

AVALIAÇÃO DO PODER DE DESINFECÇÃO DE CANAIS RADICULARES CONTAMINADOS POR *ENTEROCOCCUS FAECALIS* PREPARADOS COM UM SISTEMA RECIPROCANTE SEGUIDO DA IRRIGAÇÃO COM HIPOCLORITO DE SÓDIO OU CLOREXIDINA.

Disinfection ability to assessment canals contaminated by Enterococcus faecalis prepared with a reciprocating system and irrigation with sodium hypochlorite or chlorhexidine

Ana Cristina Tosta Faria Costa¹; Lucieni Cristina Trovati Moreti²; Nilton Boer³; Fabiana Furtado Freitas⁴; Samuel Lucas Fernandes⁵

¹Cirurgiã Dentista. Barra do Garças-MT, Brasil.

²Professora Mestre da disciplina de Endodontia, Universidade Camilo Castelo Branco- Campus Fernandópolis, Fernandópolis-SP, Brasil.

³Professor Doutor da disciplina de Endodontia, Universidade Camilo Castelo Branco- Campus Fernandópolis, Fernandópolis-SP, Brasil.

⁴Professora Mestre do Departamento de Ciências Biofuncionais, Faculdade Mineirense - FAMA, Mineiros, Goiás, Brasil.

⁵Professor Mestre da disciplina de Endodontia, Faculdade Mineirense - FAMA, Mineiros, Goiás, Brasil.

RESUMO

O objetivo desse estudo foi avaliar a efetividade do preparo biomecânico do canal radicular utilizando um instrumento único associado à irrigação com hipoclorito de sódio 5,25% (NaOCl) ou Clorexidina 2%, na eliminação do *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. Para o estudo foram utilizados 60 pré-molares inferiores humanos unirradiculados. Os dentes foram aleatoriamente divididos em 4 grupos (15): G1 (controle negativo, sem inóculo e tratamento); G2 (Clorexidina 2,0%); G3 (NaOCl 5,2%); G4 (Controle positivo, com inóculo e sem instrumentação), os dentes foram infectados com *Enterococcus Faecalis* por 7 dias. Foram realizadas coletas intracanal com cones de papel estéreis antes e após a execução dos protocolos de tratamento, sendo constatado o crescimento em todos os espécimes, exceto em G1. Após o emprego dos protocolos do preparo biomecânico, observou-se uma redução na contagem de Unidades formadoras de colônia (UFC), em relação ao grupo controle positivo, apresentando diferença significativa entre as duas soluções testadas ($p < 0,05$). A maior eficácia na redução das células bacterianas ocorreu no grupo NaOCl 5,2%, apresentando média de 3.7×10^2 UFC, proporcionando uma redução significativa ($p < 0,05$) em relação do grupo da clorexidina 2%, 1.27×10^3 UFC, apresentou uma redução significativa em relação ao grupo controle positivo 1.46×10^6 UFC. A partir desse estudo pode-se inferir que os protocolos de instrumentação utilizados foram eficientes na redução bactéria do interior do canal, mas não o suficiente para a erradicação em todos os casos.

Palavras-chave: Endodontia, Irrigantes, Instrumentos Reciprocantes.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effectiveness of mechanical preparation of the root canal using a single instrument associated with irrigation with sodium hypochlorite 5.25% (NaOCl) or chlorhexidine 2% in the elimination of *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. For the study were used 60 single-root mandibular humans premolars. The teeth were randomly divided into 4 groups (15): G1 (negative control without inoculum and treatment); G2 (2.0% chlorhexidine); G3 (5.2% NaOCl); G4 (positive control, with and without inoculum instrumentation), the teeth were infected with *Enterococcus faecalis* for 7 days. Samples were taken with sterile paper cones in to root canal, before and after the implementation of treatment protocols, and revealed the growth in all specimens, except in G1. After the use of the biomechanical preparation protocols, there was a reduction in the forming colony-forming unit (CFU) compared to the positive control group, showing significant difference between the two solutions ($p < 0.05$). The greater efficacy in reducing the bacterial cells occurred in 5,2% NaOCl group, with a mean of 3.7×10^2 CFU, providing a significant reduction ($p < 0.05$) compared to group 2% chlorhexidine, 1.27×10^3 CFU, showed a significant reduction compared to the positive control group $1:46 \times 10^6$ CFU. From this study it can be inferred that the instrumentation used protocols were effective in reducing bacteria within the channel, but not enough to eradication in all cases.

Keywords: Endodontics, Irrigators, Reciprocating instruments.

INTRODUÇÃO

A limpeza deficiente do canal radicular permite a permanência de microrganismos e seus produtos metabólicos, considerados os responsáveis pelas patologias pulpares e periapicais, podendo interferir deste modo, diretamente no processo de reparo perirradicular^[1,2]. Mesmo com a forte tendência atual do preparo dos canais radiculares em tempo reduzido^[3,4], a limpeza não pode ser ignorada e nem a contaminação bacteriana subestimada, pois processos tecnológicos podem evoluir, porém as reações biológicas permanecem inalteradas.

Dentre os microrganismos, o *Enterococcus faecalis* é uma bactéria Gram-positiva anaeróbia facultativa que pode se proliferar na ausência de oxigênio, com crescimento como biofilme nas paredes do canal radicular e facilidade em penetrar nos túbulos dentinários. É a espécie mais frequentemente isolada na raiz de dentes com lesões persistentes^[5,6] e, por isso, o preparo químico mecânico em todas as suas etapas deve ser bem criterioso, minucioso e eficaz.

Com o surgimento da instrumentação mecanizada o preparo do canal radicular durante a terapia endodôntica tornou-se mais rápida, entretanto o período de atuação das substâncias irrigadoras no interior do sistema de canais radiculares foi significativamente reduzido^[7]. Idealmente, a substância irrigadora deve ter propriedades antimicrobianas, dissolver os tecidos necróticos, restos pulpares e o biofilme microbiano, e não causar danos aos tecidos da região periapical^[8]. O hipoclorito de sódio é a substância irrigadora mais utilizada na endodontia, sendo utilizada em concentrações que variam de 0,5 até 5,25%^[8,9,10,11,12]. Outra opção de irrigante é a clorexidina 2%, que apresenta excelente atividade antimicrobiana^[12,13].

Nos últimos anos o movimento recíprocante foi introduzido por Yared em 2008^[14] utilizando uma única lima ProTaper F2 (Dentsply Maillefer, Suíça), o que representou uma nova perspectiva em relação às limas de Ni-Ti, impulsionando a endodontia para uma nova tendência: instrumentos de Ni-Ti de uso único, utilizados em movimentos recíprocantes.

Portanto, o propósito do presente estudo *in vitro* foi avaliar a atividade antimicrobiana da substância de hipoclorito de sódio 2,5% e 5,25% (NaOCl) e da clorexidina a 2% frente a alguns patógenos endodônticos presentes nos canais radiculares instrumentados com o sistema recíprocante Wave One®.

MATERIAIS E MÉTODOS

Seleção e preparo dos espécimes

Foram selecionados 60 pré-molares inferiores com raízes completamente formadas, todos pertencentes ao Banco de Dentes Humanos da Universidade Camilo Castelo Branco-Campus São Paulo, portadores de raiz única, semelhantes morfológicamente, com ausência de tratamentos endodônticos prévio, fraturas, calcificações e dilacerações. Os comprimentos dos dentes variaram entre 19 e 23 milímetros.

Foi realizada a abertura coronária em todos os dentes com brocas diamantadas nº 1016-haste longa (KG Sorensen-SP). O preparo cervical foi realizado com brocas de Gattes Glidden nº 2 e 3 (Dentsply Maillefer-Suíça). Para determinar o comprimento de trabalho foi inserido no interior do canal radicular uma lima manual tipo K #15 (Dentsply Maillefer-Suíça) até que sua ponta fosse visível no forame apical.

O comprimento de trabalho foi calculado recuando-se 1 mm do comprimento obtido com a medida inicial. Após acesso à câmara pulpar e ao canal radicular, este foi explorado em toda a sua extensão com instrumento manual de diâmetro compatível ao diâmetro anatômico do canal que não foi superior ao diâmetro de uma lima tipo K #20. Foi realizada a limpeza e o esvaziamento do canal radicular com o uso desta lima e hipoclorito de sódio 2,5% (Cloro-rio- Rioquímica-SP, Brasil) a fim de remover os restos pulpares. Após, as amostras foram preparadas com a lima tipo K #30, até CT, padronizando o diâmetro dos canais, finalizando com irrigação com EDTA 17% (Biodinâmica-SP, Brasil) por 3 minutos e hipoclorito de sódio 2,5% (Cloro-rio- Rioquímica-SP, Brasil) por mais 2 minutos.

Em seguida as raízes foram impermeabilizadas externamente com esmalte de unha colorido (Colorama-SP, Brasil) aguardando a secagem em temperatura ambiente por 1 hora, e depois mais uma camada de esmalte foi aplicada (para impermeabilizar a superfície radicular). A seguir as amostras foram acondicionadas em eppendorfs para serem manipuladas e na sequência, foram autoclavadas a 134°C por 15 minutos (Cristófoli Ltda- Campo Mourão, Brasil).

Os sessenta espécimes foram então divididos aleatoriamente em 4 grupos experimentais:

Grupo 1: 15 dentes do Grupo controle negativo (GN), e não receberam o inóculo;

Grupo 2: 15 dentes preparados com sistema rotatório Protaper Reciprocante (Wave one®) e irrigados com Clorexidina 2% (FGM-Joinville- SC);

Grupo 3: 15 dentes preparados com sistema rotatório Protaper Reciprocante (Wave One®) e hipoclorito de sódio a 5,2% (Fórmula & Ação SP-Brasil);

Grupo 4: 15 dentes do Grupo controle positivo (GP), e receberam o inóculo, sem serem preparados com sistema rotatório Protaper Reciprocante (Wave one®);

Contaminação

Preparou-se uma suspensão bacteriana mediante adição a um meio TSB (Caldo Trypticase-Soja) de 1ml de cultura pura de uma cepa de *E. faecalis* (ATCC 29212) o qual foi incubado em 5ml de meio de TSB em condições de aerobiose, no interior de estufa à 37°C por um período de 24 horas. Após o período de incubação, o grau de turbidez do inóculo foi ajustado a uma densidade de aproximadamente $3,0 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias (UFC) por ml (equivalente à escala 1,0 de Mac Farland).

Todos os canais radiculares foram contaminados, exceto os do grupo controle negativo (GN), com 10µl deste inóculo utilizando pipetadora automática, sendo mantidos em estufa a temperatura de 37°C, durante sete dias, sendo o caldo de cultura estéril adicionado nos canais a cada 48 horas.

Preparo biomecânico dos canais radiculares

Os dentes foram instrumentados com o instrumento Wave em uma bancada de fluxo laminar horizontal, sendo utilizadas como substância irrigadora, a clorexidina 2% ou o hipoclorito de sódio a 5,2%.

A instrumentação dos canais radiculares foi realizada por um único operador, seguindo as instruções do fabricante. Os canais foram explorados com uma lima tipo K #15, sendo que o instrumento WaveOne 40.08 (função wave one do aparelho X Smart Plus- Dentsply Maillefer-Suíça Dentsply) foi utilizado atuando no terço cervical, como movimento de introdução e remoção por três vezes, após a instrumentação do terço cervical o canal foi irrigado com 5ml da substância irrigadora referente ao grupo estudado. O procedimento será repetido com o instrumento atuando em 2/3 do canal radicular, sendo o canal irrigado novamente com 5ml de substância irrigadora e por fim a introdução da mesma lima reciprocante foi realizada para a instrumentação do terço apical até o comprimento de trabalho e irrigação abundante com 10 ml da respectiva substância irrigadora. Ao final foi realizada uma irrigação com 2 ml de EDTA 17%, por 2 minutos. Concluídos os preparos, os mesmos foram irrigados com 2 ml de substância estéril de tiosulfato

de sódio a 5% (3 minutos) para inativação do hipoclorito^[15], seguindo de uma irrigação com 2 ml de soro fisiológico estéril e posterior secagem com pontas de papel absorventes esterilizadas.

Coleta de amostras

Concluído o preparo dos canais, a irrigação final e a secagem, uma solução de soro fisiológico estéril foi colocada em todos os canais e pontas de papel estéreis foram introduzidas até o comprimento de trabalho, permanecendo por um minuto para absorver o conteúdo do canal radicular.

Os cones de papel foram transferidos para tubos de ensaio contendo 1ml de solução salina a 0,85%, sendo em seguida centrifugados por um minuto. Após esse processo alíquotas de 0,1 ml foram semeadas em placas de ágar, sendo depois incubadas a 37° por 48 horas. Procedeu-se então à contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) sendo consideradas incontáveis amostras superiores a 300 UFC.

Metodologia de análise de dados

Testes microbiológicos (contagem de UFC) foram realizados e os dados das amostras foram submetidos à análise de variância. Se observado a significância estatística ($p < 0,05$), a análise prosseguiu com a comparação entre as médias pelo erro padrão da média. O critério para diferenciar estatisticamente as médias, ocorre quando não há sobreposição dos limites superior e inferior dos erros padrão na comparação das médias^[16].

RESULTADOS

Foram encontrados crescimentos bacterianos em todas as amostras iniciais, antes do preparo biomecânico, exceto no grupo controle negativo. Os resultados obtidos da comparação entre as amostras antes e depois do preparo demonstraram que todos os regimes de instrumentação e irrigação reduziram significativamente o número de bactérias, havendo diferença estatística significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

A maior eficácia na redução das células bacterianas ocorreu no grupo NaOCl 5,2%, apresentando média de 3.7×10^2 UFC, proporcionando uma redução significativa ($p < 0,05$) em relação do grupo da clorexidina 2%, 1.27×10^3 UFC.

A maior eficácia na erradicação da contaminação foi observada no grupo NaOCl 5.2%, com a erradicação da contaminação em 80% dos espécimes, seguido pela clorexidina 2% com a erradicação de 63,3%, já no grupo controle positivo houve o crescimento bacteriano em todos os espécimes, enquanto no controle negativo não houve crescimento bacteriano.

Tabela 1 - Media e desvio padrão da quantidade bacteriana em UFC após os tratamentos de cada grupo e a porcentagem de erradicação bacteriana.

Grupos	NaOCl 5,25%	Clorexidina 2%	Controle Positivo	Controle Negativo
UFC	3.7×10^2 ^a	1.27×10^3 ^b	1.46×10^6 ^c	0 ^d
Erradicação	80%	63,3%	0%	-

Letras diferentes nas linhas significam dados estatisticamente diferentes (P<0.05).

DISCUSSÃO

Diferentes metodologias têm sido utilizadas para a avaliação da atividade antimicrobiana de soluções irrigadoras. O *Enterococcus faecalis* é um dos microrganismos mais utilizados por ser considerado uma das espécies mais predominantes nas lesões perirradiculares resistentes e presentes nos casos de insucesso endodôntico, por isso grande parte das atuais pesquisas buscam formas mais eficientes de combater este patógeno [5,6,7,17]. Por ser considerado resistente aos procedimentos do preparo químico mecânico este microrganismo foi escolhido como marcador bacteriológico neste estudo, tendo a capacidade de sobreviver sob pressões ambientais incomuns, como baixa disponibilidade de nutrientes e ainda por ser relativamente fácil de cultivar e manipular [18].

Neste estudo foram utilizados pré-molares inferiores semelhantes a fim de padronizar os espécimes permitindo que a anatomia das raízes não afetasse a carga microbiana. Os canais radiculares infectados com *E. faecalis* foram incubados durante 1(uma) semana e os resultados do presente estudo revelaram que a carga bacteriana inicial era viável e homogênea nos grupos experimentais, exceto no grupo negativo. As amostras microbianas foram coletadas dentro dos canais radiculares com pontas de papel estéril antes e após os tratamentos sendo uma técnica de coleta comumente utilizada [5,18,19].

Objetivando respostas quanto à efetividade das substâncias irrigadoras na redução bacteriana em função do menor tempo de preparo radicular com o uso dos rotatórios, optou-se pelo uso de duas substâncias comumente utilizadas, o hipoclorito de sódio e a clorexidina líquida [1,5,7,8,9,10,11,17,18,19]. Durante a instrumentação rotatória utilizou-se aproximadamente 20 ml de solução irrigante específica para cada grupo, e em todos os dentes, em acordo com os estudos de Baratto Filho et al.(2004) [20] e Basmaci et al. (2013) [21]. A padronização do tempo foi imprescindível para a determinação de resultados fidedignos pelo estudo uma vez que quanto mais tempo solução irrigadora permanecer dentro do canal radicular e quanto mais ela for renovada, maior será sua efetividade [27].

O presente trabalho demonstrou que todos os regimes de irrigação foram eficazes contra *E faecalis*, havendo diferença estatística significativa entre os grupos ($p < 0,05$), porém, o uso da solução de hipoclorito de sódio a 5,2%, foi mais efetivo que a clorexidina 2%, o que evidencia a importância do preparo biomecânico do canal radicular e do uso de substâncias irrigadoras. Apesar disso, algumas pesquisas demonstraram diferenças significativas no que diz respeito à ação antibacteriana entre a clorexidina e NaOCl [17,22], o que se deve às diferentes concentrações do hipoclorito de sódio utilizadas. A melhor efetividade do NaOCl em relação a clorexidina neste estudo pode ser atribuída à sua concentração [23] e pelo melhor poder de dissolução do biofilme, fato não observado pela clorexidina [8].

A clorexidina pode ser uma alternativa para o tratamento das infecções relacionadas ao sistema de canais radiculares, principalmente em pacientes alérgicos e dentes com lesões periapicais extensas, pois o hipoclorito pode desencadear inflamação quando extravasado no ápice, apesar do hipoclorito ainda ser o irrigante de escolha [24].

Muitas são as possíveis razões para a persistência bacteriana nos canais após a instrumentação e irrigação com NaOCl ou clorexidina: a resistência bacteriana pode relacionar-se a localização de bactéria nas reentrâncias do sistema de canais radiculares, regiões estas de difícil acesso a instrumentação e as soluções irrigantes, favorecendo a permanência intrínseca destas; ou ainda ao curto intervalo de tempo de contato das soluções com as paredes do canal; ou a inativação e/ou redução da atividade bacteriana da solução induzida pelos componentes da dentina, exsudato inflamatório, produtos tóxicos bacterianos e restos pulpares necróticos [17]. Outro fator que pode ser responsável é o tempo para o preparo biomecânico, uma vez que se pode preparar um canal com um instrumento Wave One® (Dentsply) em menos de dois minutos, contando o tempo de instrumentação e irrigação [26]. A determinação de protocolos finais de irrigação a fim de que

a substância irrigadora tenha mais tempo de contato com o canal radicular pode ser realizada com o objetivo de sanar esta deficiência de irrigação.

Mesmo com os avanços tecnológicos o endodontista deverá sempre estar atento ao fato de que independente da rapidez do preparo e redução tempo de ação das soluções, a irrigação deverá ser constante e abundante compensando o uso de soluções menos concentradas^[20]. Embora trabalhos demonstrem resultados satisfatórios em termos de capacidade antibacteriana com o uso da clorexidina, a opção ainda recai sobre as soluções de hipoclorito de sódio.

CONCLUSÃO

A utilização de agentes irrigantes é imprescindível para a eficiência da desinfecção do canal radicular. O hipoclorito de sódio a 5,25% mostrou-se a substância irrigadora mais efetiva tanto para a redução, quanto para a erradicação da contaminação intracanal por *E. faecalis*. Reforçando os dados da literatura pode-se concluir que, ainda hoje, o hipoclorito de sódio nas suas diversas concentrações é a solução irrigadora de escolha na endodontia devido principalmente à sua alta capacidade de dissolução de material orgânico.

REFERÊNCIAS

- 1 Siqueira JF Jr, Rôças IN, Favieri A, Lima KC. Chemomechanical reduction of the bactericidal population in the root canal after instrumentation and irrigation with 1%, 2,5%, and 5,25% sodium hypochlorite. J Endod 2000;26: 331-334.
- 2 Carr GB, Schwartz RS, Schaudinn C, Gorur A, Costerton JW. Ultrastructural examination of failed molar retreatment with secondary apical periodontitis: an examination of endodontic biofilms in an endodontic retreatment failure. J Endod. 2009; 35(9):1303-9.
- 3 Bürklein S, Hinschitzka K, Dammaschke T, Schäfer E. Shaping ability and cleaning effectiveness of two single-file systems in severely curved root canals of extracted teeth: Reciproc and WaveOne versus Mtwo and ProTaper. Int Endod J. 2012;45(5):449-61.

4 Alcalde MP, Guimarães BM, Fernandes SL, Vivan RR, Hungaro MA, Bramante CM. Unicone: um novo sistema recíprocante para preparo dos canais radiculares. *ROBRAC*. 2015; 24(71):214-18.

5 Basmaci F, Oztan MD, Kiyani M. Ex vivo evaluation of various instrumentation techniques and irrigants in reducing *E. faecalis* within root canals. *Int Endod J*. 2013;46(9):823-30.

6 Ran S, Liu B, Jiang W, Sun Z, Liang J. Transcriptome analysis of *Enterococcus faecalis* in response to alkaline stress. *Front Microbiol*. 2015;7;6:795.

7 Câmara AC, Albuquerque MM, Aguiar CM, Correia ACRB. In vitro antimicrobial activity of 0.5%, 1%, and 2.5% sodium hypochlorite in root canals instrumented with the ProTaper Universal system. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009;108:55-61.

8 Zehnder M. Root canal irrigants. *J Endod*. 2006;32(5):389-98.

9 Alkahtani A, Alkahtany SM, Anil S. An in vitro evaluation of the cytotoxicity of varying concentrations of sodium hypochlorite on human mesenchymal stem cells. *J Contemp Dent Pract*. 2014;15(4):473-81.

10 Monteiro PG, Bombana A, Santos M, Zaragoza RA. Análise da limpeza dentinária em canais radiculares preparados com um sistema rotatório e diferentes substâncias químicas. *RGO, Porto Alegre*. 2008;56(1):7-15.

11 Morgental RD, Tanomaru JMG, Faria NB Jr, Duarte MAH, Kuga MC, and Tonmaru M Filho. Antibacterial efficacy of endodontic irrigating solutions and their combinations in root canals contaminated with *Enterococcus faecalis*. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology*. September 2011;112 (3):396-400.

12 Du T, Wang Z, Shen Y, Ma J, Cao Y, Haapasalo M. Effect of long-term exposure to endodontic disinfecting solutions on young and old *Enterococcus faecalis* biofilms in dentin canals. *J Endod.* 2014;40(4):509-14.

13 Bevilacqua IM, Habitante SM, Cruz CW. A clorexidina como alternativa no tratamento de infecções endodônticas: revisão da literatura. *Rev. Biociên., Taubaté,* 2004;10(3):139-145.

14 Yared G. Canal preparation using only one Ni-Ti rotary instrument: preliminary observations. *Int Endod J.* 2008;41(4):339-44.

15 Vianna ME, Horz HP, Gomes BPFA, Conrads G. In vivo evaluation of microbial reduction after chemo-mechanical preparation of human root canals containing necrotic pulp tissue. *Int Endod J.* 2006;39:484-92.

16 Gravetter FJ, Wallnau LB. *Statistics for the behavioral sciences.* 2.ed. St. Paul: West Publishing, 1995. 429p.

17 Santos TL, DallMagro E, DallMagro AK, Corrêa B, Fronza BM, Colla F. Ação antimicrobiana do hipoclorito de sódio a 2,5% e clorexidina gel 2% em raízes contaminadas com *Enterococcus Faecalis*. *RFO, Passo Fundo* 2012;17(2):150-155.

18 Siqueira JF Jr, Rôças IN, Santos SR, Lima KC, Magalhães FA, de Uzeda M. Efficacy of instrumentation techniques and irrigation regimens in reducing the bacterial population within root canals. *J Endod.* 2002;28(3):181-4.

19 Mercade M, Sindreu FD, Kuttler S, Roig M, Durany N. Antimicrobial efficacy of 4.2% sodium hypochlorite adjusted to pH 12, 7.5, and 6.5 in infected human root canals. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontology –Universitat Internacional de Catalunya and Nova Southrasterm University.* Barcelona. February 2009; 107(2):295-298.

- 20 Baratto Filho F, Carvalho JR, Fariniuk LF, Sousa Neto MD, Pécora JD, Cruz Filho AM. Morphometric analysis of the effectiveness of different concentrations of sodium hypochlorite with rotatory instrumentation for root canal cleaning. *Braz Dent J.* 2004;15(1):36-40.
- 21 Basmaci F, Öztan MD, Kiyani M. Ex vivo evaluation of various instrumentation techniques and irrigants in reducing *E. faecalis* within root canals. *International Endodontic Journal.* 2013;46:823-830.
- 22 Ferraz CCR, Gomes BPFA, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Comparative study of the antimicrobial efficacy of chlorhexidine gel, chlorhexidine solution and sodium hypochlorite as endodontic irrigants. *Braz Dent J.* 2007; 18(4):294-298.
- 23 Berber VB, Gomes BPFA, Sena NT, Vianna ME, Ferraz CCR, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Efficacy of various concentrations of NaOCl and instrumentation techniques in reducing *Enterococcus faecalis* within root canals and dentinal tubules. *Int Endod J* 2006;39:10-7.
- 24 Bevilacqua IM, Habitante SM, Cruz CW. A clorexidina como alternativa no tratamento de infecções endodônticas: revisão da literatura. *Rev. Biociên., Taubaté,* 2004;10(3):139-145.
- 25 Siqueira JF Jr, Rôças IN, Paiva SSM, Guimarães-Pinto T, Magalhães KM, Lima KC. Bacteriologic investigation of the effects of sodium hypochlorite and chlorhexidine during the endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol, Oral Radiol and Endod* 2007;104: 122-130.
- 26 Bürklein S, Hinschitzka K, Dammaschke T, Schäfer E. Shaping ability and cleaning effectiveness of two single-file systems in severely curved root canals of extracted teeth: Reciproc and WaveOne versus Mtwo and ProTaper. *Int Endod J.* 2012;45(5):449-61.
- 27 Alves FRF, Almeida BM, Neves MAS, Rôças IN, Siqueira JF Jr. Time-dependent Antibacterial Effects of the Self-Adjusting File Used with Two Sodium Hypochlorite Concentrations. *J Endod.* 2011;37(10):1451-5.