



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

RODRIGO FERNANDES CABRAL PAIS FERRAZ
VINICIUS CLEMENTE DA ROCHA

AÇÃO ANTIMICROBIANA DA CLOREXIDINA GEL E LÍQUIDA E DO
HIPOCLORITO DE SÓDIO

2013

**RODRIGO FERNANDES CABRAL PAIS FERRAZ
VINICIUS CLEMENTE DA ROCHA**

**AÇÃO ANTIMICROBIANA DA CLOREXIDINA GEL E LÍQUIDA E DO
HIPOCLORITO DE SÓDIO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Odontologia do Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Campus de São José dos Campos, como parte das exigências para obtenção do grau de CIRURGIÃO-DENTISTA.

Orientador: Prof. Adj. Claudio Antônio Talge Carvalho
Co-Orientadora: Prof. Tit. Marcia Carneiro Valera

São José dos Campos
2013

AUTORIZAÇÃO

Autorizamos a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte.

São José dos Campos, 18 de setembro de 2013.

Rodrigo Fernandes Cabral Pais Ferraz

Assinatura: _____

Vinicius Clemente da Rocha

Assinatura: _____

E-mail: viniciuscrocha89@gmail.com; kbral_tjvale@hotmail.com

BANCA EXAMINADORA

Prof. Adj. Claudio Antonio Talge Carvalho (Orientador)

Departamento de Odontologia o Restauradora

Prof. Adj. Carlos Henrique Ribeiro Camargo

Departamento de Odontologia o Restauradora

Prof. Dr. Eduardo Bresciani

Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal

São José dos Campos, 09 de setembro de 2013.

DEDICATÓRIA

Parece que foi ontem o meu primeiro dia na faculdade. Não sabia de nada. Sabia pouquíssimo sobre dentes e na verdade, não sabia o que esperar do curso de Odontologia. Agora, anos depois, posso dizer que sei bastante sobre odontologia e mais ainda sobre dentes. Sou quase um dentista. Um aluno prestes a concluir sua faculdade e se tornar um profissional.

Inúmeras pessoas passaram em minha vida ao longo desses anos. Algumas muito importantes, outras nem tanto. Mas tem aquelas que são insubstituíveis em minha vida e é para elas que eu dedico mais esse degrau conquistado em minha trajetória. Não posso dizer que estou terminando de subir essa escada difícil e com diversos obstáculos. Mas posso dizer que não estou mais em seu começo.

Meu eterno agradecimento e reconhecimento de que, sem eles, eu não teria como chegar aonde eu cheguei. À minha mãe e a meu pai, por sua eterna dedicação, esforço, carinho e ajuda. Essa minha vitória também é de vocês. Ao meu irmão Michel e à minha irmã Viviane, pelos seus conselhos e companheirismo. À minha tia Maria, por sua receptividade, carinho e cuidado desde o primeiro dia em que vim morar em São José dos Campos. Ao meu padrasto Tavares e à minha madrastra Adriana, pelo apoio e animação de vocês. Ao meu grande amigo e primo Felipe Rocha, por sua amizade em todos os momentos.

Dedico também aos meus queridos amigos que me acompanharam e lutaram junto comigo durante esses anos na faculdade. À minha dupla e grande amigo Rodrigo Cabral, deixo um agradecimento especial e desejo de muito sucesso em sua carreira.

Meus agradecimentos ao corpo docente e funcionários da UNESP - São José dos Campos, por todos os ensinamentos, lições e conselhos. Hoje, levo o conhecimento que me foi dado por vocês com maestria e me comprometo a passar esses ensinamentos à diante. Em particular, agradeço a ajuda incansável da Professora Márcia Valera e do Professor Cláudio e das pós-graduandas Nádia Ferreira, Flávia Cardoso e Tereza Pedrosa, ajuda essa que fez com que esse trabalho pudesse sair do papel.

Por fim, Àquele que me permitiu conquistar tudo o que até hoje conquistei. Meu maior mestre e Àquele que eu amo acima de todas as coisas. Obrigado meu Deus, por todas as Suas bênçãos não só nesse período da Universidade, mas por toda a minha vida. Sei que todas as minhas vitórias foram-me concedidas por Seu infinito amor.

Vinicius Clemente da Rocha

DEDICATÓRIA

Quero agradecer, em primeiro lugar, a Deus, pela força e coragem durante toda esta longa caminhada.

Agradeço também aos professores Cláudio Talge e Márcia Valera e as meninas da pós graduação Flávia Cardoso, Tereza Pedrosa e Nádia Ferreira, responsáveis pela ajuda na realização deste trabalho.

Dedico esta, bem como todas as minhas demais conquistas a minha amada família (Pais, irmão, avó e tia) e também aos meus queridos avós que do céu me iluminam e protegem.

Aos amigos, deixo meu grande abraço e a promessa de que nossa amizade continuará firme e forte por mais muitos anos. A você, Vinícius Clemente deixo um agradecimento especial por toda ajuda e amizade não somente durante este TCC mas por todos anos de faculdade.

E por fim, agradeço com um imenso beijo a minha amada namorada Daniele C. do Prado que mesmo de fora da faculdade foi fundamental na construção da minha vida acadêmica, compreendendo-me e alegrando-me por todos estes anos.

Um grande abraço a todos. Muito obrigado.

Rodrigo F. C. P. Ferraz

“Não cruze os braços diante de uma dificuldade, pois o maior homem do mundo morreu de braços abertos...”

Bob Marley

Ação Antimicrobiana da clorexidina gel e líquida e do hipoclorito de sódio

Antimicrobial action of chlorhexidine gel and liquid and sodium hypochlorite

RESUMO

A proposta deste trabalho foi avaliar *in vitro* a atividade antimicrobiana da clorexidina gel e líquida 2%, e do hipoclorito de sódio 2% sobre *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* em canais radiculares. Para isto, foram utilizados 40 dentes humanos unirradiculados, que foram divididos em 4 grupos (n=10), de acordo a substância química auxiliar utilizada: 1) clorexidina líquida 2%, 2) clorexidina gel 2%, 3) hipoclorito de sódio 2%, e 4) solução salina fisiológica (controle). Foram realizadas coletas do conteúdo do canal radicular imediatamente após a instrumentação e após 7 dias do preparo biomecânico. Para as coletas foi realizado a avaliação da atividade antimicrobiana e os resultados foram submetidos à análise estatística de *Kruskal-Wallis* e teste de *Dunn* com significância de 5%. Verificou-se que a clorexidina gel e líquida bem como o hipoclorito de sódio foram efetivos contra os microrganismos testados.

PALAVRAS - CHAVE

Clorexidina; Hipoclorito de sódio; Microrganismos;

ABSTRACT

The purpose of this study was to evaluate in vitro antimicrobial activity of chlorhexidine gel and liquid 2%, and 2% sodium hypochlorite on *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* in root canals. For this, we used 40 human single-rooted teeth were divided into 4 groups (n = 10) according to assist the chemical used: 1) 2% chlorhexidine liquid, 2) 2% chlorhexidine gel, 3) sodium hypochlorite 2%, and 4) physiological saline (control). Content were collected immediately after root canal instrumentation and after 7 days of biomechanical. For the samples was conducted to evaluate the antimicrobial activity and the results were subjected to statistical analysis of Kruskal-Wallis and Dunn's test with a significance of 5%. It was found that chlorhexidine gel and liquid as well as sodium hypochlorite were effective against the microorganisms tested.

KEYWORDS

Chlorhexidine; Sodium hypochlorite; Microorganism

1 INTRODUÇÃO

A limpeza dos canais radiculares ocorre por meio da ação mecânica dos instrumentos endodônticos associada às propriedades químicas e físicas das substâncias químicas auxiliares que, devido a ampla ação antimicrobiana, capacidade de dissolver tecidos e redução de endotoxinas [1,3], promovem a diminuição de agentes irritantes como bactérias e seus subprodutos, restos de tecido pulpar e dentina contaminada, proporcionando um ambiente favorável ao reparo dos tecidos periapicais [4,5].

Inúmeras substâncias químicas auxiliares vêm sendo utilizadas durante o preparo biomecânico dos canais radiculares, sendo que o hipoclorito de sódio em diferentes concentrações [6] é a mais utilizada e aceita mundialmente pelos endodontistas devido às suas propriedades de clarificação, dissolução de tecido orgânico, saponificação, desodorização e eficiente ação antimicrobiana [6-8]. No entanto, pode ser irritante para os tecidos periapicais, principalmente quando utilizado em altas concentrações [3,8,9].

Outra substância química auxiliar utilizada durante o preparo biomecânico é a clorexidina que possui ação antimicrobiana de amplo espectro uma vez que, sendo uma molécula com carga positiva, liga-se à superfície bacteriana carregada negativamente por ação eletrostática, promovendo adsorção na superfície bacteriana [10,11]. Outra propriedade importante da clorexidina é a substantividade, que refere-se à capacidade de ligar-se à superfície do esmalte, da dentina e de glicoproteínas e deslocar-se para o meio quando sua concentração diminui, de forma a manter seu efeito

por tempo prolongado [11].

Para que a substância química auxiliar consiga penetrar nos túbulos dentinários, é necessário que ele tenha uma boa capacidade de molhamento. A molhabilidade de uma solução depende da sua tensão superficial [12], que pode inibir a propagação de um líquido sobre uma superfície ou limitar a sua capacidade de penetrar em um túbulo dentinário. A eficiência de uma substância química poderia, portanto, ser melhorada através da redução da sua tensão superficial [13,14]. Pela melhoria da molhabilidade, um irrigante pode ter maior capacidade de dissolver matéria orgânica e também melhor função bactericida [13]. Com isso, o uso de substâncias químicas auxiliares que possuem em sua fórmula a adição de substâncias tensoativas pode apresentar uma melhora em sua função [8]. Clarkson et al. (2012) [8] mostraram que tem sido dada pouca atenção a esta interação até o momento, provavelmente devido à dificuldade em identificar um agente tensoativo apropriado.

Assim, este trabalho avaliará a atividade antimicrobiana e sobre endotoxinas da clorexidina gel e líquida 2%, hipoclorito de sódio 2% com o objetivo de diminuir a tensão superficial e assim aumentar a ação antimicrobiana e sobre endotoxinas.

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana de diferentes substâncias químicas auxiliares utilizadas durante o tratamento endodôntico.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi enviado ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP.

Preparo dos espécimes

Foram utilizados 40 dentes humanos unirradiculados recém-extraídos de consultórios particulares que, após a exodontia foram limpos e imersos em solução fisiológica até o momento do uso. A seleção dos dentes foi feita baseada nas dimensões e similaridade morfológica da raiz. As coroas foram seccionadas com disco de carborundum, padronizando o comprimento dos espécimes em $16\pm 0,5$ mm.

A instrumentação inicial dos canais radiculares foi realizada em toda a sua extensão, desde seu diâmetro anatômico até a lima tipo Kerr nº 30 (Dentsply Ind. Com. Ltda, Petrópolis, RJ, Brasil). Os canais foram irrigados com 3 mL de solução salina fisiológica a cada troca de instrumento. Após o preparo inicial, os canais foram preenchidos com EDTA (Inodon, Porto Alegre, RS, Brasil) por 3 minutos e irrigados com 10 mL de solução salina fisiológica. Em seguida, foi feito vedamento da região apical dos dentes com resina composta fotopolimerizável Z-100 (3M, Saint Paul, USA) e as raízes impermeabilizadas externamente com uma camada de adesivo epóxi (Brascola, São Paulo, SP, Brasil), exceto a região da abertura cervical.

Os espécimes foram distribuídos aleatoriamente em placas de cultura celular de 24 poços (TPP, Switzerland), com 10 dentes em cada e fixados com resina acrílica quimicamente ativada (Dencor - Artigos Odontológicos Clássico, São Paulo, SP, Brasil). As placas foram tampadas e

embaladas. Estas placas e todos os materiais utilizados foram esterilizados por radiação gama com cobalto 60 (20 KGy por 6 horas) para neutralizar endotoxinas pré-existentes.

Contaminação dos espécimes

Os microrganismos utilizados foram *Candida albicans* (ATCC 18804), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) e *Escherichia coli* (ATCC 25922) que foram semeados em placas de Petri contendo ágar Sabouraud Dextrose (Himedia Laboratories, Mumbai, Índia) para *C. albicans* e ágar infuso-cérebro-coração (BHI) (Himedia Laboratories, Mumbai, Índia) para *E. faecalis* e *E. coli*. Em seguida, as placas foram incubadas em estufa microbiológica a $37^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas (*C. albicans* e *E. coli*) e 48 horas (*E. faecalis*). A partir do crescimento nas placas, foram preparadas suspensões em solução salina fisiológica estéril e apirogênica contendo 10^6 céls/mL com leitura em espectrofotômetro. Em ambiente estéril (câmara de fluxo laminar), todos os canais radiculares foram contaminados primeiramente com 10 μl da suspensão de *E. coli* e 10 μl de caldo BHI (Himedia Laboratories, Mumbai, Índia). Após 7 dias, os canais radiculares foram contaminados com 5 μl da suspensão de *E. faecalis*, 5 μl da suspensão de *C. albicans* e 10 μl de caldo BHI. Na entrada dos canais foi colocada uma bolinha de algodão apirogênica embebida em caldo BHI. Os espécimes foram mantidos em estufa a $37^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$, em umidade relativa, por 28 dias, sendo que a cada 3 dias, foi adicionado meio de cultura (caldo BHI) no interior dos canais radiculares. Após o período de contaminação (28 dias), foi realizada coleta de todas as amostras dos espécimes para confirmação da contaminação dos canais radiculares.

Grupos experimentais

Após a confirmação da contaminação, os canais radiculares foram instrumentados com o kit de limas rotatórias Mtwo (702) e os espécimes foram divididos de acordo com a substância química auxiliar utilizadas durante o preparo biomecânico (n=10) (quadro 1). Imediatamente após o preparo biomecânico foi realizada a **1ª coleta**. Em seguida, os canais foram preenchidos com EDTA 17% durante 3 minutos e irrigados com 10 mL de solução salina fisiológica estéril e apirogênica. Os dentes foram preenchidos com solução salina fisiológica e apirogênica e mantidos por 7 dias em estufa a $37^{\circ}\pm 1^{\circ}$ C. Após esse período foi realizada a **2ª coleta**.

Quadro 1: Divisão dos grupos experimentais de acordo com as substâncias químicas auxiliares utilizadas durante o preparo biomecânico.

Grupo	N	Substância Química Auxiliar
CLX liq 2%	10	Clorexidina líquida 2%
CLX gel 2%	10	Clorexidina gel 2%
NaOCI 2%	10	Hipoclorito de Sódio 2%
SS (Controle)	10	Solução Salina Fisiológica

Coletas do conteúdo do canal radicular

Todas as coletas dos canais radiculares (coleta de confirmação, 1ª coleta: imediatamente após a instrumentação, 2ª coleta: imediatamente após 7 dias da instrumentação) foram realizadas da mesma forma: os canais foram preenchidos com solução fisiológica apirogênica e foram coletados 100 µl do conteúdo do canal radicular com auxílio de seringas tipo insulina de 1 mL, os quais foram transferidos para tubos tipo *ependorf* contendo 900 µl de solução fisiológica apirogênica. Para todas as amostras coletadas, foram realizados testes microbiológicos e quantificação de endotoxinas para verificar presença de microrganismos e endotoxinas nos canais radiculares.

Avaliação da atividade antimicrobiana

Alíquotas de 100 µl de todas as amostras foram semeadas, em duplicata, em três diferentes meios de cultura, seletivo para cada microrganismo:

Ágar Sabouraud Dextrose com cloranfenicol para *Candida albicans*;

Ágar Enterococcosel para *Enterococcus faecalis*;

Ágar McConkey para *Escherichia coli*.

As placas foram mantidas em estufa a 37°C por 48 horas, para determinação de UFC/mL. Em todas as coletas, a atividade antimicrobiana dos tratamentos foi avaliada pela contagem de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) de *C. albicans*, *E. faecalis* e *E. coli* remanescentes no canal radicular.

Análise dos Resultados

Os resultados foram submetidos à análise estatística de *Kruskal-Wallis*, com nível de significância de 5%, e pelo teste de *Dunn*.

4 RESULTADOS

Pôde-se verificar crescimento microbiano em todos os espécimes na coleta de confirmação. A tabela 1 mostra os valores de média e desvio-padrão de CFU/mL obtidos na coleta de confirmação.

Tabela 1 - valores de média e desvio-padrão de CFU/mL obtidos na coleta de confirmação, segundo a solução irrigadora e o microrganismo

Grupos	Coleta de confirmação						
	<i>C. albicans</i>		<i>E. faecalis</i>		<i>E. coli</i>		
	n	Média	Desvio-padrão	Média	Desvio-padrão	Média	Desvio-padrão
CLX Gel	10	9150	7020	5632400	2867276	5316000	2641511
CLX Liq	10	10110	13511	3794800	3055839	3676000	2548722
NaOCl	10	4144	6588	3677280	4179557	2198960	2116878
SS	10	3867	4803	1941720	2333103	932800	230542

A estatística realizada neste estudo foi baseada nos percentuais de redução de UFC/mL obtidos nas 1^a e 2^a coletas (após preparo com diferentes substâncias químicas auxiliares e 7 dias após o preparo) comparadas à coleta de confirmação. Os dados foram analisados pelo teste estatístico de Kruskal-Wallis e teste de Dunn (nível de significância 5%) e encontram-se nas tabelas 2 e 3.

Tabela 2 - Percentuais de redução (mediana em porcentagem referente à diminuição de UFC/mL de *C. albicans*, *E. faecalis*, *E. coli*) obtidos na 1ª coleta em relação à coleta de confirmação e grupos homogêneos.

Grupos	Coleta de confirmação x 2ª coleta						
	<i>C. albicans</i>			<i>E. faecalis</i>		<i>E. coli</i>	
	n	Median a	Grupos homogêneo s*	Median a	Grupos homogêneo s*	Median a	Grupos homogêneo s*
CLX Gel	10	100	A	100	A	100	A
CLX Liq	10	100	A	100	A	100	A
NaOCl	10	100	A	100	A	100	A
SS	10	91.0	B	87.02	B	96.542	B

*letras diferentes significam diferença estatisticamente significantes (p<0,05)

Tabela 3 - Percentuais de redução (mediana em porcentagem referente à diminuição de UFC/mL de *C. albicans*, *E. faecalis*, *E. coli*) obtidos na 2ª coleta em relação à coleta de confirmação e grupos homogêneos.

Grupos	Coleta de confirmação x 3ª coleta						
	<i>C. albicans</i>			<i>E. faecalis</i>		<i>E. coli</i>	
	n	Median a	Grupos homogêneo s*	Median a	Grupos homogêneo s*	Median a	Grupos homogêneo s*
CLX Gel	10	100	A	100	A	100	A
CLX Liq	10	100	A	100	A	100	A
NaOCl	10	100	A	100	A	100	A
SS	10	90	B	95.3	B	98.02	B

*letras diferentes significam diferença estatisticamente significantes (p<0,05)

5 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo mostraram que as soluções testadas apresentaram efetividade contra os microrganismos testados, em todas as coletas após os preparo. A irrigação dos canais radiculares com 2,5% de hipoclorito de sódio ou clorexidina gel 2% durante o processo de instrumentação, resultou em coleções microbiológicas negativo imediatamente pós-instrumentação e também para o período de sete dias de pós-instrumentação. Isto mostra que as substâncias são capazes de eliminar *E. Faecalis*, *C. Albicans* e *E. coli*. (Valera, et al. 2009, 2010) também avaliou NaOCl 1% e 2% de clorexidina e verificaram esta efetividade.

O hipoclorito de sódio (NaOCl) é uma das soluções irrigadoras mais utilizadas, devido à sua ação antimicrobiana e excelente capacidade de dissolução de tecido orgânico, quando utilizado em concentrações acima de 0,5%. Entretanto, embora as soluções de hipoclorito de sódio apresentem atividade antimicrobiana e grande capacidade de penetração na dentina, seu efeito após 7 dias ainda é duvidoso [17]. Entretanto, no presente estudo verificou-se que o NaOCl apresentou ação antimicrobiana imediata e pós 7 dias.

Verificou-se também que a clorexidina gel e a clorexidina líquida 2% apresentaram ação antimicrobiana satisfatória contra os microrganismos, resultando em crescimento microbiológico próximos de zero ou mínimo. A Clorexidina possui efeito residual e mesmo após sete dias do preparo biomecânico este efeito persistiu indicando coletas negativas do conteúdo do

canal radicular. Estudos anteriores utilizando Clorexidina gel 2% como substância química para auxiliar ao preparo biomecânico mostraram a sua eficácia contra os microrganismos presentes no canal radicular [9,16].

A Clorexidina age por interação eletrostática, isto é, ela é carregada positivamente e a parede bacteriana carregada negativamente. Esta interação aumenta a permeabilidade da parede celular, permitindo a coagulação do citoplasma bacteriano o que resulta na morte da celular [6].

Assim, no presente estudo o NaOCl e a Clorexidina gel e líquida, mostraram ação antimicrobiana satisfatória contra os microrganismos testados.

6 CONCLUSÃO

Conclui-se que todas as soluções testadas apresentaram efeito antimicrobianos reduzindo significativamente os microrganismos do interior dos canais radiculares.

7 REFERÊNCIAS

1. Abou-Rass M, Patonai FJ, Jr. The effects of decreasing surface tension on the flow of irrigating solutions in narrow root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1982 May;53(5):524-6.
2. Baratto-Filho F, de Carvalho JR, Jr., Fariniuk LF, Sousa-Neto MD, Pecora JD, da Cruz-Filho AM. Morphometric analysis of the effectiveness of different concentrations of sodium hypochlorite associated with rotary instrumentation for root canal cleaning. *Braz Dent J.* 2004;15(1):36-40.
3. Cameron JA. The effect of a fluorocarbon surfactant on the surface tension of the endodontic irrigant, sodium hypochlorite. A preliminary report. *Aust Dent J.* 1986 Oct;31(5):364-8.
4. Clarkson RM, Kidd B, Evans GE, Moule AJ. The effect of surfactant on the dissolution of porcine pulpal tissue by sodium hypochlorite solutions. *J Endod.* 2012 Sep;38(9):1257-60.
5. Dametto FR, Ferraz CC, Gomes BP, Zaia AA, Teixeira FB, de Souza-Filho FJ. In vitro assessment of the immediate and prolonged antimicrobial action of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant against *Enterococcus faecalis*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005 Jun;99(6):768-72.

6. Ercan E, Ozekinci T, Atakul F, Gul K. Antibacterial activity of 2% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite in infected root canal: in vivo study. *J Endod.* 2004;30(2):84-7.
7. Ferreira RB, Alfredo E, Porto de Arruda M, Silva Sousa YT, Sousa-Neto MD. Histological analysis of the cleaning capacity of nickel-titanium rotary instrumentation with ultrasonic irrigation in root canals. *Aust Endod J.* 2004 Aug;30(2):56-8.
8. Glantz PO, Hansson L. Wetting of dentine by some root canal medicaments. *Odontol Revy.* 1972;23(2):205-10.
9. Jeansonne MJ, White RR. A comparison of 2,0% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite as antimicrobial endodontic irrigants. *J Endod.* 1994;20(6):275-8.
10. Oliveira LD, Leao MV, Carvalho CA, Camargo CH, Valera MC, Jorge AO, et al. In vitro effects of calcium hydroxide and polymyxin B on endotoxins in root canals. *J Dent.* 2005 Feb;33(2):107-14.
11. Siqueira JF, Jr., Araujo MC, Garcia PF, Fraga RC, Dantas CJ. Histological evaluation of the effectiveness of five instrumentation techniques for cleaning the apical third of root canals. *J Endod.* 1997 Aug;23(8):499-502.
12. Siqueira JF, Jr., Rocas IN, Favieri A, Lima KC. Chemomechanical reduction of the bacterial population in the root canal after instrumentation and irrigation with 1%, 2.5%, and 5.25% sodium hypochlorite. *J Endod.* 2000 Jun;26(6):331-4.

13. Spano JC, Barbin EL, Santos TC, Guimaraes LF, Pecora JD. Solvent action of sodium hypochlorite on bovine pulp and physico-chemical properties of resulting liquid. *Braz Dent J.* 2001;12(3):154-7.
14. Vianna ME, Gomes BP, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, de Souza-Filho FJ. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004 Jan;97(1):79-84
15. Valera MC; Chung A; Menezes MM; Fernandes CE; Carvalho CAT; Camargo SEA ; Camargo CHR. Scanning electron microscope evaluation of chlorhexidine gel and liquid associated with sodium hypochlorite cleaning on the root canal walls. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010 5: 5-8.
16. Valera MC; da Silva KCG; Maekawa LE; Carvalho CAT; Koga-Ito; Camargo CHR; Lima, RS. Antimicrobial activity of sodium hypochlorite associated with intracanal medication for *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis* inoculated in root canals. *J Appl Oral Sci.* 2009;17(6):555-9.
17. Valera MC, de Moraes Rego J, Jorge AO. Effect of sodium hypochlorite and five intracanal medications on *Candida albicans* in root canals. *J Endod.* 2001 Jun;27(6):401-3.
18. Valera MC; Rosa JA; Maekawa LE; Oliveira LD; Carvalho CAT; Koga-ito CY; Jorge AOC. Action of propolis and medications against *Escherichia coli* and endotoxin in root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010, 110: 70-74.

19. Zehnder M. Root canal irrigants. J Endod. 2006 May;32(5):389-98
20. Waltimo T, Trope M, Haapasalo M, Orstavik D. Clinical efficacy of treatment procedures in endodontic infection control and one year follow-up of periapical healing. J Endod. 2005 Dec;31(12):863-6.