



Clorexidina: Estudo crítico dos modelos metodológicos.

Guilherme Henrique Rosa Martins¹

✉: guimart@uol.com.br

Manoel Eduardo de Lima Machado²

✉: professormachado@hotmail.com

Recebido: Enero 2011 – Aceitado: Marzo 2011

¹ Especialista em Endodontia, Mestre e Doutorando em Endodontia – Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, São Paulo – Brasil.

² Prof. Dr. Livre Docente em Endodontia do Departamento de Dentística da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, São Paulo – Brasil.

Introdução:

O avanço tecnológico na Endodontia contribuiu para a realização de um tratamento eficaz, seguro e mais rápido que resulta em alto índice de sucesso clínico. Nestas condições, observou-se a necessidade do uso de substâncias químicas que atuassem mais rápido sob o ponto de vista antimicrobiológico e que apresentassem efeitos residuais como a não permissão da recolonização por microorganismos na dentina. Deste modo, a clorexidina (CHX), é uma das substâncias muito estudada por apresentar propriedades antimicrobianas e ser biocompatível aos tecidos periapicais.

Vários estudos têm sido realizados, com o intuito de se averiguar a ação antimicrobiana da clorexidina através de diferentes metodologias aplicadas a este fim. Entretanto, a interpretação dos resultados destes ensaios deve ser analisada com cautela principalmente quando forem realizados testes em ambientes diferentes ao sistema de canal radicular, tanto *in vivo* como *in vitro*.

Um dos métodos para analisar criticamente e aprofundar sobre o assunto é através da revisão literária, pois deste modo a reflexão e o exercício mental passam a ser os métodos empregados nos trabalhos publicados sobre o assunto pertinente.

Assim sendo, esta revisão bibliográfica compilou trabalhos da última década, em que apresentavam grupos da clorexidina isolada sem associação com outras substâncias, e teve como proposta avaliar a eficiência antimicrobiana quando do seu uso como irrigante durante o preparo do canal radicular e como medicação intracanal. Ademais, observações foram realizadas no que se refere à interpretação dos resultados das investigações realizadas *in vitro* como *in vivo*.

Resultados Interpretativos

Clorexidina como irrigante, in vitro

O uso da clorexidina como irrigante foi encontrado em vinte e dois estudos ^{1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22} como apresentado na Tabela 1, mostrando sua concentração variada de 0.12 a 2% e sob a forma gel ^{2,11,12,19} e líquida ^{1,3,4,5,6,7,8,9,10,13,14,15,16,17,18,20,21,22}. Dos 22 estudos, dezenove ^{1,2,3,4,5,7,9,10,11,12,13,14,16,17,18,19,20,21,22} apresentaram atividade antimicrobiana eficiente. No que se refere a amostra, nove foram testados em dentes humano ^{1,2,7,11,12,15,17,20,21} e dois em bovino ^{10,16}. Quanto ao ambiente experimental, onze foram realizados por cultura bacteriana ^{1,2,3,10,11,12,14,16,17,18,21} e seis ^{4,5,7,9,19,22} por testes microbiológicos. Os métodos avaliativos foram: contagem de unidades formadoras de colônias ^{1,2,3,10,11,12,14,16,17,18,21}, difusão em agar ^{4,5,19,22}, teste de contato ^{7,22}, diluição em caldo ⁹; e outro associado como a Microscopia eletrônica de varredura ¹⁵.

Nos seis estudos ^{6,8,13,15,20} em que a clorexidina não foi eficiente como irrigante, três foram justificados pelos autores ^{6,8,13} devido a baixa concentração testada, por não detoxicar a endotoxina bacteriana ²⁰ e não agir em biofilme em contato direto ¹⁵.

Tabela 1- Trabalhos laboratoriais da clorexidina como irrigante

| Autor | Referência | Metodologia | Resultado |
|--|---------------------|--|---|
| Sen, Safavi e Spånberg ¹ | J Endod (1999) | Cultura bacteriana, cilindro dentinário humano | CHX 0.12% agiu em 1h, como as demais substâncias testadas |
| Ferraz et al. ² | J Endod (2001) | Cultura bacteriana, dentes humanos | CHX 2% gel apresentou resultados semelhantes a outras substâncias testadas |
| Spratt et al. ³ | I Endod J (2001) | Cultura bacteriana, monobiofilme | CHX a 0.2% eficiente contra <i>F.nucleatum</i> , <i>P.micros</i> , <i>P.intermedia</i> e <i>S.intermedius</i> após 1h de contato |
| Leonardo et al. ⁴ | J Endod (2001) | Teste de difusão em ágar | CHX a 2% inibiu todos os <i>Cocci Gram+</i> , <i>Rods Gram -</i> e <i>C.albicans</i> |
| Estrela et al. ⁵ | Braz Dent J (2003) | Teste de difusão em ágar e de exposição direta | CHX a 2% foi eficiente contra <i>S.aureus</i> , <i>E.faecalis</i> , <i>P.aeruginosa</i> , <i>B.subtilis</i> e <i>C.albicans</i> . |
| Sassone et al. ⁶ | Braz Dent J (2003a) | Teste de contato | CHX a 0.12% não eliminou <i>E.faecalis</i> em nenhum tempo experimental |
| Weber et al. ⁷ | J Endod (2003) | Teste de contato, dentina radicular humana | CHX a 2% demonstrou atividade antimicrobiana residual por até 168h. |
| Sassone et al. ⁸ | I Endod J (2003b) | Caldo de cultura | CHX a 0.12% foi incapaz de eliminar o <i>E.faecalis</i> sem interferência do BSA |
| Vianna et al. ⁹ | Oral Surg (2004) | Teste de diluição em caldo | CHX líquida a 1 e 2% mesma eficiência antimicrobiana que o NaOCl a 5.25% |
| Evanov et al. ¹⁰ | J Endod (2004) | Cultura bacteriana, cilindro dentinário bovino | O aumento da T demonstrou uma ação melhorada da CHX contra o <i>E.faecalis</i> |
| Vivaqua-Gomes et al. ¹¹ | I Endod J (2005) | Cultura bacteriana, dentes humanos | A irrigação com CHX a 2% gel contribuiu para a diminuição de microorganismos |
| Dametto et al. ¹² | Oral Surg (2005) | Cultura bacteriana, dentes humanos | A irrigação com CHX gel a 2% manteve níveis baixos de UFC por sete dias |
| Carson, Goodell e McClanahan ¹³ | J Endod (2005) | Macrodiluição, Concentração mínima inibitória e halo de inibição | CHX a 2% não demonstrou a mesma eficiência antimicrobiana que o NaOCl a 6 e 3% e Doxiciclina a 0.1% |
| Portenier et al. ¹⁴ | J Endod (2006) | Cultura bacteriana, com e sem BSA | CHX a 0.2% eliminou <i>E.faecalis</i> em 1h com e sem BSA |
| Clegg et al. ¹⁵ | J Endod (2006) | Cultura bacteriana e MEV, dentes humanos | CHX a 2% foi incapaz de agir sobre o biofilme bacteriano |
| Khademi, Mohammadi e Havaee ¹⁶ | Aust Endod J (2006) | Cultura bacteriana, cilindros dentinários bovinos | CHX a 2% apresentou substantividade por até 21 dias |

| Autor | Referência | Metodologia | Resultado |
|--|---------------------|--|--|
| Ruff, McClanahan e Babel ¹⁷ | J Endod (2006) | Cultura microbiológica, dentes humanos | CHX a 2% apresentou excelente atividade antifúngica como irrigante |
| Sena et al. ¹⁸ | I Endod J (2006) | Cultura microbiológica, monobiofilme | CHX a 2% líquida mais agitação mecânica eliminou todos os microorganismos testados |
| Ferraz et al. ¹⁹ | Braz Dent J (2007) | Teste de difusão em Agar | Eficiência da CHX gel a 2% contra todos os microorganismos testados |
| Oliveira et al. ²⁰ | Oral Surg (2007a) | Teste do lisado do Limulus e produção de anticorpos na cultura do linfócito β , dentes humanos | CHX a 2% não detoxica a endotoxina. |
| Oliveira et al. ²¹ | Oral Surg (2007b) | Cultura microbiológica, dentes humanos | CHX gel a 2% foi efetivo na redução de E. faecalis por 7 dias |
| Sassone et al. ²² | Aust Endod J (2008) | Teste de contato e difusão em ágar. | CHX a 0.5 e 1% foram efetivas contra todas as cepas testadas |

Tabela 2 - Estudos clínicos da clorexidina como irrigação intracanal

| Autor | Referência | Metodologia | Resultado |
|--|-------------------------|--|---|
| Leonardo et al. ²³ | J Endod (1999) | Cultura microbiológica | Redução de anaeróbios de 77.78% pela CHX a 2% |
| Zamany, Safavi e Spångberg ²⁴ | Oral Surg (2003) | Cultura microbiológica | A solução de CHX 2% demonstrou eficiência na desinfecção do canal radicular |
| Tanomaru Filho et al. ²⁵ | J Appl Oral Sci. (2006) | Cultura microbiológica, cães | CHX a 2% manteve a desinfecção dos canais radiculares após a instrumentação por 30 dias |
| Vianna et al. ²⁶ | Int Endod J (2006) | Cultura microbiológica, RTQ-PCR em formato de SYBRGreen e TaqMan | CHX gel a 2% reduziu microorganismos após a instrumentação dos canais. |
| Wang et al. ²⁷ | J Endod (2007) | Cultura microbiológica | CHX gel a 2% foi eficiente na desinfecção dos canais |
| Siqueira et al. ²⁸ | J Endod (2007) | Cultura microbiológica e 16S rRNA | Solução de CHX a 0.12% reduziu a quantidade de microorganismos |
| Siqueira, Paiva e Roças ²⁹ | Oral Surg (2007) | Cultura microbiológica e 16S rRNA | Solução de CHX a 0.12% reduziu a quantidade de microorganismos |

Clorexidina como irrigante, in vivo

Os trabalhos realizados *in vivo* ^{23,24,25,26,27,28,29}, demonstraram eficiência quanto ao uso da clorexidina como agente irrigante durante o preparo do canal radicular e irrigante final sendo apresentado na Tabela 2, com concentração variando de 0.12% ^{28,29} a 2% ^{23,24,25,26,27} (na forma de gel e líquida). Em todos os estudos foram empregados os métodos da cultura microbiológica, com métodos associativos do PTQ-PCR em formato SYBRGreen e TaqMan ²⁶ e 16S rRNA ^{28,29}. Apenas um estudo foi realizado em cães ²⁵ e o restante em humanos ^{23,24,26,27,28,29}.

Clorexidina como medicação intracanal, in vitro

Nos ensaios laboratoriais da clorexidina como medicação intracanal encontram-se dezoito estudos ^{30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47}, sendo apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Trabalhos laboratoriais da clorexidina como medicação intracanal

| Autor | Referência | Metodologia | Resultado |
|--------------------------------|----------------------------|--|--|
| Komorowski et al.30 | J Endod (2000) | Cultura bacteriana, dentina bovina | CHX a 0.2% por sete dias, indicada como medicação intracanal |
| Lima, Fava e Siqueira31 | J Endod (2001) | Cultura bacteriana, monobiofilme | CHX gel a 2% é capaz de eliminar biofilme de E.faecalis |
| Rosa et al.32 | Pesqui Odontol Bras (2002) | Concentração inibitória mínima e bactericida mínima | C.perfringens foi a bactéria mais resistente a todas as medicações testadas. |
| Basrani et al.33 | Oral Surg (2002) | Cultura bacteriana, dentes humanos | CHX gel a 2% por sete dias combate o E.faecalis |
| Ferreira et al.34 | Braz Denr J (2002) | Concentração inibitória mínima e bactericida mínima | CHX a 2% demonstrou atividade antimicrobiana contra as cepas testadas |
| Gomes et al.35 | I Endod J (2003) | Cultura bacteriana, dentina bovina | CHX gel a 2% apresentou maior efetividade por mais de 15 dias |
| Basrani et al.36 | Oral Surg (2003) | Cultura bacteriana, dentes humanos | CHX gel a 2% foi eficaz no combate ao E.faecalis |
| Menezes et al.37 | I Endod J (2004) | Cultura bacteriana, dentes humanos | A solução de CHX a 2% não foi efetiva como medicação intracanal |
| Rosenthal, Spånberg e Safavi38 | Oral Surg (2004) | Cultura bacteriana, dentina bovina | CHX gel a 2% apresentou substantividade por até 12 semanas |
| Abdullah et al. 39 | J Endod (2005) | Cultura bacteriana, E.faecalis em pelota, biofilme e suspensão | CHX a 0.2% não foi eficiente |
| Schäfer & Bössmann40 | J Endod (2005) | Cultura microbiológica, dentes humanos | CHX gel a 2% por 72h foi eficiente como medicação intracanal |
| Gomes et al.41 | Oral Surg (2006) | Teste de difusão em agar e contato direto | CHX a 2% em gel foi uma medicação eficiente |
| Ercan, Dalli e Dülgergil42 | Oral Surg (2007) | Cultura microbiológica, dentes humanos | Eficiência da CHX gel a 2% contra o E.faecalis e C.albicans da dentina |
| Ballal et al.43 | Aust Endod J (2007) | Teste de difusão em agar e contato direto | CHX gel a 2% foi efetiva por 72h sendo indicada como medicação intracanal |

| Autor | Referência | Metodologia | Resultado |
|--|--------------------|---|---|
| Cook, Nandakumar e Fouad ⁴⁴ | J Endod (2007) | Cultura microbiológica e PCR, dentes humanos | CHX a 2% por 10min seguida de obturação foi mais efetiva na remoção de E.faecalis |
| Delgado ⁴⁵ | (2007) | Cultura microbiológica e microscopia de fluorescência, dentes humanos | CHX gel a 2% é indicada como medicação intracanal |
| Krithikadatta, Indira e Dorothykalyani ⁴⁶ | J Endod (2007) | Cultura microbiológica, dentes humanos | CHX gel a 2% foi a mais efetiva das medicações intracanaís contra o E.faecalis |
| Souza-Filho et al ⁴⁷ | Braz Dent J (2008) | Teste de difusão e medição do pH | CHX gel a 2% apresentou atividade antimicrobiana |

Todavia, algumas pesquisas apresentam variações na concentração (0.2 a 2%) e no tempo de contato (entre 10 min a uma semana). Dos 18 estudos, quinze ^{30,31,33,34,35,36, 38,40,41,42,43,44,45,46,47} apresentaram atividade antimicrobiana eficiente, em que sete foram testados em dentes humano ^{33,36,40,42,44,45,46} e três em bovino ^{30,35,38}; sendo onze realizados por cultura microbiológica ^{30,31,33,35,36,48,40,42,44,45,46} e quatro ^{34,41,43,47} por testes microbiológicos. Os métodos avaliativos empregados foram: contagem de unidades formadoras de colônias ^{30,31,33, 35,36,40,42,44,45,46}, difusão em agar ^{34,41,43,47}, teste de contato ^{41,43}, medição do pH⁴⁷; e outros associados como: Microscopia de fluorescência ⁴⁵ e PCR ⁴⁴.

Dos três estudos ^{32,37,39} em que a clorexidina não demonstrou efetividade como medicação intracanal, um teve a clorexidina testada em baixa concentração ³⁹, outro estudo por ter sido realizado um teste para a determinação de concentração inibitória e bactericida mínima ³², e por apresentar atividade antimicrobiana apenas contra uma cepa das duas testadas ³⁷.

Tabela 4 - Ensaios clínicos da clorexidina como medicação intracanal

| Autor | Referência | Metodologia | Resultado |
|-------------------------------|-------------------------------|---|---|
| Manzur et al. ⁴⁸ | J Endod (2007) | Cultura microbiológica | CHX a 2% demonstrou a mesma eficiência antimicrobiana que as demais medicações testadas |
| Paquette et al. ⁴⁹ | J Endod (2007) | Cultura microbiológica e viabilidade por corantes fluorescentes | A solução de CHX 2% não foi eficiente na eliminação de microorganismos de 1 a 2 semanas |
| Vianna et al. ⁵⁰ | Oral microbiol Immunol (2007) | Cultura microbiológica, teste do lisado do Limulus | CHX gel a 2% não detoxicou a endotoxina |

Clorexidina como medicação intracanal, in vivo

Nos trabalhos sobre o assunto ^{48,49,50}, a cultura microbiológica foi dominante sendo associada a microscopia de fluorescência ⁴⁹ e teste do lisado do Limulus ⁵⁰. Pois podemos observar que a clorexidina a 2% líquida demonstrou a mesma eficiência antimicrobiana que as demais medicações testadas quando empregada por sete dias ⁴⁸. De outro lado, ela não foi eficiente na eliminação de microorganismos como medicação intracanal de 1 a 2 semanas, mantendo o mesmo nível de microorganismo presente após a irrigação final ⁴⁹ e como demonstrado *in vitro* ²⁰, não detoxicou a endotoxina bacteriana ⁵⁰. Estes dados podem ser observados na Tabela 4.

Discussão

Frente aos aspectos avaliados, evidenciamos de fundamental importância apresentada, a correlação entre os achados de diferentes autores nos seguintes itens: influência do pH na atividade bactericida, biocompatibilidade das substâncias na região periapical, inativação do fármaco quando da sua performance *in vivo*, interpretação dos resultados obtidos nos experimentos *in vivo* e *in vitro*, desempenho microbiológico, ação do fármaco em ambiente dental, tempo experimental ou observação sobre o tempo de contato.

No que se refere à associação da ação antimicrobiana com o pH, a clorexidina age com um pH entre 5.5 a 8^{41, 23, 28, 47, 27}. Tal fato merece uma melhor interpretação, pois o uso de substância com pH básico, como o hidróxido de cálcio, apresenta grande ação bactericida. Entretanto, substâncias como o iodofórmio, também possui um desempenho antimicrobiano, mas com um pH ácido. Assim sendo, esta questão da ação antimicrobiana associada ao pH, deve ser mais bem interpretada, pois diante o exposto o pH não seria uma condição exclusiva do potencial antimicrobiano.

A biocompatibilidade é um fator que deve ser observado quando do trato de tecidos vivos. Entretanto, na terapia endodôntica é difícil associar substâncias biocompatíveis com a presença de bactérias e a busca da desinfecção. Neste particular, salientamos agressões promovidas pelo hipoclorito de sódio utilizado nas concentrações de 1% até a 6%, causando muitas vezes reações a nível celular que resultam num processo de necrose tecidual. Ademais, tais fatos são observados também quando do uso de medicações intra e extracanalais como o paramonoclorofenol, hidróxido de cálcio e iodofórmio todos com alto grau de toxicidade. Neste particular, a clorexidina na concentração de 2% desempenha sua atividade antimicrobiana com boa tolerância tecidual sendo indicada na terapia das perfurações radiculares e na região periapical quando o ápice estiver aberto⁸, não sendo citotóxica a estas regiões adjacentes²⁰.

Frente a algumas dúvidas envolvendo a eficiência da Clorexidina no uso endodôntico destaca-se que na presença de matéria orgânica, como a albumina bovina sérica (BSA) *in vitro* e em contato com as substâncias irrigantes e medicações intracanalais, o fármaco tem sua ação antimicrobiana diminuída^{8,14}. De acordo com Wang et al. (2007), seu pH reduz na presença de material orgânico, e também, não possui a capacidade de dissolver material orgânico². Entretanto, a clorexidina não se constitui numa barreira intracanal efetiva, permitindo microinfiltração de fluídos periapicais; além de não apresentar radiopacidade⁴⁷.

Sob o ponto de vista metodológico, deve-se ter cautela quando da comparação e correlação dos resultados de ensaios *in vivo* e *in vitro*, pois devemos observar quais os métodos que possam ser aplicáveis dentro de uma realidade clínica⁴¹. A dificuldade em se estabelecer paralelos nos ensaios *in vivo* e *in vitro*, está relacionada ao ambiente de estudo. Nos ensaios *in vitro*, utilizando metodologias como o teste de contato direto²³ e a determinação da concentração mínima inibitória e bactericida⁶, são pesquisas em que na sua grande maioria são efetuadas com uma única cepa microbiológica a fim de verificar a ação de determinada substância sobre determinado microorganismo específico, completamente diferente do ecossistema apresentado *in vivo*.

Do ponto de vista microbiológico, o desempenho dos fármacos varia de acordo com o microorganismo testado, da sua forma de apresentação e do meio em que se apresenta³⁹, pois exemplificando, observamos a não eficiência da clorexidina como irrigante em biofilme de único microorganismo, como nos trabalhos de Spratt et al. (2001) e Clegg et al. (2006), sendo que esta mesma droga apresenta resultados positivos quando associada a uma agitação mecânica¹⁸. Outro fator a ser observado é que nos ensaios clínicos, a relação simbiótica dos microorganismos é mais complexa, permitindo a competição e a dependência entre as espécies favorecendo a sobrevivência de determinados microorganismos^{41,28}. Assim sendo, a ação das substâncias poderá ser efetiva e seletiva contra determinadas espécies⁹, ao passo que em estudos laboratoriais, utilizam-se cepas específicas que se apresentaram mais resistentes em estudos clínicos sendo utilizadas como marcadores microbiológicos *in vitro*³³.

Quanto ao emprego de cilindros dentinários como amostra experimental, estes métodos podem permitir algumas associações com a realidade clínica. Todavia algumas limitações são observadas, como o uso da dentina bovina que pode apresentar alterações, pois o lúmen do canal é maior que o da dentina humana, propiciando de maneira diferente o processo de infecção microbiológica³³. Desse modo, observa-se uma quantidade maior de trabalhos *in vitro* sendo realizados em dentina humana^{1,2,7,11,12,15,17,20,21,33,36,40,42,44,45,46}. Esta metodologia busca obter resultados mais próximos das condições clínicas.

No que tange ao tempo experimental (clínico e de contato) empregado em ambos os ensaios, foi observado nos trabalhos laboratoriais que utilizaram metodologicamente cilindros dentinários como amostras ou raízes dentárias com o mesmo tempo experimental, que apresentaram resultados semelhantes na ação antimicrobiana quando comparados às investigações *in vivo*. Dentre os períodos, a clorexidina foi empregada como irrigante em torno de 30 min^{1,2,11,12,15,17,20,23,25,27} e como medicação intracanal, observaram períodos de sete a catorze dias^{33,36,37,40,42,44,45,46,58}.

Após o assunto exposto, verifica-se a necessidade da realização de novos estudos principalmente quanto a novos métodos investigativos para que se possa compreender melhor a ação antimicrobiana da clorexidina no ambiente endodôntico.

Conclusões:

Após a análise literária e metodológica, pode-se concluir que:

- a) A clorexidina a 2% empregada como irrigante e medicação intracanal se apresentou mais eficiente quanto à atividade antimicrobiana.
- b) Os estudos realizados da Clorexidina como irrigante e medicação intracanal, tanto *in vivo* como *in vitro* se apresentaram com desempenho semelhantes.

Referências:

- (1) Sen BH, Safavi KE, Spångberg LS. Antifungal effects of sodium hypochlorite and chlorhexidine in root canals. *J Endod.* 1999; 25(4): 235-8.
- (2) Ferraz CC, Gomes BP, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. In vitro assessment of the antimicrobial action and the mechanical ability of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant. *J Endod.* 2001; 27(7): 452-5.
- (3) Spratt DA, Pratten J, Wilson M, Gulabivala K. An in vitro evaluation of the antimicrobial efficacy of irrigants on biofilms of root canal isolates. *Int Endod J.* 2001; 34(4): 300-7.
- (4) Leonardo MR, da Silva LA, Filho MT, Bonifácio KC, Ito IY. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of a castor oil-based irrigant. *J Endod.* 2001; 27(12): 717-9.
- (5) Estrela C, Ribeiro RG, Estrela CR, Pécora JD, Sousa-Neto MD. Antimicrobial effect of 2% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine tested by different methods. *Braz Dent J.* 2003; 14(1): 58-62.
- (6) Sassone LM, Fidel RA, Fidel SR, Dias M, Hirata RJ. Antimicrobial activity of different concentrations of NaOCl and chlorhexidine using a contact test. *Braz Dent J.* 2003a; 14(2): 99-102.
- (7) Weber CD, McClanahan SB, Miller GA, Diener-West M, Johnson JD. The effect of passive ultrasonic activation of 2% chlorhexidine or 5.25% sodium hypochlorite irrigant on residual antimicrobial activity in root canals. *J Endod.* 2003; 29(9): 562-4.
- (8) Sassone LM, Fidel R, Fidel S, Vieira M, Hirata R. The influence of organic load on the antimicrobial activity of different concentrations of NaOCl and chlorhexidine in vitro. *Int Endod J.* 2003b; 36(12): 848-52.
- (9) Vianna ME, Gomes BPFA, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CCR, 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; 97(1): 79-84.
- (10) Evanov C, Liewehr F, Buxton TB, Joyce AP. Antibacterial efficacy of calcium hydroxide and chlorhexidine gluconate irrigants at 37 degrees C and 46 degrees C. *J Endod.* 2004; 30(9): 653-7.
- (11) Vivacqua-Gomes N, Gurgel Filho ED, Gomes BP; Ferraz CC; Zaia AA; Souza-Filho FJ. Recovery of *Enterococcus faecalis* after single or multiple-visit root canal treatments carried out in infected teeth ex vivo. *Int Endod J.* 2005; 38(10): 697-704.
- (12) Dametto FR, Ferraz CCR, Gomes BPFA, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. In vitro of the immediate and prolonged antimicrobial action of chlorhexidine gel as na endodontic irrigant against *Enterococcus faecalis*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005; 99(6): 768-72.
- (13) Carson KR, Goodell GG, McClanahan SB. Comparison of the antimicrobial activity of six irrigants on primary endodontic pathogens. *J Endod.* 2005 ; 31(6): 471-3.
- (14) Portenier I, Waltimo T, Ørstavik D, Haapasalo M. Killing of *Enterococcus faecalis* by MTAD and chlorhexidine digluconate with or without cetrimide in the presence or absence of dentine powder or BSA. *J Endod.* 2006; 32(2): 138-41.
- (15) Clegg MS, Vertucci FJ, Walker C, Belanger M, Britto LR. The effect of exposure to irrigant solutions on apical dentin biofilms in vitro. *J Endod.* 2006; 32(5): 434-7.
- (16) Khademi A, Mohammadi Z, Havaee A. Evaluation of the antibacterial substantivity of several intra-canal agents. *Aust Endod J.* 2006; 32:112-5.
- (17) Ruff ML, McClanahan SB, Babel BS. In vitro antifungal efficacy of four irrigants as a final rinse. *J Endod.* 2006; 32(4): 331-3.

- (18) Sena NT, Gomes BP, Vianna ME, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, et al. In vitro antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine against selected single-species biofilms. *Int Endod J.* 2006; 39(11): 878-85.
- (19) Ferraz CC, Gomes BP, 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): 294-8.
- (20) Oliveira DP, Barbizam JVB, Trope M, Teixeira FB. In vitro antibacterial efficacy of endodontic irrigants against *Enterococcus faecalis*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007a; 103(5): 702-6.
- (21) Oliveira LD, Jorge AOC, Carvalho CAT, Ito CYK, Valera MC. In vitro effects os endodontics irrigants on endotoxins in root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007b; 104(1): 135-42.
- (22) Sassone LM, Fidel RAS, Murad CF, Fidel SR, Hirata Jr R. Antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine by two different tests. *Aust Endod J.* 2008; 34(1): 19-24.
- (23) Leonardo MR, Tanomaru Filho M, Silva LA, Nelson Filho P, Bonifácio KC, Ito IY. In vivo antimicrobial activity of 2% chlorhexidine used as a root canal irrigating solution. *J Endod.* 1999; 25(3): 167-71.
- (24) Zamany A, Safavi K, Spångberg LS. The effect of chlorhexidine as an endodontic disinfectant. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003; 96 (5): 578-81.
- (25) Tanomaru Filho M, Yamashita JC, Leonardo MR, Silva LAB, Tanomaru JMG, Ito IY. In vivo microbiological evaluation of the effect of biomechanical preparation of root canals using different irrigating solutions. *J Appl Oral Sci.* 2006; 14(2): 105-10.
- (26) Vianna ME, Horz HP, Gomes BP, 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(6): 484-92.
- (27) Wang CS, Arnold RR, Trope M, Teixeira FB. Clinical efficiency of 2% chlorhexidine gel in reducing intracanal bacteria. *J Endod.* 2007; 33(11): 1283-9.
- (28) Siqueira JF, Rôças IN, Paiva SS, Guimarães-Pinto T, Magalhães KM, Lima KC. Bacteriologic investigation of the effects of sodium hypochlorite and chlorhexidine during the endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007; 104(1): 122-30.
- (29) Siqueira JF, Paiva SS, Rôças IN. Reduction in the cultivable bacterial populations in infected root canals by a chlorhexidine-based antimicrobial protocol. *J Endod.* 2007; 33(5): 541-7.
- (30) Komorowski R, Grad H, Wu XY, Friedman S. Antimicrobial substantivity of chlorhexidine-treated bovine root dentin. *J Endod.* 2000; 26(6): 315-7.
- (31) Lima KC, Fava LR, Siqueira JF. Susceptibilities of *Enterococcus faecalis* biofilms to some antimicrobial medications. *J Endod.* 2001; 27(10): 616-9.
- (32) Rosa OP, Torres AS, Ferreira CM, Ferreira FB. In vitro effect of intracanal medicaments on strict anaerobes by means of the broth dilution method. *Pesqui Odontol Bras.* 2002; 16(1): 31-6.
- (33) Basrani B, Santos JM, Tjäderhane L, Grad H, Gorduysus O, Huang J, et al. Substantive antimicrobial activity in chlorhexidine-treated human root dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002; 94(2): 240-5.
- (34) Ferreira CM, da Silva Rosa OP, Torres SA, Ferreira FB, Bernardinelli N. Activity of endodontic antibacterial agents against selected anaerobic bacteria. *Braz Dent J.* 2002; 13(2): 118-22.

- (35) Gomes BPFA, Souza SFC, Ferraz CCR, Teixeira FB, Zaia AA, Valdrighi L et al. Effectiveness of 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis* in bovine root dentine in vitro. *Int Endod J.* 2003; 36:267-75.
- (36) Basrani B, Tjäderhane L, Santos JM, Pascon E, Grad H, Lawrence HP, et al. Efficacy of chlorhexidine and calcium hydroxide-containing medicaments against *Enterococcus faecalis* in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003; 96(5): 618-24.
- (37) Menezes MM, Valera MC, Jorge AO Koga-Ito CY; Camargo CH; Mancini MN. In vitro evaluation of the effectiveness of irrigants and intracanal medicaments on microorganisms within root canals. *Int Endod J.* 2004; 37(5): 311-9.
- (38) Rosenthal S, Spångberg L, Safavi K. Chlorhexidine substantivity in root canal dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004; 98(4): 488-92.
- (39) Abdullah M, Ng YL, Gulabivala K, Moles DR, Spratt DA. Susceptibilities of two *Enterococcus faecalis* phenotypes to root canal medications. *J Endod.* 2005; 31(1): 30-6.
- (40) Schäfer E, Bössmann K. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine and two calcium hydroxide formulations against *Enterococcus faecalis*. *J Endod.* 2005; 31(1): 53-6.
- (41) Gomes BPFA, Vianna ME, Sena NT, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza-Filho FJ. In Vitro evaluation of the antimicrobial activity of calcium hydroxide combined with chlorhexidine gel used as intracanal medicament. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006; 102(4): 544-50.
- (42) Ercan E, Dalli M, Dülgergil ÇT. In vitro assessment of the effectiveness of chlorhexidine gel and calcium hydroxide paste with chlorhexidine against *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006;102:e27-e31.
- (43) Ballal V, Kundabala M, Acharya S, Ballal M. Antimicrobial action of calcium hydroxide, chlorhexidine and their combination on endodontic pathogens. *Aust Dent J.* 2007; 52(2):118-21.
- (44) Cook J, Nandakumar R, Fouad AF. Molecular- and culture-based comparison of the effects of antimicrobial agents on bacterial survival in infected dentinal tubules. *J Endod.* 2007; 33(6): 690-2.
- (45) Delgado, Ronan Jacques Rezende. Avaliação in vitro da viabilidade de *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans* nos túbulos dentinários após a aplicação de hidróxido de cálcio e clorexidina gel 2%. [Dissertação de Mestrado]. Bauru: Faculdade de Odontologia da USP; 2007.
- (46) Krithikadatta J, Indira R, Dorothykalyani AL. Disinfection of dentinal tubules with 2% chlorhexidine, 2% metronidazole, bioactive glass when compared with calcium hydroxide as intracanal medicaments. *J Endod.* 2007; 33(12): 1473-6.
- (47) Souza-Filho FJ, Soares AJ, Vianna ME, Zaia AA, Ferraz CC, Gomes BP. Antimicrobial effect and pH of chlorhexidine gel and calcium hydroxide alone and associated with other materials. *Braz Dent J.* 2008; 19(1): 28-33.
- (48) Manzur A, González AM, Pozos A, Silva-Herzog D, Friedman S. Bacterial quantification in teeth with apical periodontitis related to instrumentation and different intracanal medications: a randomized clinical trial. *J Endod.* 2007; 33(2): 114-8.
- (49) Paquette L, Legner M, Fillery ED, Friedman S. Antibacterial efficacy of chlorhexidine gluconate intracanal medication in vivo. *J Endod.* 2007; 33(7): 788-95.
- (50) Vianna ME, Horz HP, Conrads G, Zaia AA, Souza-Filho FJ, Gomes BP. Effect of root canal procedures on endotoxins and endodontic pathogens. *Oral Microbiol Immunol.* 2007; 22(6): 411-8.