	104.00 (38.00) ^B
3. NaOCl 2.5%	117.00 (34.00) ^B
4. NaOCl 5.25%	125.00 (24.00) ^B
5. HClO 250ppm	123.00 (28.00) ^B
6. HClO 500ppm	106.00 (35.00) ^B

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

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

Discussion

Given the limitations of the auxiliary chemical substances currently used, there was a need to research new alternatives, aiming for better chemical and mechanical properties. Thus, in this study, a new substance obtained through an electrolytic device (Dentaqua) was investigated, and previous studies showed that it was as effective as sodium hypochlorite and chlorhexidine in bacterial reduction and presented less cytotoxicity to periapical tissues when compared to these substances (7).

The reduction of dentin microhardness results in a less resistant and more brittle substrate, propagating cracks through fatigue during cyclic stresses (8). Therefore, hardness determination can provide important evidence of the effects of irrigating solutions on dentin and, consequently, on its fracture resistance.

The mechanical tests in this study are important for evaluating the resistance of radicular dentin after the use of

different auxiliary chemical substances. Thus, the reduction in flexural strength results in less stress concerning the stress that the dental structure can be subjected to before fracture, and the reduction in cohesive strength interferes with hard connective tissues and the modulus of elasticity. Finally, the reduction in fracture resistance leads to the propagation of cracks and erosion in peritubular and intertubular dentin. Therefore, the modification of all these mechanical properties increases susceptibility to vertical root fracture, decreasing the longevity of the dental structure (9,10,11).

Regarding the samples, human substrate is often challenging to obtain in sufficient quantity and with adequate quality because teeth are usually extracted due to extensive carious lesions. Thus, alternative substrates have been proposed and used in dental research, such as bovine teeth (12). The use of bovine substrate for laboratory tests in dentistry has significantly increased in the last 30 years due

to its characteristics such as mechanical properties, mineral composition, and organic similarities to human teeth (13).

In this study, irrigation cycles were performed in the treatment of samples, as done by 14, 15. These cycles aimed to simulate the period in which auxiliary chemical substances come into contact with radicular dentin during conventional endodontic treatment to promote decontamination. Thus, thirty-minute cycles were used, renewing the substances every five minutes.

Over the years, studies have focused on evaluating the influence of endodontic irrigating solutions and chemical agents used on the mechanical properties of coronal and radicular dentin. Today, there are well-founded findings that these chemicals or solutions alter the dentin structure (16). The results of the microhardness test in this work showed that hypochlorous acid, like the control group, showed no post-treatment difference in samples. However, sodium

hypochlorite at 1%, 2.5%, and 5.25% significantly altered dentin microhardness, contradicting studies published by (17,18,19).

As you know, flexural strength reflects toughness (20), which is the ability of a material to withstand significant deformations before breaking. Cohesive strength refers to the dentin's ability to resist tensile forces without experiencing significant fractures or failures. The results of this study demonstrated that 250 and 500 ppm concentrations of hypochlorous acid did not significantly alter the samples; in contrast, sodium hypochlorite at 1%, 2.5%, and 5.25% showed statistically significant differences, results similar to those found 20.

Root fracture resistance and the durability of coronal restorations can play an important role in the survival of endodontically treated teeth (21). The results of this test

showed no difference among any of the tested groups, similar to the findings described in 20.

The long-term success of endodontic therapy depends on the complete removal of microorganisms and their by-products. This can be effectively achieved by the ability of irrigants and auxiliary chemicals to penetrate dentinal tubules, which is limited in conventional mechanical debridement of the root canal system (23). Thus, the dentin-penetrating ability of hypochlorous acid was tested in this study compared to sodium hypochlorite, and the result was that there was no difference between the two substances. This demonstrates further advancement in the testing of this new material and the potential use of hypochlorous acid in conventional endodontic treatment.

Two concentrations of hypochlorous acid were tested in this study, and it was concluded that there was no significant difference in the results of the experiments using

HOCl 250 ppm or 500 ppm. However, in Souza et al.'s work (2023), which assessed the antimicrobial action and cytotoxicity of the same substance, it was found that as the concentration increased, there was an improvement in antimicrobial potential, but, conversely, cell viability decreased, demonstrating that a higher concentration generates cytotoxic potential.

In light of the above, it is worth emphasizing the clinical importance of this study, given the need to explore new alternatives for the auxiliary chemicals used during endodontic therapy. The test results were satisfactory, proving that hypochlorous acid obtained through an electrolytic device has mechanical properties superior to sodium hypochlorite. Despite the advantages presented, further studies should be conducted to assess the *in vivo* characteristics of hypochlorous acid in clinical practice.

Conclusion

Despite the limitations of this study, it can be concluded that hypochlorous acid obtained from an electrolytic device had no influence on microhardness, as well as flexural, cohesive, and fracture resistance, in addition to presenting satisfactory dentin-penetrating capability.

Compliance with Ethical Standards

Conflict of Interest: The authors have no conflict of interest.

Ethical Approval: All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed.

Funding: This work had no financial support.

Informed consent: Informed consent is not applicable.

Authors' contributions section

M.A.S. Performed the supervision of all experimental tests

C. B. F. Performed all experimental tests

C. P. Performed flexural strenght test

A. B. Z. Performed cohesive strenght test

N. M. P. Performed microhardness test

V.. Performed resistance a fracture test

L. R. Performed dentin penetration test

References

1. Virdee SS, Farnell DJJ, Silva MA, Camilleri J, Cooper PR, Tomson PL. The influence of irrigant activation, concentration and contact time on sodium hypochlorite penetration into root dentine: an ex vivo experiment. *Int Endod J.* 2020;53(7):986-997.
2. Tartari T, Bachmann L, Zancan RF, Vivan RR, Duarte MAH, Bramante CM. Analysis of the effects of several decalcifying agents alone and in combination with sodium hypochlorite on the chemical composition of dentine. *Int Endod J.* 2018;51 Suppl 1:e42-e54.
3. Cardoso LR, Baldasso FER, Delai D, Montagner F, Kopper PMP. Effect of EDTA, sodium, and calcium hypochlorite on the inorganic component of root canal dentin: A SEM analysis. *Microsc Res Tech.* 2019;82(2):128-133.

4. Block MS, Rowan BG. Hypochlorous Acid: A Review. *J Oral Maxillofac Surg.* 2020;78(9):1461-1466.
5. VANIN, G. N. Avaliação da ação antimicrobiana e citotoxicidade de solução de ácido hipocloroso obtida a partir de um dispositivo eletrolítico em comparação com diferentes concentrações de hipoclorito de sódio. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Faculdade de odontologia, Universidade de Passo Fundo. Passo Fundo, 2023.
6. ZANELLA, M. Avaliação da ação antimicrobiana e toxicidade do ácido hipocloroso obtido a partir de dispositivo eletrolítico em canais radiculares infectados com *Enterococcus faecalis*. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Faculdade de odontologia, Universidade de Passo Fundo. Passo Fundo, 2023.
7. Souza MA, Ricci R, Bischoff KF, et al. Effectiveness of ultrasonic activation over glycolic acid on microhardness, cohesive strength, flexural strength, and fracture resistance of the root dentin. *Clin Oral Investig.* 2023;27(4):1659-1664.

8. Kruzic JJ, Ritchie RO. Fatigue of mineralized tissues: cortical bone and dentin. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2008;1(1):3-17.
9. Sideridou ID, Karabela MM, Bikiaris DN. Aging studies of light cured dimethacrylate-based dental resins and a resin composite in water or ethanol/water. *Dent Mater.* 2007;23(9):1142-1149.
10. Marending M, Paqué F, Fischer J, Zehnder M. Impact of irrigant sequence on mechanical properties of human root dentin. *J Endod.* 2007;33(11):1325-1328.
11. Uzunoglu E, Yilmaz Z, Erdogan O, Görduysus M. Final Irrigation Regimens Affect Fracture Resistance Values of Root-filled Teeth. *J Endod.* 2016;42(3):493-495.
12. Penelas AG, da Silva EM, Poskus LT, et al. Development and characterization of biological bovine dentin posts. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2019;92:197-205.
13. Fonseca RB, Haiter-Neto F, Carlo HL, et al. Radiodensity and hardness of enamel and dentin of human and bovine teeth, varying bovine teeth age. *Arch Oral Biol.* 2008;53(11):1023-1029.

14. Ghisi AC, Kopper PM, Baldasso FE, et al. Effect of super-oxidized water, sodium hypochlorite and EDTA on dentin microhardness. *Braz Dent J*. 2014;25(5):420-424.
15. Slutzky-Goldberg I, Liberman R, Heling I. The effect of instrumentation with two different file types, each with 2.5% NaOCl irrigation on the microhardness of root dentin. *J Endod*. 2002;28(4):311-312.
16. Baruwa AO, Martins JNR, Maravic T, Mazzitelli C, Mazzoni A, Ginjeira A. Effect of Endodontic Irrigating Solutions on Radicular Dentine Structure and Matrix Metalloproteinases-A Comprehensive Review. *Dent J (Basel)*. 2022;10(12):219.
17. Keine KC, Kuga MC, Coaguila-Llerena H, Palma-Dibb RG, Faria G. Peracetic acid as a single endodontic irrigant: effects on microhardness, roughness and erosion of root canal dentin. *Microsc Res Tech*. 2020;83(4):375-380.
18. Garcia AJ, Kuga MC, Palma-Dibb RG, et al. Effect of sodium hypochlorite under several formulations on root canal dentin microhardness. *J Invest Clin Dent*. 2013;4(4):229-232.

19. Baldasso FER, Roletto L, Silva VDD, Morgental RD, Kopper PMP. Effect of final irrigation protocols on microhardness reduction and erosion of root canal dentin. *Braz Oral Res.* 2017;31:e40.
20. Wang TF, et al. Effects of different concentrations and exposure time of sodium hypochlorite on the structural, compositional and mechanical properties of human dentin. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2017;37(4):568-576.
21. Pedersen ND, Uzunoglu-Özyürek E, Dogan Buzoglu H. Influence of different irrigation protocols on microhardness and flexural strength values of young and aged crown dentin. *Gerodontology.* 2020;37(1):53-58.
22. Souza MA, Lago BLT, Pletsch A, et al. Association of calcium hypochlorite, reciprocating instrumentation and photodynamic therapy: Antimicrobial analysis and effects on root dentin structure. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2020;29:101625.
23. Arathi G, Rajakumaran A, Divya S, Malathi N, Saranya V, Kandaswamy D. Comparison of

penetrating depth of chlorhexidine and chitosan into dentinal tubules with and without the effect of ultrasonic irrigation. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2019;23(3):389-392.