

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

MANUELA FAVARIN SANTINI

O EFEITO DO ETANOL NA AÇÃO ANTIMICROBIANA DA CLOREXIDINA SOBRE
BIOFILME ORAL

Porto Alegre

2014

MANUELA FAVARIN SANTINI

O EFEITO DO ETANOL NA AÇÃO ANTIMICROBIANA DA CLOREXIDINA SOBRE
BIOFILME ORAL

Trabalho de Conclusão apresentado ao Curso de Especialização em Endodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do título de Especialista em Endodontia
Orientador: Marcus Vinícius Reis Só

Porto Alegre

2014

Dedico este trabalho...

Aos meus pais, Elio e Jussara, por me proporcionarem condições emocionais e financeiras para eu seguir adiante, estudando. Vocês são a razão de todo o meu esforço e comprometimento.

À minha irmã Renata, pela amizade e incentivo.

Ao meu namorado Diogo, pela paciência e pelo apoio incondicional em minhas decisões.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, **Marcus Vinícius Reis Só**, obrigada pela oportunidade e pelos ensinamentos durante o curso. Obrigada por nunca ter medido esforços para me proporcionar as melhores condições de pesquisa e por, além de ter sido meu orientador, ter se tornado um grande amigo.

Ao **Ricardo**, meu amigo e colega de Doutorado, muito obrigada pelo auxílio, tanto na parte experimental quanto na escrita deste trabalho. Sem a tua ajuda, finalizar esta etapa teria sido mais difícil.

À **Mirela**, que juntamente com o Ricardo, tornaram a minha mudança para Porto Alegre muito mais divertida. Lembrarei com carinho do nosso convívio no apartamento e na especialização.

À secretária do curso, **Andréia**, pela dedicação incansável para o bom andamento do curso, nunca se negando a ajudar, sempre atenciosa com os pacientes e prestativa com alunos e professores. Tu és uma "supersecretária", que exerce funções além de teu dever, sempre com muita disposição e competência. "Déinha", obrigada pelo carinho e pela amizade que construímos.

A todos os **professores do curso de especialização**, Augusto Bodanezi, Fabiana Grecca, Francisco Montagner, João Ferlini Filho, Patricia Kopper Móra, Regis Burmeister dos Santos, Simone Luisi, pelas importantes contribuições no meu aprendizado. Minha escolha por este curso de especialização foi feita em função da qualidade desta equipe de professores, que se empenha para que os alunos tenham acesso ao que existe de melhor dentro da Endodontia. Obrigada pela dedicação, pelo companheirismo e por nos receberem tão bem.

Às minhas **colegas de curso**, Andressa, Caáyari, Caroline, Celina, Fabiana, Flávia, Gabrielle, Márcia, Marta e Sandra, pelos momentos de descontração e alegria. Foi um prazer conviver esse dois anos com vocês.

Aos **pacientes**, pela paciência e colaboração.

RESUMO

SANTINI, M. F. **O efeito do etanol na ação antimicrobiana da clorexidina sobre biofilme oral.** 2014. 21f. Trabalho de Conclusão (Especialização) - Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

A fim de evitar a formação de um precipitado marrom-alaranjado, resultado da reação entre o hipoclorito de sódio (NaOCl) e a clorexidina, deve-se utilizar uma solução intermediária. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do etanol 95% sobre a ação antimicrobiana da clorexidina 2% frente ao biofilme oral, por meio da análise em microscopia confocal de varredura à laser (MCVL). A formação de biofilme oral foi induzida sobre 40 blocos de dentina bovina, fixados em um dispositivo intraoral. Os blocos foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos (n = 7): Soro - soro fisiológico (5 min), Soro/ CHX - soro fisiológico (5 min) + clorexidina (5 min); Etanol - etanol (5 min); Etanol/ CHX: etanol (5 min) + clorexidina (5 min). A superfície dos blocos foi corada com *Live/Dead® BacLight* para análise em MCVL. Imagens de três áreas de cada bloco foram obtidas e analisadas pelo programa BioImage_L. Os parâmetros avaliados foram biovolume (μm^3) da população total e de células vivas (verde) e o percentual (%) de células vivas. O Soro apresentou maior quantidade de células vivas quando comparado aos demais grupos ($P < 0,05$). Soro/ CHX, Etanol e Etanol/ CHX apresentaram quantidade de células vivas semelhante. De acordo com o presente estudo, o etanol não interferiu na capacidade antimicrobiana da clorexidina sobre biofilme oral e parece ser a uma boa opção para evitar a formação de precipitado.

Palavras-chave: Biofilme. Endodontia. Etanol. Irrigantes do Canal Radicular. Microscopia Confocal.

ABSTRACT

SANTINI, M. F. **The effect of ethanol on the antimicrobial activity of chlorhexidine over oral biofilm.** 2014. 21f. Final Paper (Specialization) - Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

In order to avoid the formation of a brown-orange precipitate (para-chloroaniline) as a result of reaction between sodium hypochlorite (NaOCl) and chlorhexidine, an intermediate solution must be used. The aim of this study was to evaluate the effect of 95% ethanol on the antimicrobial activity of 2% chlorhexidine over oral biofilm, using confocal laser scanning microscopy (CLSM). Oral biofilm was induced on 40 bovine dentin blocks, fixed on an intraoral device. The blocks were randomly divided into 4 groups (n=7): Saline - saline (5 min); Saline/ CHX - saline (5 min) + chlorhexidine (5 min); Ethanol - ethanol (5 min); Ethanol/ CHX - ethanol (5 min) + chlorhexidine (5 min). The blocks' surfaces were stained with Live/ Dead ® BacLight for CLSM analysis. Three images per block were obtained and analyzed using BioImage_L software. The parameters evaluated were total biovolume (μm^3), live biovolume (green) and percentage (%) of live cell population. Saline presented the highest number of viable cells when compared to the other groups ($P < 0.05$). Saline/ CHX, Ethanol and Ethanol/ CHX presented similar amount of viable cells. According to the present study, ethanol did not affect the antimicrobial activity of chlorhexidine over oral biofilm and seems to be a good choice to prevent the formation of precipitate.

Keywords: Biofilm. Endodontics. Ethanol. Root Canal Irrigants. Confocal Microscopy.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	METODOLOGIA.....	10
2.1	PREPARO DAS AMOSTRAS	10
2.2	OBTENÇÃO DO BIOFILME ORAL.....	10
2.3	ANÁLISE MICROSCÓPICA DAS AMOSTRAS	11
2.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	12
3	RESULTADOS	13
4	DISCUSSÃO	16
5	CONCLUSÃO.....	19
	REFERÊNCIAS.....	20

1 INTRODUÇÃO

Os principais objetivos dos protocolos de irrigação endodôntica são movimentação de partículas, ação antimicrobiana, solubilização de tecidos e detritos orgânicos e inorgânicos e lubrificação das paredes dentinárias. É realizada durante e após a conclusão da instrumentação endodôntica, empregando dispositivos e substâncias específicas para cada caso clínico (HAAPASALO et al., 2010).

Nas infecções endodônticas primárias e secundárias, os microrganismos encontram-se organizados em biofilme, ou seja, as células bacterianas estão aderidas a um substrato, e imersas em uma matriz de polissacarídeo que preenche o espaço entre as células. Estudos prévios tem utilizado o biofilme intraoral para testar o efeito de diferentes soluções irrigadoras e de medicações intracanal (DEL CARPIO-PEROCHENA et al., 2011; ORDINOLA-ZAPATA et al., 2012) e essa parece um modo mais fidedigno de simular *in vitro* o comportamento bacteriano frente a agente antimicrobianos.

Embora, idealmente, os métodos mecânicos devessem remover o biofilme intrarradicular, os instrumentos endodônticos não possuem acesso direto a todas as paredes, istimos e irregularidades do canal radicular (PAQUE; GANAHL; PETERS, 2009; PAQUE et al., 2010; PETERS, 2004). Por isso, o uso de soluções irrigadoras durante a instrumentação e a irrigação final é fundamental para que se consiga eliminar a maior quantidade possível de microrganismos do sistemas de canais radiculares.

O hipoclorito de sódio (NaOCl) é universalmente aceito como a solução padrão para a irrigação dos canais radiculares em função de sua capacidade de dissolver tecidos orgânicos e de sua propriedade antimicrobiana (ESTRELA et al., 2002). Entretanto, o NaOCl apresenta limitações diante de algumas condições microbianas endodônticas, elevado potencial alergênico e ação deletéria sobre a dentina radicular (ZHANG et al., 2010). Em altas concentrações, o NaOCl é tóxico e irritante aos tecidos periapicais (PASHLEY et al., 1985).

A clorexidina 2% tem sido utilizada em combinação com NaOCl no intuito de complementar as deficiências apresentadas pelo hipoclorito (HAPASAALO et al., 2010). A clorexidina apresenta baixa toxicidade (ZEHNDER, 2006) e ação sobre *E. faecalis* (LI, LIU, XU, 2012). Possui a desvantagem de não apresentar ação solvente de matéria orgânica

nem ação neutralizante de produtos tóxicos de origem microbiana, tais como endotoxina (DE LA CASA et al., 2008; DE OLIVEIRA et al., 2007).

A clorexidina, quando em contato com o NaOCl, produz um precipitado marrom-alaranjado (BUI; BAUMGARTNER; MITCHELL, 2008; TAY et al., 2006). Esse composto induz à alteração de cor dental e à obliteração dos túbulos dentinários, comprometendo a adesão do cimento obturador à dentina radicular (TAY et al., 2006). A composição química desse precipitado não está completamente definida. A para-cloroanilina (PCA), quando presente, é citotóxica (BUI; BAUMGARTNER; MITCHELL, 2008).

A formação do precipitado ocorre a partir da combinação de concentrações mínimas do hipoclorito de sódio, desde 0,023% a 6% (BASRANI et al., 2007). Diversas investigações foram realizadas para verificar a composição química deste precipitado (BARBIN et al., 2008; BASRANI et al., 2007; BASRANI et al., 2010; BUI; BAUMGARTNER; MITCHELL, 2008; MARCHESAN et al., 2007; THOMAS; SEM, 2010) sendo detectado a presença de Ca, Fe e Mg (NOWICKI; SEM, 2011). Inicialmente foi designado como sendo a PCA (NOWICKI; SEM, 2011), porém, Krishnamurthy e Sudhakaran (2010) observaram que o precipitado formado é composto de ao menos duas moléculas isoladas, menores e derivadas da clorexidina, designadas de para-clorofenil-uréia (PCU) e para-cloro-fenilguanidil- 1,6-diguanididil-hexano (PCGH).

Com o propósito de minimizar a formação do precipitado, soluções como soro fisiológico, água destilada, ácido cítrico, EDTA e, mais recentemente, o etanol, vem sendo estudadas como possíveis irrigantes intermediários (KRISHNAMURTHY; SUDHAKARAN, 2010). Krishnamurthy e Sudhakaran (2010) observaram que o álcool absoluto foi a única solução que evitou a formação do precipitado quando comparado com o soro e a água destilada. Mortenson et al. (2012) verificou que o ácido cítrico e o EDTA não foram capazes de evitar a formação do precipitado.

Apesar de o álcool absoluto evitar a formação do precipitado, não se sabe quais seus efeitos sobre a atividade antimicrobiana da clorexidina. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi verificar se o etanol 95% prejudica a ação antimicrobiana da clorexidina sobre biofilme oral, por meio da microscopia confocal de varredura à laser.

2 METODOLOGIA

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS (Certificado de Apresentação para Apreciação Ética: 16298613.7.0000.5347). Para o cálculo amostral foi utilizado o pacote estatístico BioEstat 5.0 (Fundação Mamirauá, Belém, Pará, Brasil), que indicou um número 28 amostras, 7 por grupo.

2.1 PREPARO DAS AMOSTRAS

Vinte e oito blocos de dentina bovina, medindo aproximadamente 3 mm x 3 mm x 2 mm, foram obtidos utilizando-se um disco diamantado dupla face (Komet, Santo André, SP, Brasil) montado em micro motor de baixa rotação. As amostras foram imersas em ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 17% por 3 minutos para remoção da *smear layer* produzida durante o corte das raízes. Em seguida, os blocos foram armazenados em tubos de ensaio com tampas rosqueáveis, contendo 5 ml de água destilada e esterilizados em autoclave.

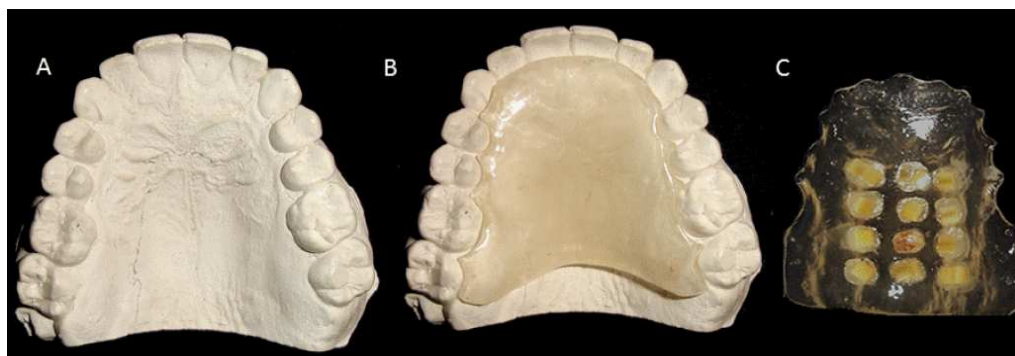
2.2 OBTENÇÃO DO BIOFILME ORAL

Para formação do biofilme oral, *in situ*, 7 blocos de dentina foram fixados em um aparelho intrabucal removível, de acordo com Del Carpio-Perochena et al. (2011). Foram feitas moldagens do arco superior de dois voluntários e, por meio dos modelos de gesso (Figura 1A), confeccionou-se o aparelho intrabucal palatino em resina acrílica autopolimerizável (Jet Clássico, São Paulo, SP, Brasil) (Figura 1B). Após a cura da resina, foram feitos nichos e os blocos de dentina foram fixados com godiva (Figura 1C). Sobre os blocos, foi colocada uma tela protetora para impedir a remoção mecânica do biofilme.

O dispositivo intraoral foi utilizado por dois voluntários durante 3 dias, sendo retirado apenas para realização dos procedimentos de higiene oral (DEL CARPIO-PEROCHENA et al., 2011).

Após o processo de formação do biofilme, cada bloco foi cuidadosamente removido do seu nicho e armazenado em estufa, a 37°C, dentro de tubos Ependorf contendo 1 ml de *Brain Heart Infusion* (BHI; Difco, Detroit, MI, EUA) por 24h.

Fig 1 - Confeção do dispositivo intraoral.



Fonte: DEL CARPIO-PEROCHENA et al., 2011.

2.3 ANÁLISE MICROSCÓPICA DAS AMOSTRAS

Os blocos de dentina foram removidos do meio BHI e lavados com 1 ml de água destilada para remoção do meio de cultura e das células não aderidas. Em seguida, os blocos de dentina foram submersos em 5 ml de cada uma das soluções que compuseram os grupos experimentais. As amostras foram divididas em 4 grupos (n=7): Soro - soro fisiológico (5 min); Soro/ CHX - soro fisiológico (5 min) + clorexidina (5 min); Etanol - etanol (5 min); Etanol/ CHX - etanol (5 min) + clorexidina (5 min).

Após o contato com as soluções, a superfície dos blocos foi lavada com 2 ml de soro fisiológico e em seguida, foi dispensado 0,25 μ l do corante *Live/Dead[®] BacLight Bacterial Viability* (Invitrogen, Eugene, OR, USA) para análise em microscópio confocal de varredura à laser (MCVL) (Olympus Fluoview 1000 ,Olympus Corporation, Tóquio, Japão). Primeiramente, o biofilme foi examinado em aumento de 100x para encontrar pontos de maior espessura. Em seguida, escolheu-se 3 regiões que foram analisadas em aumento de 60x.

As imagens foram analisadas no programa BioImage_L (<http://bioimager.com/>) e os parâmetros avaliados foram o biovolume (μm^3) total e de células vivas (verde) e porcentagem (%) de células vivas.

2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores de biovolume total e verde foram tabulados em planilhas e analisados por meio de estatísticas descritivas no programa BioEstat 5.0. A normalidade da distribuição foi verificada com o teste de Shapiro-Wilk. O teste de normalidade indicou distribuição não normal dos dados. Assim, tais dados foram analisados pelo teste de Kruskal Wallis, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunn ($\alpha = 5\%$).

3 RESULTADOS

O grupo Soro apresentou maior quantidade de células vivas quando comparado aos demais grupos ($P < 0,05$). Os grupos Soro/ CHX, Etanol e Etanol/ CHX apresentaram quantidade de células vivas semelhante ($P > 0,05$).

A tabela 1 apresenta a estatística descritiva dos biovolumes celulares (compreendendo o biovolume total e o biovolume de células vivas) e a porcentagem de células vivas de cada grupo experimental. Os dados estão expressos como mediana e percentis (P) 25 e 75.

Tabela 1 - Mediana e percentis 25 e 75 dos biovolumes celulares e da percentagem de células vivas de cada grupo experimental.

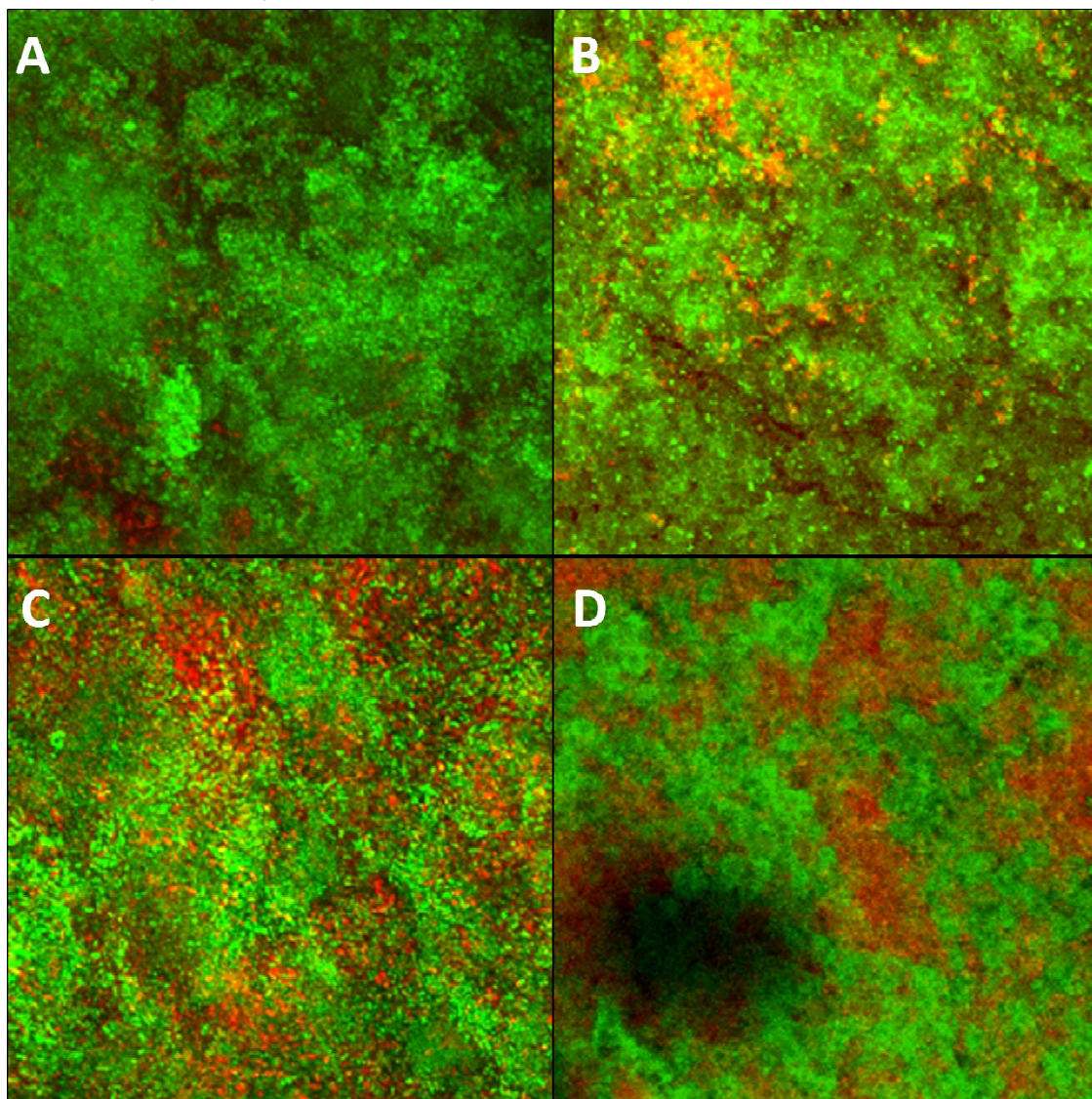
	Soro	Soro + CHX	Etanol	Etanol + CHX
n	7	7	7	7
BIOVOLUME TOTAL ($\mu\text{m}^3 \times 10^6$)	1,6 (0,8/ 1,7)	21,2 (16,9/ 21,2)	21,4 (15,4/ 29,8)	15,9 (15,1/ 21,6)
BIOVOLUME DE CÉLULAS VIVAS ($\mu\text{m}^3 \times 10^6$)	1,5 (0,7/ 1,6)	13,7 (12,5/ 15,8)	13,8 (8,6/ 20,3)	13,8 (12,7/ 15,7)
CÉLULAS VIVAS ^a (%)	93,4 (92,7/ 96,5)	79,6 (65,9/ 81,0)*	64,5 (53,3/ 75,7)*	76,3 (68,9/ 83,5)*

^a Corresponde ao seguinte cálculo: (biovolume de células vivas/ biovolume total) x 100.

* Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo soro, pelo teste de Kruskal Wallis, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunn ($\alpha = 5\%$).

A Figura 2 representa as imagens referentes à porcentagem de células vivas em cada grupo experimental.

Fig 2 - Imagens representativas das porcentagens de células vivas em cada grupo experimental. A) Soro, B) Soro/ CHX, C) Etanol, D) Etanol/ CHX.



Fonte: da autora, 2014.

4 DISCUSSÃO

No presente estudo, foi utilizada a formação de biofilme misto por meio de um dispositivo intraoral para análise da ação antimicrobiana de soluções irrigadoras. Esta metodologia parece ser mais indicada para esse tipo de estudo porque representa o que acontece clinicamente em termos de colonização microbiana. A formação de biofilme misto foi induzida pois microrganismos, que não somente o *Enterococcus faecalis*, sobrevivem ao tratamento endodôntico e ao meio alcalino gerado pelas medicações intracanaís (CHAVEZ DE PAZ, 2007). Além disso, na forma de biofilme, os microrganismos são mais resistentes aos agentes antimicrobianos em comparação com aos microrganismos em estado planctônico (DONLAN, COSTERTON, 2002).

Apesar de tais vantagens, essa metodologia não simula o que ocorre dentro do canal radicular, onde a ação da solução irrigadora é dificultada pela complexidade do sistema de canais radiculares e pela dificuldade de difusão no terço apical (SUSIN et al., 2010). Porém, para avaliar a ação sobre biofilme, a imersão de blocos de dentina nas soluções por um determinado período de tempo é a melhor opção (ORDINOLA-ZAPATA et al., 2012; DEL CARPIO-PEROCHENA et al., 2011).

Sabe-se que a clorexidina não é capaz de dissolver biofilme. Estudos que utilizaram a análise em MCVL demonstraram que a clorexidina 2% parece não causar nenhum efeito visível sobre a estrutura do biofilme, especialmente de áreas de difícil acesso aos instrumentos (ORDINOLA-ZAPATA et al., 2012; DEL CARPIO-PEROCHENA et al., 2011). Ordinola-Zapata et al. (2012) afirmaram que, a ação antimicrobiana da clorexidina é esperada em situações de paredes dentinárias limpas, livres de biofilme. Por isso, deve ser utilizada em associação com NaOCl, sendo fundamental o uso de soluções que removam os resíduos deste irrigante do sistema de canais radiculares para evitar a formação do precipitado.

No ano de 2010, Krishnamurthy e Sudhakaran avaliaram a capacidade de algumas soluções em remover o NaOCl das paredes do canal radicular previamente ao uso da clorexidina. Tanto a solução salina quanto a água destilada foram capazes de reduzir a formação do precipitado quando comparada com o grupo teste, onde não foi realizada nenhuma irrigação entre o NaOCl e a CHX. Porém, apenas o álcool absoluto foi capaz de impedir completamente a deposição do precipitado nas paredes dos canais. Em função

disso, este estudo teve por objetivo avaliar o possível efeito do etanol na ação antimicrobiana da clorexidina.

Basrani et al. (2008) recomendaram a utilização de água destilada ou etanol como solução irrigadora intermediária. O bom desempenho do etanol na remoção de NaOCl nos canais radiculares deve-se à sua volatilidade, ao seu caráter tensoativo, por ser altamente eletronegativo e por poder penetrar de maneira profunda nos túbulos dentinários e ramificações dos canais radiculares.

Mortenson et al. (2010) analisaram a capacidade do EDTA, ácido cítrico e solução salina em remover hipoclorito de sódio previamente à irrigação com clorexidina. O ácido cítrico foi a solução que proporcionou menor formação de precipitado no sistema de canais radiculares. Entretanto, Mortenson et al. (2010) realizaram procedimentos irrigadores em dentes monorradiculares, ao passo que, na presente pesquisa, o contato com as soluções irrigadoras deu-se através de blocos de dentina.

A composição química do precipitado formado a partir da reação entre NaOCl e CHX ainda não está completamente estabelecida. Alguns trabalhos confirmaram a presença de PCA (BASRANI et al., 2007; KRISHNAMURTHY, SUDHAKARA, 2010), outros não (THOMAS; SEM, 2010; NOWICKI; SEM, 2011). Esse subproduto apresentou ser citotóxico em ratos (CHHABRA et al., 1991) e possivelmente carcinogênico em humanos (LUIZ et al., 2008).

Independente da presença da PCA, parece razoável a busca pela minimização ou até mesmo pela prevenção da formação deste precipitado porque é um subproduto insolúvel e de difícil remoção das paredes do canal radicular. A obliteração dos túbulos dentinários pode dificultar a penetração das medicações intracanal e comprometer o selamento da obturação (BUI; BAUMGARTNER; MITCHELL, 2008).

Algumas substâncias ao interagirem são capazes de interferir no mecanismo de ação uma da outra (PRADO et al., 2013). Só et al., (2011) verificaram que a interação entre NaOCl e EDTA reduz a capacidade de dissolução tecidual do NaOCl. Tendo em vista que o etanol apresentou a capacidade de reduzir a formação do precipitado decorrente da interação entre o hipoclorito de sódio e a clorexidina 2% (KRISHNAMURTHY; SUDHAKARAN, 2010), foi oportuno estudar o efeito do etanol sobre a capacidade antimicrobiana da clorexidina em um tempo de 5 minutos. Os resultados deste estudo

demonstraram que os grupos Soro/CHX, Etanol e Etanol/ CHX foram semelhantes em termos de percentual de células vivas, demonstrando que as 3 soluções tiveram uma ação similar sobre o biofilme oral. Isso permite a ilação de que o etanol não exerceu influência sobre a atividade antimicrobiana da clorexidina.

É importante salientar que não estamos discutindo se a ação da clorexidina sobre o biofilme oral foi satisfatória ou se um tempo maior de contato possibilitaria resultados superiores. Entretanto, cumpre ressaltar que Ordinola-Zapata et al. (2012) não encontrou diferenças, em modelo experimental semelhante, entre clorexidina 2%, ácido cítrico 10% e EDTA 17%, corroborando com os resultados do presente estudo.

Apesar de o álcool evitar a formação de precipitado, deve-se ter cautela ao indicar o seu uso clínico. A sua biocompatibilidade aos tecidos periapicais ainda não está definida. Por isso, são necessários estudos que avaliem a resposta periapical frente ao uso do etanol como irrigante do canal radicular.

5 CONCLUSÃO

De acordo com o presente estudo, o etanol não interferiu na capacidade antimicrobiana da clorexidina sobre biofilme oral e parece ser a uma boa opção para evitar a formação de precipitado.

REFERÊNCIAS

- BARBIN, L.E. et al. Determination of para-chloroaniline and reactive oxygen species in chlorhexidine and chlorhexidine associated with calcium hydroxide. **J. Endod.**, Chicago, v. 34, no. 12, p. 1508-1514, Dec. 2008.
- BASRANI, B.R. et al. Determination of 4-chloroaniline and its derivatives formed in the interaction of sodium hypochlorite and chlorhexidine by gas chromatography. **J. Endod.**, Chicago, v. 36, no 2, p. 312–314, Feb. 2010.
- BASRANI, B.R. et al. Interaction between sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate. **J. Endod.**, Chicago, v. 33, no. 8, p. 966–969, Aug. 2007.
- BUI, T.B.; BAUMGARTNER, J.C.; MITCHELL, J.C. Evaluation of the interaction between sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate and its effect on root dentin. **J. Endod.**, Chicago, v. 34, no. 2, p. 181–185, Feb. 2008.
- CHAVEZ DE PAZ, L.E. Redefining the persistent infection in root canals: possible role of biofilm communities. **J. Endod.**, Chicago, v. 33, no. 6, p. 652–662, June 2007
- CHHABRA, R.S. et al. Carcinogenicity of p-chloroaniline in rats and mice. **Food Chem. Toxicol.**, Oxford, v. 29, no. 2; p. 119–124, Feb. 1991.
- DEL CARPIO-PEROCHENA, A.E. et al. Biofilm dissolution and cleaning ability of different irrigant solutions on intraorally infected dentin. **J. Endod.**, Chicago, v. 37, no. 8, p. 1134-1138, Aug. 2011.
- DE LA CASA, M.L. et al. Protein content in irrigating solutions in contact with pulp tissue. **Acta Odontol. Latinoam.**, Buenos Aires, v. 21, no. 1, p. 65-68, 2008.
- DE OLIVEIRA, L.D. et al. In vitro effects of endodontic irrigants on endotoxins in root canals. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St. Louis, v. 104, no. 1, p. 135-142, July 2007.
- DONLAN, R.M.; COSTERTON, J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, v. 15, no. 2, p. 167–193, Apr. 2002.
- ESTRELA, C. et al. Mechanism of action of sodium hypochlorite. **Braz. Dent. J.**, Ribeirão Preto, v. 13, no. 2, p. 113–117, 2002.
- HAAPASALO, M. et al. Irrigation in endodontics. **Dent. Clin. North Am.**, Philadelphia, v. 54, no. 2, p. 291-312, Apr. 2010.
- KRISHNAMURTHY, S.; SUDHAKARAN, S. Evaluation and prevention of the precipitate formed on interaction between sodium hypochlorite and chlorhexidine. **J. Endod.**, Chicago, v. 36, no. 7, p. 1154-1157, July 2010.

LI, W.; LIU, H.; XU, Q. Extracellular dextran and DNA affect the formation of *Enterococcus faecalis* biofilms and their susceptibility to 2% chlorhexidine. **J. Endod.**, Chicago, v. 38, no. 7, p. 894-898, July 2012.

MARCHESAN, M.A. et al. Chemical analysis of the flocculate formed by the association of sodium hypochlorite and chlorhexidine. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Endod.**, St. Louis, v. 103, no. 5, p. 103–105, May 2007.

MORTENSON, D. et al. The effect of using an alternative irrigant between sodium hypochlorite and chlorhexidine to prevent the formation of para-chloroaniline within the root canal system. **Int. Endod. J.**, Oxford, v. 45, no. 9, p. 878-882, Sept 2012.

NOWICKI, J.B.; SEM, D.S. An in vitro spectroscopic analysis to determine the chemical composition of the precipitate formed by mixing sodium hypochlorite and chlorhexidine. **J. Endod.**, Chicago, v. 37, no. 7, p. 983-988, July 2011.

ORDINOLA-ZAPATA, R. et al. Antimicrobial effect of endodontic solutions used as final irrigants on a dentine biofilm model. **Int. Endod. J.**, Oxford, v. 45, no. 2, p. 162-168, Feb. 2012.

PAQUE, F. et al. Preparation of oval-shaped root canals in mandibular molars using nickel-titanium rotary instruments: a micro-computed tomography study. **J. Endod.**, Chicago, v. 36, no. 4, p. 703–707, Apr. 2010.

PAQUE, F.; GANAHL, D.; PETERS, O.A. Effects of root canal preparation on apical geometry assessed by micro-computed tomography. **J. Endod.**, Chicago, v. 35, no. 7, p. 1056–1059, July 2009.

PASHLEY, E.L. et al. Cytotoxic effects of NaOCl on vital tissue. **J. Endod.**, v. 11, no. 12, p. 525–528, Dec. 1985.

PETERS, O.A. Current challenges and concepts in the preparation of root canal systems: a review. **J. Endod.**, Chicago, v. 30, no. 8, p. 559–567, Aug. 2004.

PRADO, M. et al. Interactions between irrigants commonly used in endodontic practice: a chemical analysis. **J. Endod.**, Chicago, v. 39, no. 4, p. 505-510, Apr 2013.

SHEN, Y. et al. Evaluation of the effect of two chlorhexidine preparations on biofilm bacteria in vitro: a three-dimensional quantitative analysis. **J. Endod.**, Chicago, v. 35, no. 7, p. 981–985, July 2009.

SÓ, M. V. R. et al. Pulp tissue dissolution when the use of sodium hypochlorite and EDTA alone or associated. **Rev. Odonto Cienc.**, Porto Alegre, v. 26, no. 2, p. 156-160, Jan 2011.

SUSIN, L. et al. Canal and isthmus debridement efficacies of two irrigant techniques in a closed system. **Int. Endod. J.**, Oxford, v. 43, no. 12, p. 1077-1090, Dec. 2010.

TAY, F. et al. Ultrastructure of smear layer-covered intraradicular dentin after irrigation with BioPure MTAD. **J. Endod.**, Chicago, v. 32, no. 10, p. 970–975, Oct. 2006.

THOMAS, J.E.; SEM, D.S. An in vitro spectroscopic analysis to determine whether parachloroaniline is produced from mixing sodium hypochlorite and chlorhexidine. **J. Endod.**, Chicago, v. 36, no. 2, p. 315–317, Feb. 2010.

ZEHNDER, M. Root canal irrigants. **J. Endod.**, Chicago, v. 32, no. 5, p. 389-398, May 2006.

ZHANG, K. et al. The effect of initial irrigation with two different sodium hypochlorite concentrations on the erosion of instrumented radicular dentin. **Dent. Mater.**, Copenhagen, v. 26, no. 6, p. 514-523, **June** 2010.