



REVISTA CIENTÍFICA DA UMC

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO HIPOCLORITO DE SÓDIO EM DIFERENTES TEMPOS DE USO****T EVALUATION OF THE ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF SODIUM HYPOCHLORITE AT DIFFERENT TIMES OF USE**

Lana de Abreu Lunardi, Márcia Yoshiko Naka, Lilian Eiko Maekawa, Neivaldo José Alves Souza, Adriana Chung

Resumo:

Diversos fatores podem interferir na estabilidade das soluções de NaOCl, como o ar, pH, temperatura e exposição a luz. Por serem soluções instáveis devido a sua volatilidade, seu efeito antimicrobiano pode também ser afetado. Deste modo, a proposta deste trabalho foi avaliar *in vitro* a atividade antimicrobiana das concentrações 0,5%, 1% e 2,5% de hipoclorito de sódio sobre *Enterococcus faecalis*, em diferentes tempos de uso e armazenagem, após aberta a embalagem. As amostras foram divididas em 38 grupos de acordo com a concentração da solução, com o tempo, e com o local de armazenamento. As concentrações de 0,5%, 1% e 2,5% de NaOCl foram avaliadas nos tempos de 0h e 4h, 24h, 48h, 15 dias e 44 dias. Tubos de ensaio contendo 3 ml de meio de cultura (TSB) foram contaminados com 100 µL de suspensão contendo 10⁶ céls/ml de *E. faecalis*., 3 ml da solução de NaOCl e mantidos em estufa a 37^o±1^oC. Os resultados mostraram que houve crescimento de UFC/ml na concentração de 2,5% na embalagem original em 0h e 44 dias e na concentração de 0,5% no pote de vidro e na cuba de inox em 48h. Concluiu-se que a turbidez do meio não indica obrigatoriamente crescimento de UFC/ml e que a forma de armazenamento no tempo de até 4h não diminui a atividade antimicrobiana das soluções de NaOCl.

Palavras-chave: hipoclorito de sódio, *E. faecalis*, solução irrigadora

Abstract:

Several factors can interfere with the stability of NaOCl solutions, such as air, pH, temperature and exposure to light. Because they are unstable solutions due to their volatility, their antimicrobial effect may also be affected. Thus, the purpose of this work was to evaluate *in vitro* the antimicrobial activity of concentrations 0.5%, 1% and 2.5% of sodium hypochlorite on *Enterococcus faecalis*, at different times of use and storage, after opening the package. divided into 38 groups according to solution concentration, time, and storage location. The concentrations of 0.5%, 1% and 2.5% of NaOCl were evaluated at 0h and 4h, 24h, 48h, 15 days and 44 days. Test tubes containing 3 mL of culture medium (TSB) were contaminated with 100 µL of suspension containing 10⁶ cells/ml of *E. faecalis*., 3 mL of NaOCl solution and kept in an oven at 37^o±1^oC. The results showed that there was an increase in CFU/mL in the 2.5% concentration in the original packaging in 0h and 44 days and in the 0.5% concentration in the glass pot and in the stainless-steel tank in 48h. It was concluded that the turbidity of the medium does not necessarily indicate growth in CFU/mL and that storage for up to 4 hours does not reduce the antimicrobial activity of NaOCl solutions.

Keywords: sodium hypochlorite, *E. faecalis*, irrigating solution

INTRODUÇÃO

A presença de microrganismos desempenha um papel importante no desenvolvimento e manutenção de lesões periapicais (SHAHRANI, M. A. et al., 2014), sendo que a eliminação de microrganismos e seus produtos é o principal objetivo do tratamento endodôntico (PUPO M. S. et al., 2014). A resistência de agentes patogênicos pode ser uma das razões de insucesso no tratamento endodôntico (REYHANI, M. F. et al., 2016).

Enterococcus faecalis (*E. faecalis*) é um microrganismo anaeróbio facultativo gram-positivo de espécie bacteriana, patógeno oportunista, que tem grande capacidade de formar biofilme. O biofilme bacteriano protege as bactérias do sistema imunológico, aumentando sua resistência. Este microrganismo é também resistente a ação de substâncias irrigantes, ácidos, ambientes básicos, e agentes antimicrobianos, capaz de invadir a dentina tubular e superficial, sobrevivendo a amplas variações de temperatura.

Este microrganismo é de fácil proliferação, sendo uma das bactérias mais comuns presentes na maioria das infecções do canal radicular, tendo sido identificados nas infecções endodônticas em diversos estudos (TIRALI, R. E. et al., 2012; CHAITANYA, B. V. et al., 2016; REYHANI, M. F. et al., 2016; AFKHAMI, F. et al., 2017). Com o intuito de eliminar microrganismos e seus produtos, durante o tratamento endodôntico, diversos tipos de substâncias químicas auxiliares são utilizados durante a fase de instrumentação (SHAHRANI, M. A. et al., 2014).

O Hipoclorito de Sódio (NaOCl) é a solução mais utilizada comumente nas concentrações de 0,5 a 6 % em Endodontia (PUPO M. S. et al., 2014). É um excelente agente antimicrobiano com capacidade de dissolução do tecido orgânico, baixa tensão superficial, além de baixo custo e facilmente disponível.

Sua atividade antimicrobiana ocorre devido à formação do ácido hipocloroso, que libera cloro nascente, o qual se liga ao grupamento amina (NH) dos aminoácidos, formando cloraminas, interferindo no metabolismo celular e inibindo a função enzimática bacteriana a partir de uma oxidação irreversível dos grupos SH (sulfidril) de enzimas bacterianas essenciais (Vianna, 2002). Diversos estudos (Ferraz *et al.*, 2001; Gomes *et al.*, 2001; Vianna *et al.*, 2004; Valera et al., 2009) analisaram a

atividade antimicrobiana do NaOCl comprovaram sua efetividade. A concentração do hipoclorito de sódio foi capaz de eliminar *E. faecalis* porém em tempos diferentes, dependendo da concentração utilizada (Gomes et al. 2001).

O NaOCl também possui efetiva ação detergente, surfactante e possui baixa tensão superficial, ação desodorizante, clareadora e lubrificante (Bloomfield, Miles, 1979), propriedades estas que contribuíram para que esta fosse a substância química auxiliar de escolha durante a instrumentação na prática clínica.

No entanto, a utilização do hipoclorito de sódio como solução irrigadora de canais radiculares tem suas limitações quanto à neutralização de endotoxinas e biocompatibilidade (Oliveira et al., 2007). Possui também odor, forte gosto, além de ser muito volátil (FILHO, M. T. et al., 2006, REYHANI, M. F. et al., 2016, ZAN, R. et al., 2016). A instabilidade inerente das soluções de NaOCl podem ser afetados pela luz, ar, pH, contaminantes orgânicos e inorgânicos (FRAIS, S. et al., 2001).

O NaOCl por ser facilmente degradado devido a sua volatilidade, tem seu prazo de validade reduzido, bem como sua efetividade. As soluções mais concentradas apresentam maior atividade antibacteriana, desde que outros fatores como tempo de atuação, pH, temperatura e conteúdo orgânico, sejam mantidos constantes. Pela instabilidade do hipoclorito de sódio é aconselhável que as soluções sejam adquiridas dentro do prazo de validade e mais próximos a fabricação, pois perdem a eficiência com a elevação da temperatura, exposição da luz, ar e quando armazenadas por longos períodos de tempo (LOPES P. H. et al., 1999).

Uma vez que, esse processo de degradação pode ser acelerado de acordo com a exposição de luz, ar e temperatura, o objetivo deste estudo foi avaliar in vitro a atividade antimicrobiana das concentrações de hipoclorito de sódio de 0,5%, 1% e 2,5% sobre o *E. faecalis* em diferentes tempos de uso (0h, 4h, 24h, 48h, 15 dias e 44 dias) e armazenagem (embalagem original, pote de vidro e cuba de inox), após aberta a embalagem.

MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto de pesquisa foi realizado no laboratório de Microbiologia da Universidade de Mogi das Cruzes – UMC – Campus de Mogi das Cruzes, com o objetivo de avaliar a atividade antimicrobiana sobre *Enterococcus faecalis* do hipoclorito de sódio nas concentrações de 0,5, 1 e 2,5 % após aberta a embalagem, em diferentes tempos de uso e de armazenagem.

Para isso, os grupos foram divididos de acordo com a concentração da solução, com o tempo (após aberta a embalagem), e com o local de armazenamento (Quadro 1). Grupo controle positivo foi realizado onde a solução de NaOCl não foi acrescentada. Grupo controle negativo foi considerado o meio TSB sem adição da suspensão de *E. faecalis*.

Quadro 1- Grupos de acordo com a concentração, tempo e armazenagem*

Grupos	Substância Química Auxiliar	Tempo	Armazenagem
1	Hipoclorito de Sódio 0,5 %	0h	Embalagem do Fabricante (E)
2		4h	E
3			Pote de Vidro (V)
4			Cuba de Inox (I)
5		24h	E
6			V
7		48h	E
8			V
9		15 dias	E
10			V
11		44 dias	E
12			V
13	Hipoclorito de Sódio 1 %	0h	E
14		4h	E
15			V
16			I
17		24h	E
18			V
19		48h	E
20			V
21		15 dias	E
22			V
23		44 dias	E
24			V
25		0h	E

26	Hipoclorito de Sódio 2,5 %	4h	E
27			V
28			I
29		24h	E
30			V
31		48h	E
32			V
33		15 dias	E
34			V
35		44 dias	E
36			V

*Informações utilizadas no experimento

A seleção do pote de vidro como meio de armazenamento justifica-se pela interferência da luz.

A seleção da cuba de inox como meio de armazenagem justifica-se pelo fato de alguns profissionais utilizarem a cuba de inox para colocação do NaOCl (solução irrigadora) durante o tratamento endodôntico. Visto que o contato do NaOCl com a cuba de inox por longo período de tempo pode ocasionar oxidação da cuba, o presente estudo teve como objetivo avaliar também a interferência desta interação (NaOCl e cuba de inox) com a efetividade antimicrobiana do NaOCl. Para este tipo de armazenamento foram realizadas análises de até 4 horas, simulando o que ocorre na prática clínica.

Para cada tempo e forma de armazenagem estudados neste projeto foram realizadas as seguintes.

PREPARO DA SUSPENSÃO DE *E. faecalis* (ATCC 4083)

Enterococcus faecalis foram semeados em placas de Petri contendo ágar Infuso Cérebro-Coração (BHI). Em seguida, as placas foram incubadas em estufa microbiológica a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 horas. À partir do crescimento nas placas, foram preparadas suspensões em caldo Soja Trypticaseína (TSB) contendo 10^6 céls/ml, pela escala 5 de MacFarland.

Contaminação dos espécimes e grupos experimentais

As soluções de NaOCl usadas neste experimento foram abertas no tempo de 0h, onde 150 ml de cada solução foram transferidos para o pote de vidro esterilizado. Outros 150 ml também foram transferidos para a cuba de inox esterilizada. Deste modo, na embalagem original permaneceram 700 ml de solução de hipoclorito de sódio. As soluções, para todas as formas de armazenamento (embalagem original, pote de vidro e cuba de inox), foram mantidas em local fresco.

Tubos de ensaio contendo 3 ml de meio de cultura (TSB) foram contaminados com 100 µL da suspensão de *E. faecalis*, preparada anteriormente. Em seguida, 3 ml de cada solução de NaOCl (ASFER, São Caetano do Sul, São Paulo, Brasil) a ser estudada foram adicionados ao tubo de ensaio, que foram agitados manualmente e mantidos em estufa a $37^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$, por 24 a 48 horas. No grupo controle positivo, apenas a suspensão de *E. faecalis* foi adicionada ao tubo contendo caldo TSB.

Após o período de incubação, foi realizada avaliação da turbidez do meio. Alíquotas de 100 µL dos tubos de ensaio que se apresentaram positivo para turbidez do meio, foram então, semeados em ágar BHI e mantidas em estufa a $37^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$, por 24 a 48 horas para posterior contagem de UFC/ml.

Os resultados foram submetidos à análise descritiva.

RESULTADOS

Os resultados de turbidez do meio e contagem de UFC/ml de cada concentração de NaOCl armazenados na embalagem original, pote de vidro e cuba de inox, encontram-se na Tabela 1, 2 e 3 respectivamente.

O grupo controle positivo, constituído pelo caldo TSB contaminado com *E. faecalis*, obteve resultado positivo para o teste de turbidez e mais de 1 milhão de UFC/ml.

Tabela 1 - Controle positivo e negativo das embalagens do fabricante

Porcentagem do NaOCl		Resultados obtidos nos tempos					
		0h	4h	24h	48h	15 dias	44 dias
0,50%	Turbidez	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	UFC/ml	0	0	0	0	0	0
1%	Turbidez	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	UFC/ml	0	0	0	0	0	0
2,50%	Turbidez	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
	UFC/ml após 24h de incubação	1140 UFC/ml	0	0	0	0	50 UFC/ml
	UFC/ml após 48h de incubação	0					0

Os resultados mostraram que na embalagem original do fabricante, o NaOCl de 2,5% apresentou turbidez do meio nos tempos de 0h, 48h, 15 dias e 44 dias na embalagem original; 48h e 15 dias, no pote de vidro e 4h na cuba de inox. Crescimento de UFC/ml realizada após 24h de incubação foi observada para os tempos de 0h e 44 dias da embalagem original (1140 UFC/ml e 50 UFC/mL, respectivamente). Porém, após 48h de incubação das mesmas amostras (tubos), o mesmo não pôde ser observado, indicando cultura negativa.

Tabela 2 – Controle positivo e negativo das embalagens de vidro

Porcentagem Do NaOCl		Resultados obtidos nos tempos				
		4h	24h	48h	15 dias	44 dias
0,50%	turbidez	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
	UFC/ml	0	0	(+ de 1 milhão)	0	0
1%	turbidez	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	UFC/ml	0	0	0	0	0
2,50%	turbidez	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)
	UFC/ml	0	0	0	0	0

No armazenamento em pote de vidro, turbidez do meio foi observada para o NaOCl 2,5% nos tempos de 48h e 15 dias, porém sem crescimento de UFC/ml. No tempo de 48h foi observada turbidez do meio quando o NaOCl 0,5% foi avaliado, bem

como crescimento de mais de 1 milhão de UFC/ml de *E. faecalis*.

Tabela 3 – Controle positivo e negativo das embalagens de inox

Porcentagem		Resultados obtidos nos tempos
Do NaOCl		
		4h
0,50%	Turbidez	(+)
	UFC/ml	+ de 1 milhão
1%	Turbidez	(-)
	UFC/ml	0
2,50%	Turbidez	(+)
	UFC/ml	0

O NaOCl 0,5% armazenado em cuba de inox apresentou resultados positivos para turbidez do meio e crescimento de mais de 1 milhão de UFC/ml. Apesar do NaOCl 2,5% apresentar-se positivo para turbidez, UFC/ml não foi observado.

DISCUSSÃO

A instrumentação de canais radiculares tem como objetivo obter a limpeza e desinfecção do sistema de canais radiculares, entretanto, é possível que, mesmo após a remoção dos microrganismos e produtos tóxicos, endotoxinas, capazes de induzir ou manter lesões periapicais, permaneçam no sistema de canais radiculares, predispondo o caso ao insucesso (Leonardo, 2005).

Desde 1915, o hipoclorito de sódio foi utilizado por Dakin para a limpeza de feridas, mas somente em 1936, esta substância foi sugerida para uso odontológico por Walker. À partir de 1943, sua utilização na instrumentação de canais radiculares em diferentes concentrações foi difundida, sendo esta substância a mais utilizada mundialmente como substância química auxiliar durante preparo dos canais radiculares, etapa essencial para o sucesso do tratamento endodôntico (Marchesan et al., 2003).

Clarkson et al. (2001) afirma que o hipoclorito de sódio, por ser um potente

agente oxidante, o nível de cloro liberável é um fator crítico que está diretamente ligado à sua efetividade tornando-o uma solução muito instável. O hipoclorito de sódio deteriora-se com o tempo, exposição à luz e calor, quando em contato com o ar, íons metálicos e materiais orgânicos, justificando o interesse de estudar essa degradação no presente estudo, visto que na prática clínica, as soluções de hipoclorito de sódio podem perder sua efetividade, mesmo estando dentro do prazo de validade fornecido pelo fabricante. Por este motivo, o profissional deverá estar atento aos cuidados a fim de prolongar a validade do produto para que o tratamento endodôntico não tenha insucesso.

No presente estudo, todas as concentrações de NaOCl testadas foram efetivas contra *E. faecalis*, diminuindo ou eliminando completamente a quantidade de microrganismos, corroborando com estudos anteriores (Chaitanya et al., 2016; Mohammad et al. 2016; Pupo et al., 2014; Flach et al., 2016; Dagna et al., 2011; Ferraz et al., 2001; Gomes et al., 2001; Vianna et al., 2004; Valera et al., 2009).

No presente estudo, o NaOCl 1% foi capaz de eliminar *E. faecalis* em todos tempos e formas de armazenamento estudados. Na embalagem original, todas as concentrações de NaOCl estudadas foram efetivas contra *E. faecalis* em todos os tempos estudados, após 48 horas de incubação.

Em algumas amostras da embalagem original, pôde ser observado que imediatamente após o contato do NaOCl 2,5% com o meio de cultura TSB (tempo 0h e 48h, 15 dias e 44 dias após aberta a embalagem) houve uma alteração de cor do meio, indicando turbidez do meio de cultura diferente daquela observada no grupo controle positivo. O hipoclorito de sódio tem propriedade alvejante, causando branqueamento de estrutura devido oxidação de matéria orgânica. Não se sabe quimicamente o que ocorreu na reação de contato da solução de hipoclorito de sódio com o meio de cultura, mas esta reação deve ter interferido na ação antimicrobiana do hipoclorito de sódio inicialmente, explicando o crescimento de UFC/ml nas primeiras 24 horas de incubação nos tempos de 0h e 44 dias. Esta reação pode ter retardado a ação antimicrobiana do NaOCl, porém sem inibi-la, uma vez que na análise de 48 horas de incubação, não houve crescimento de UFC/ml. Os resultados indicam ainda que presença de turbidez do meio não indica proliferação microbiana.

Quando avaliado a forma de armazenamento em pote de vidro, onde o NaOCl

ficou exposto à luz, podendo acelerar sua degradação e, portanto, sua efetividade antimicrobiana (Rutala et al. 1998; Aparecida Nicoletti 1996), os resultados mostraram turbidez do meio e crescimento de mais de 1 milhão de UFC/ml às 48h após aberta a embalagem na concentração de NaOCl 0,5%. Nos demais tempos e concentrações de NaOCl estudados não houve crescimento de UFC/ml. A mesma turbidez observada do meio na embalagem original, também foi observada em duas amostras de NaOCl 2,5% (tempos 48 horas e 15 dias) quando armazenados em pote de vidro, porém sem crescimento microbiano, reforçando a hipótese da reação NaOCl 2,5% + meio de cultura. Pelos resultados obtidos em até 44 dias, a luz não parece ter interferido significativamente na efetividade das soluções de NaOCl.

Embora diversos estudos (APARECIDA NICOLETTI et al., 1996; RUTALA et al., 1998) tenham comprovado que a luz degrada mais rapidamente essas soluções, no presente estudo isto não foi observado. Apenas em uma única amostra de NaOCl 0,5% (48 horas) o hipoclorito de sódio não foi efetivo. Isto pode ser explicado pelas concentrações analisadas serem mais baixas, portanto, mais estáveis. Quanto maior a concentração de NaOCl, mais instáveis elas são. Apesar da literatura mostrar que a luz e o ar diminuem a vida útil do NaOCl, esta diminuição não foi significativa a ponto de diminuir a eficácia antimicrobiana das soluções analisadas.

A escolha de estudar a cuba de inox como forma de armazenamento do NaOCl justifica-se por muitos profissionais utilizarem este item para colocação da substância química auxiliar na prática clínica. Visto que muitos profissionais atualmente realizam tratamento endodôntico em sessão única, ou que algumas escolas adotam este item também como forma de armazenamento, o período de 4 horas foi analisado, que seria o tempo provável que a solução permaneceria dentro da cuba de inox. JOHNSON et al., (1993) afirmam que o NaOCl reage com metais e íons metálicos, por meio de oxidação. Sabe-se que NaOCl é um potente agente oxidante e, portanto, podendo reagir com a cuba de inox. Esta reação pode diminuir a vida útil da solução, causando sua degradação mais rápida e, conseqüentemente, diminuir sua efetividade antimicrobiana.

No presente estudo, o NaOCl 0,5% não foi efetivo contra *E. faecalis* quando armazenado em cuba de inox. No tempo de 4 horas, o NaOCl 0,5% foi efetivo contra *E. faecalis* em todas as outras formas de armazenamento (embalagem original e pote

de vidro) exceto quando armazenado em cuba de inox. Nesta amostra, o meio apresentou-se turvo e com crescimento de mais de 1 milhão de UFC/ml. A turbidez observada foi semelhante àquela observada no grupo controle positivo. Este resultado está de acordo com Johnson e Remeikis (1993), indicando que o NaOCl é degradado mais rapidamente. Provavelmente os íons metálicos presentes na cuba de inox devem concorrer com as bactérias, diminuindo a efetividade do NaOCl.

Nas demais concentrações avaliadas (1% e 2,5%) o NaOCl foi efetivo contra *E. faecalis*. A mesma alteração de cor do meio de cultura observada anteriormente para as soluções de NaOCl 2,5%, pôde ser observada neste grupo (cuba de inox), reforçando, mais uma vez, a hipótese de reação do meio de cultura + NaOCl 2,5%. Vale ressaltar que a turbidez observada para os grupos de NaOCl 2,5% foi diferente daquela observada nos grupos de NaOCl 0,5%. Ainda, apesar de ter ocorrido esta alteração de cor, não houve crescimento de UFC/ml.

Analisando os resultados obtidos nesta pesquisa, as concentrações de NaOCl armazenadas na embalagem original foram eficientes contra *E. faecalis*. Nas formas de armazenamento em pote de vidro ou cuba de inox, apenas em uma amostra de NaOCl 0,5%, em cada forma de armazenamento, mostrou-se ineficaz contra *E. faecalis*. Isto pode ter ocorrido tanto pela baixa concentração de NaOCl como também pela impossibilidade de agitação da solução nestes meios de armazenamento. Na embalagem original, para a coleta da amostra, as soluções eram agitadas antes. No pote de vidro ou cuba de inox, o agitação não foi realizado, a fim de evitar contaminação das soluções ou vazamento. Deste modo, sais presentes na solução de hipoclorito de sódio podem ter permanecido precipitadas, podendo explicar sua baixa efetividade. Desde modo, a impossibilidade de agitação e a baixa concentração de NaOCl podem ter colaborado para este resultado insatisfatório.

CONCLUSÃO

Pode-se concluir que todas as concentrações de hipoclorito de sódio 0,5%, 1% e 2,5% foram eficazes contra *E. faecalis* no período de até 64 dias. As diferentes formas de armazenamento não interferiram na eficácia antimicrobiana do NaOCl, exceto na concentração de 0,5% que apresentou crescimento microbiano quando armazenado em cuba de inox.

REFERÊNCIAS

AFKHAMI, F.; AKBARI, S.; CHINIFORUSH, N. *Enterococcus faecalis* Elimination in Root Canals Using Silver Nanoparticles, Photodynamic Therapy, Diode Laser, or Laser-activated Nanoparticles: An In Vitro Study. **JOE, Cross Mark**, v. 43, n. 2, p. 279-282, February 2017.

APARECIDA NICOLETTI, M.; FERNANDES MAGALHÃES, J. Influence of the container and environmental factors in the stability of sodium hypochlorite. **Bol Oficina Sanit Panam**, v.121, p.301-309, 1996.

BEST, M.; SPRINGTHORPE, V.S., SATTAR, S.A. Feasibility of a combined carrier test for disinfectants: Studies with a mixture of five types of microorganisms. **Am J Infect Control**, v.22, p.152-162, 1994.

BLOOMFIELD, S.F.; MILES, G.A. The antibacterial properties of sodium dichloroisocyanurate and sodium hypochlorite formulations. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 46, p.1, n.65-73, 1979.

CHAITANYA, B. V. et al. Comparison of Antibacterial Efficacy of Turmeric Extract, Morinda Citrifolia and 3% Sodium Hypochlorite on *Enterococcus faecalis*: An In-vitro Study. **JCDR, Dentistry Section**, v. 10, n. 10, p. 55-57, 2016.

FERRAZ, C.C.R. et al. In vitro assessment of the antimicrobial action and mechanical ability of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant. **J endod.**, v. 27n. 7, p. 452-5, 2001.

FILHO, M. T. et al. In Vivo Microbiological Evaluation of the Effect of Biomechanical Preparation of Root Canals Using Different Irrigating Solutions. **J Appl Oral Sci.**, v. 14, n.2, p.105-10, 2006.

FRAIS, S.; GULABIVALA, K. Some factors affecting the concentration of available chlorine in commercial sources of sodium hypochlorite. **International Endodontic Journal, Blackwell Science Ltd**, v. 34, p. 206 – 215, 2001.

GOMES B.P.F.A. et al. In vitro antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. **Int. Endod. J.**, v.34, n.6, p. 424-8, 2001.

JOHNSON, B.R.; REMEIKIS, N.A. Effective self-life of prepared sodium hypochlorite **Endodon**, v.19, p.40-43, 1993.

LOPES P. H. Endodontia – Biologia e Técnica, **MEDSI Editora Médica e Científica LTDA.**, 1999, cap. 18, p.373-376.

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.**, v. 104, n.1, p.135-42, Jul 2007. 26;

PUPO, M. S. et al. Eliminación de *Enterococcus faecalis* por medio del uso de hipoclorito de sodio, clorhexidina y MTAD em conductos radiculares. **Avances em Odontoestomatologia**, v. 30, n. 5, p. 263-270, 2014.

RECAI, Z. et al. Antibacterial Efficacy of Super-Oxidized Water on *Enterococcus faecalis* Biofilms in Root Canal. **Jundishapur J. Microbiol.**, p. 1-6, September, 2016.

REYHANI, M. F. et al. Antimicrobial efficacy of different concentration of sodium hypochlorite on the biofilm of *Enterococcus faecalis* at different stages of development. *J Clin Exp Dent.*, **Journal section Operative Dentistry and Endodontic**, v. 8, n. 5, p. e480-e484, 2016.

RUTALA, W.A. et al. Stability and bactericidal activity of chlorine solutions. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v.19, p. 323-327, 1998.

RUTALA, W.A.; WEBER, D.J. Uses of inorganic hypochlorite (bleach) in health care facilities. **Clin Microbiol Rev**, v.10, p.597-610, 1997.

SHAHRANI, M. A. et al. Enhanced Removal of *Enterococcus faecalis* Biofilms in the Root Canal Using Sodium Hypochlorite Plus Photon-Induced Photoacoustic Streaming: An In Vitro Study. **Photomedicine and Laser Surgery, Mary Ann Liebert, Inc.**, v. 32, n. 5, p. 260–266, 2014.

TIRALI, R. E.; BODUR, H.; ECE, G. In vitro antimicrobial activity of Sodium hypochlorite, Chlorhexidine gluconate and Octenidine Dihydrochloride in elimination of microorganisms within dentinal tubules of primary and permanent teeth. *Med Oral Patol.* **Oral Cir. Bucal, Journal section Endodontics**, v. 17, n. 3, p.17-22, 1 May. 2012.

VALERA, M.C. et al. Antimicrobial activity of sodium hypochlorite associated with intracanal medication for *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis* inoculated in root canals. **J Appl Oral Sci**, v.17, n.6, p. 55-9, Nov-Dec 2009.

VIANNA, M.E. et al. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.97, n.1, p.79-84, 2004.