

Biofilm de *E. Faecalis*. Susceptibilidad ante irrigantes endodónticos. Estudio al MEB

Development of *Enterococcus Faecalis* biofilm and susceptibility to irrigating solutions. A SEM study

María de Los Ángeles Bulacio, Luis Alberto Jaime Salloum, Marta Inés Erimbaue, Cristina Gaudioso, Rosa Cangemi y Lucas Ramiro Galván¹

Recibido: 10 de abril de 2017
Aceptado: 21 de abril de 2017

Resumen

Objetivos. a) evaluar la acción de soluciones de irrigación sobre el biofilm de *Enterococcus faecalis* al microscopio electrónico de barrido (MEB) y b) observar el desarrollo bacteriano determinando las unidades formadoras de colonias (UFC) después de la acción de los irrigantes.

Materiales y métodos. a) Se incubaron 36 discos de raíces dentarias con *E. faecalis* durante 14 días y fueron divididos en seis grupos según el irrigante empleado, el que actuó durante 5 minutos: grupo 1 (n=6): hipoclorito de sodio (NaOCl) 1%, grupo 2 (n=6): NaOCl 2,5%, grupo 3 (n=6): gluconato de clorhexidina (CHX) 1%, grupo 4 (n=6): CHX 2 %, grupo 5 (n=6): Iodo yoduro de potasio (IKI) 0,3% y grupo 6 (n=6): agua destilada (control). La mitad de las piezas (n=3) de cada grupo fueron observadas al MEB evaluando el biofilm según Estrela y col. 2009. La otra mitad (n=3) de cada grupo se incubaron

individualmente en medio de cultivo estéril y se realizó el recuento de UFC a las 24 y 48 hs.

Resultados. a) Con NaOCl 1 y 2,5% no se detectó presencia de biofilm, con CHX 1% y 2% se observaron áreas colonizadas con invasión de los túbulos dentinarios (grado 2) con IKI 0,3% se observaron la mayoría de las áreas colonizadas con invasión de los túbulos dentinarios (grado 3), en el grupo control todas las áreas se observaron cubiertas sobre los túbulos dentinarios (grado 4). b) el recuento de UFC a las 24 y 48 hs. dio los siguientes resultados: NaOCl 1% 24hs sin crecimiento, 48hs crecimiento (14×10^2), NaOCl 2,5% sin crecimiento a las 24 y 48 hs. 1% CHX 24h crecimiento 16×10^2 , 48 hs crecimiento 18×10^4 . CHX 2% 24hs crecimiento 24×10^2 , 48hs crecimiento 27×10^3 . IKI 0,3% a 24hs crecimiento 12×10^8 . Agua destilada (control) a 24 hs crecimiento 23×10^8 .

¹

María de Los Ángeles Bulacio. Jefa de Trabajos Prácticos de Cátedra de Endodoncia. Facultad de Odontología. Universidad Nacional de Tucumán. maritabulacio@hotmail.com

Luis Alberto Jaime Salloum. Docente Coordinador de Endodoncia, Facultad de Odontología, Universidad San Martín de Porres-FN, Chiclayo, Perú. Universidad Privada Atenor Orrego. Trujillo, Perú. ljaime70@yahoo.es

Marta Inés Erimbaue. Jefa de Trabajos Prácticos de Cátedra de Fisiología Facultad de Odontología. Universidad Nacional de Tucumán. martaineserimbaue@gmail.com

Cristina Gaudioso. Profesora Asociada, Cátedra de Microbiología, Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia. Universidad Nacional de Tucumán. crisallori@hotmail.com

Rosa Cangemi. Jefa de Trabajos Prácticos de Cátedra de Microbiología, Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia. Universidad Nacional de Tucumán. microbiologiaclinica@fbqf.unt.edu.ar

Lucas Ramiro Galván. Becario de Cátedra de Endodoncia Facultad de Odontología. Universidad Nacional de Tucumán.

Conclusiones. Al MEB el biofilm de *E. faecalis* fue eliminado por NaOCl 2,5% y NaOCl 1%, mientras que CHX 1% y 2% afectaron el biofilm pero no lo eliminaron. IKI y agua destilada (control) no mostraron afectar al biofilm. Con respecto al recuento de UFC, al emplear NaOCl 2,5% no se observó desarrollo hasta las 48 hs mientras que al irrigar con el resto de las soluciones

experimentales y con el control hubo desarrollo bacteriano.

(Parcialmente subsidiado por el Consejo de Investigación de la Universidad Nacional de Tucumán, Argentina).

Palabras clave: Biofilm, NaOCl, CHX, MEB.

Abstract

The aim of this study was to a) to evaluate the action of irrigating solutions on the biofilm by scanning electron microscopy (SEM) and b) identifying bacterial colony which forms units (CFU) after the action irrigating solutions.

Materials and Methods. a) 36 dental roots discs were incubated with *E. faecalis* for 14 days and they were divided into six groups according to the irrigant employed, which acted during 5 minutes: group 1(n = 6): sodium hypochlorite (NaOCl) 1%, group 2(n = 6): NaOCl 2.5%, group 3(n = 6): chlorhexidine gluconate (CHX) 1%, group 4(n = 6): 2% CHX, group 5(n = 6): Iodine and potassium iodide (IKI) 0.3 % and group 6(n = 6): distilled water (control). Half of the pieces (n = 3) of each group were observed by SEM according to Estrela et al. 2009. The other half of each group was incubated amid sterile cultivation and the CFU recount took place at 24 and 48 hours.

Results a) With NaOCl of 1% and 2.5% no biofilm presence was detected, with CHX 1% and 2% we identified few areas colonized with invasion of dentinal tubules (grade 2), with 0.3% IKI most areas with invasion of dentinal tubules (grade 3) were monitored, in the control group all areas

were observed covering the dentinal tubules (grade 4). b) the recount of the CFU at the 24 and 48 hours gave us the following results: no growth at the 24 hours in the 1% NaOCl, growth at the 48 hours (14×10^2), no growth at 24 and 48 hours in the 2.5% NaOCl, growth at the 24 hours in % CHX 16×10^2 , growth at the 48 hours 18×10^4 . Growth at the 24 hours in CHX 2% 24×10^2 , growth at the 48 hours 27×10^3 , growth at the 24 hours in the IKI 0.3% 12×10^8 . Growth at 24 hours of distilled water 23×10^8 .

Conclusions. The SEM biofilm of *E. faecalis* was eliminated by 2.5% NaOCl and 1% NaOCl while CHX 1% and 2% affected the biofilm but did not remove it. IKI and distilled water (control) did not affect the biofilm. With regard to the UFC recount, when using the NaOCl 2.5% it presented no development until 48 hours while the irrigation with the rest of the experimental solutions and with the control showed bacterial development.

(Partially subsidized by The Research Council of National University of Tucumán, Argentina).

Key words: Biofilm, NaOCl, CHX, SEM.

I. INTRODUCCIÓN

La etapa de preparación endodóntica comprende la conformación y limpieza de los conductos radiculares. Para realizarlo de manera efectiva es importante la adecuada selección de las soluciones a emplear y tener en cuenta la compleja anatomía del conducto radicular¹, donde la instrumentación endodóntica no alcanza todas las paredes del mismo y serán las soluciones de irrigación las que ejercerán su acción en esas zonas². Esto cobra real importancia en casos de piezas dentarias portadoras de lesiones periapicales crónicas, donde se ha comprobado la invasión de gérmenes, organizados como biofilm, en la profundidad de la dentina que rodea al conducto³.

El biofilm es un conglomerado de bacterias que se adhieren a una superficie, secretando sustancias adhesivas, la matriz extracelular, formada por polisacáridos y proteínas, fundamentales para la fijación inicial de los microorganismos así como para la conformación de la biopelícula. Esta estructura les da protección, les confiere una gran resistencia a las defensas naturales del huésped, a los antimicrobianos y a la acción de diferentes sustancias irrigadoras empleadas en endodoncia, otorgando a las bacterias mayor patogenicidad que en su fase planctónica⁴⁻⁵.

Nair⁶ demostró que áreas contaminadas del conducto, inaccesibles a los instrumentos y a los irrigantes, pueden permanecer intactas después de la preparación y podrían ser responsables de la persistencia de la infección. La presencia de biofilm en el interior del conducto y en el extremo apical de las raíces con necrosis pulpar y lesión periapical crónica⁷ (Leonardo 2005), causa periodontitis apicales, resistentes al tratamiento convencional⁸.

En observaciones al MEB el *E. faecalis* mostró que adherido a las estructuras de colágeno, coloniza superficies de dentina, logrando progresar hacia los túbulos dentinarios y formar una biopelícula madura⁹.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la acción de soluciones de irrigación sobre el biofilm de *Enterococcus faecalis* mediante el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) y observaciones al microscopio electrónico de barrido (MEB).

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Se obtuvieron 36 discos de 3mm. de espesor del tercio medio de raíces de incisivos y caninos superiores, las que fueron tratadas en un baño ultrasónico con hipoclorito de sodio 2,5% y luego con EDTA 17% y agua destilada, durante 5 minutos cada uno y esterilizados en autoclave. Se incubaron individualmente a 37°C en tubos de Kahn con 2 mL. de medio de cultivo tripticasa soya caldo (TS) suplementado con glucosa al 1% y suero humano al 10% e inoculado con *E. faecalis* en una concentración de 10⁸. Los medios se renovaron cada 72 horas con la misma concentración del inóculo.

A los 14 días las muestras se retiraron de la estufa y del medio de cultivo, debido que en un estudio previo se evidenció la formación de biofilm¹⁰ y se dividieron en seis grupos según el irrigante a emplear: grupo 1 (n=6): hipoclorito de sodio (NaOCl) 1%, grupo 2 (n=6): NaOCl 2,5%, grupo 3 (n=6): gluconato de clorhexidina (CHX) 1%, grupo 4 (n=6): CHX 2 %, grupo 5 (n=6): Iodo Ioduro de Potasio (IKI) 0,3%, grupo 6 (n=6): agua destilada (control).

Se hizo actuar cada irrigante por inmersión, en una cápsula de Petri con 5 mL. de solución durante 5 minutos. Luego tres de las piezas de cada grupo se incubaron individualmente en un medio de cultivo estéril y se realizó el recuento de UFC a las 24 y 48 hs.

Las otras tres piezas de cada grupo, se incluyeron individualmente en una solución formada por paraformaldehído al 8%, tampón fosfato y glutaraldehído al 16% y se fijaron durante 48 hs. a 4°C. Se lavaron 3 veces durante 10 min con tampón fosfato. Se agregó una solución 1/1 de osmio/tampón fosfato (OsO₄ 2%), durante una noche. Se descartó el osmio, se lavó con etanol 30% durante 10 minutos dos veces. Se deshidrató la muestra pasando por una batería de alcoholes: etanol 50%, 70%, 80%, 90%, y 3 veces 100%, 10 minutos cada vez. Se descartó el etanol 100%, se añadió acetona 100% durante 1 hora. Luego las muestras se montaron en un portamuestras de aluminio y se cubrieron con una capa de oro utilizando un metalizador. Se observó con alto vacío, en un microscopio JEOL JSM-35CF (Tokio, Japón). Se observó toda la superficie de las muestras y se tomaron microfotografías a 4000X y 6000X, en ellas se evaluó el biofilm según Estrela y col¹².

dehído al 16% y se fijaron durante 48 hs. a 4°C. Se lavaron 3 veces durante 10 min con tampón fosfato. Se agregó una solución 1/1 de osmio/tampón fosfato (OsO₄ 2%), durante una noche. Se descartó el osmio, se lavó con etanol 30% durante 10 minutos dos veces. Se deshidrató la muestra pasando por una batería de alcoholes: etanol 50%, 70%, 80%, 90%, y 3 veces 100%, 10 minutos cada vez. Se descartó el etanol 100%, se añadió acetona 100% durante 1 hora. Luego las muestras se montaron en un portamuestras de aluminio y se cubrieron con una capa de oro utilizando un metalizador. Se observó con alto vacío, en un microscopio JEOL JSM-35CF (Tokio, Japón). Se observó toda la superficie de las muestras y se tomaron microfotografías a 4000X y 6000X, en ellas se evaluó el biofilm según Estrela y col¹².

III. RESULTADOS

Recuento de unidades formadoras de colonias (UFC).

El recuento de UFC a las 24 y 48 hs dio los siguientes resultados: NaOCl 1% 24hs sin crecimiento, 48hs crecimiento (14 X 10²), NaOCl 2,5% sin crecimiento a las 24 y 48 hs, CHX 1% 24hs crecimiento 16x10², 48 hs crecimiento 18x10⁴, CHX 2% 24hs crecimiento 24x10², 48hs crecimiento 27x10³, IKI 0,3% a 24hs crecimiento 12x10⁸, Agua destilada (control) a 24 hs. crecimiento 23x10⁸.

Evaluación al microscopio electrónico de barrido (MEB)

Las muestras irrigadas con NaOCl 1 y 2,5% (fig. 1, 2 y 3) no se detectó presencia de biofilm. Con CHX 1% (fig. 4, 5 y 6) y CHX 2% (fig. 7, 8 y 9) se observaron áreas colonizadas con invasión de los túbulos dentinarios (grado 2), con IKI 0,3% (fig. 10, 11 y 12) se observaron la mayoría de las áreas colonizadas con invasión de los túbulos dentinarios (grado 3). En el grupo control (fig. 13, 14 y 15) todas las áreas se observaron cubiertas, aún sobre los túbulos dentinarios (grado 4).

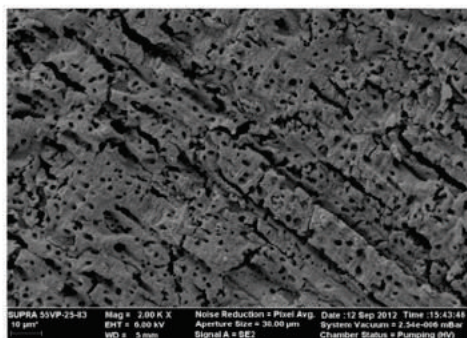


Fig 1. Aum. 2.000X. Sup. irrigada con NaOCl 1%.
Aum. 6.000X. Sup. irrigada con NaOCl 1%.

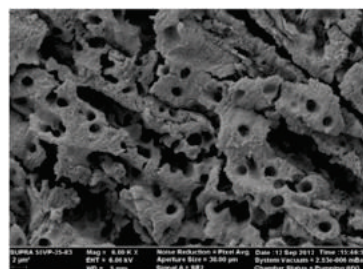


Fig 2.

Ausencia de biofilm
Ausencia de biofilm

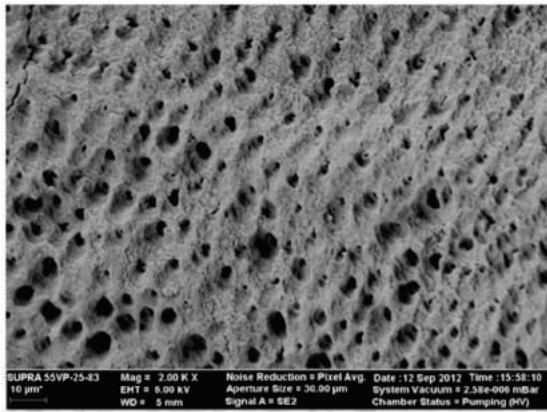


Fig 3. Aum. 2.000X. Sup.irrigada con NaOCl 2,5%. Ausencia de biofilm

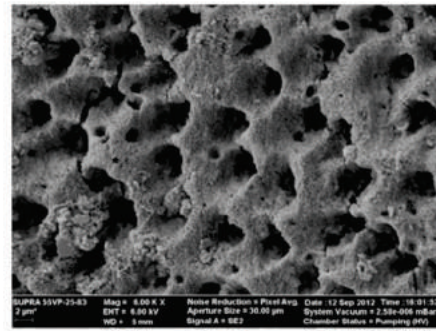


Fig 4. Aum. 6.000X. Sup.irrigada con NaOCl 2,5%. Ausencia de biofilm

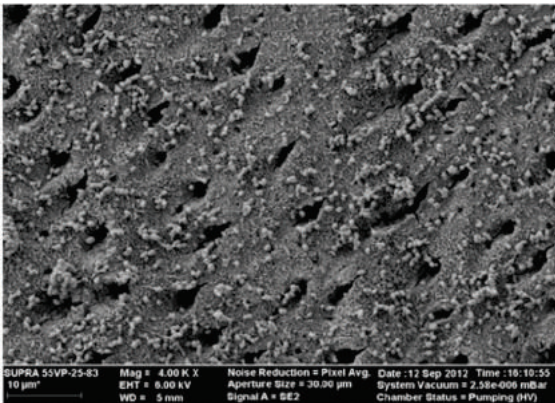


Fig 5. Aum. 2.000X. Sup. irrigada con CHX 1%. Biofilm poco afectado pero no eliminado

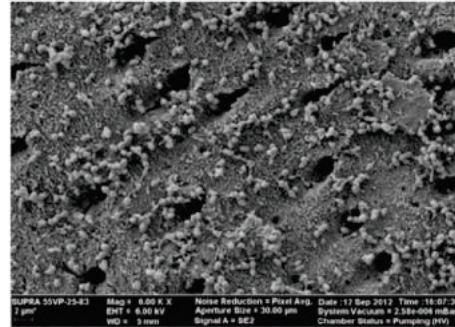


Fig 6. Aum. 6.000X. Sup. irrigada con CHX 1%. Biofilm poco afectado pero no eliminado

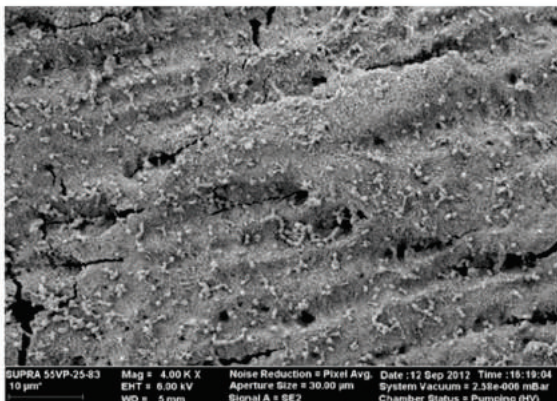


Fig 7. Aum: 2.000X. Sup. irrigada con CHX 2%. Biofilm afectado pero no eliminado totalmente.

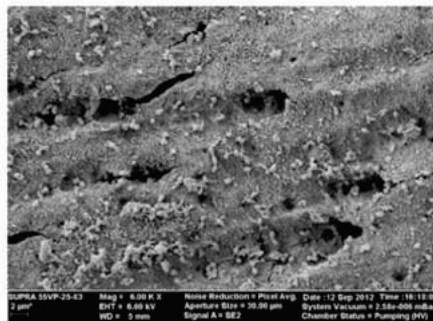


Fig 8. Aum: 6.000X. Sup. irrigada con CHX 2%. Biofilm afectado pero no eliminado totalmente.

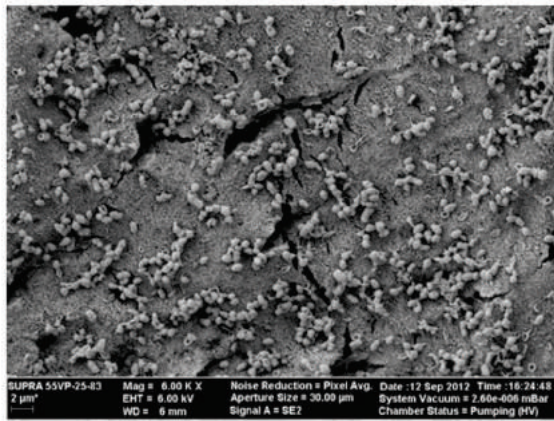


Fig 9. Aum: 2.000X. Sup. irrigada con IKI 0,3 %. Biofilm poco afectado

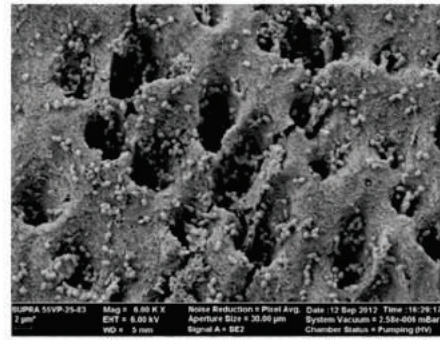


Fig 10. Aum: 6.000X. Sup. irrigada con IKI 0,3%. Biofilm poco afectado

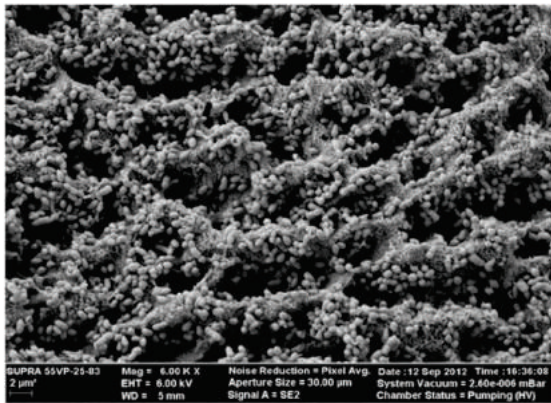


Fig11 Aum:2.000X. Sup.irrigada con agua destilada Control

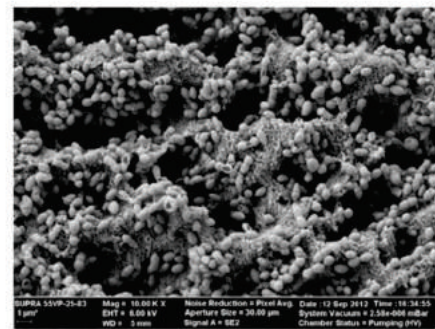


Fig 12 Aum:6.000X. Sup.irrigada con agua destilada Control

IV. DISCUSIÓN

El concepto de biofilm dentro de la microbiología endodóntica es importante para comprender la persistencia de las infecciones perirradiculares. En las biopelículas, los microorganismos poseen una matriz extracelular que contiene polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos originados por los mismos microorganismos que cumple la función de proveer estabilidad estructural y protección al mismo contra condiciones ambientales adversas¹².

Es por ello que en un estudio previo, se hicieron actuar las soluciones sobre el *E faecalis* en su forma planctónica¹³ y en el presente trabajo la irrigación se realizó sobre el biofilm, para obtener resultados clínicamente más extrapolables, como lo expresan Shen y col.¹⁴.

Se empleó *E. faecalis* que es ampliamente usado en estudios microbiológicos, debido a que está presente en fracasos endodónticos y se lo asocia a factores de virulencia como su cápsula de polisacáridos, su capacidad para formar ADN extracelular a partir de las 4 hs lo que facilita la formación temprana de la biopelícula y su resistencia a los antimicrobianos que Estrela y col.¹¹. Otro factor importante que dichos autores señalan, es el tiempo necesario para la formación de biofilm, el que fue determinado en estudios anteriores¹⁰. Estrela y col.¹¹ (2009) recalcan también la importancia de la utilización de sustratos adecuados. En el presente estudio se emplearon trozos de raíces dentarias recién extraídas, como este autor lo aconseja con un medio de cultivo enriquecido, que fue validado en un trabajo previo¹⁰.

Al analizar nuestros resultados coinciden con Wang y col¹⁵ quienes obtuvieron similares resultados al aplicar NaOCl 2% y CHX 2%, empleándolo a 1 y 3 minutos. En el presente trabajo las soluciones irrigadoras se emplearon durante 5 minutos, quizás esta mayor permanencia del NaOCl 1% resultó igualmente efectiva que a mayor concentración durante menor tiempo.

Clegg y col.¹⁶ emplearon biofilm polimicrobiano y en observaciones al MEB, el NaOCl 3% fue capaz de provocar la remoción del biofilm, mientras que NaOCl 1% alteró el biofilm, pero no lo eliminó totalmente visualizándose algunas colonias bacterianas sobrevivientes sobre la dentina radicular, mientras que la CHX 2% no fue capaz de removerlo ni alterarlo.

Resultados semejantes obtuvieron Dunavant y col.¹⁷ quienes encontraron al NaOCl 1% más efectivo que la CHX al 2% usando el método de inmersión pasiva, semejante al empleado en el presente trabajo. Así como Giardino y col.¹⁸ en observaciones al MEB, quienes evidenciaron que el NaOCl 1% eliminó el biofilm de *E. faecalis* más eficazmente al compararlo con CHX 2%.

Machado Olivera y col.¹⁹ hicieron actuar el hipoclorito de sodio al 1, 2.5 y 6% y CHX al 0.12, 0.2 y 2% durante 1, 3 y 10 minutos sobre el biofilm de *E. faecalis* desarrollado en placas de polietileno inmersas en el medio de Tripticosa Soya caldo enriquecido con glucosa. A los 10 minutos, todas las concentraciones de NaOCl eliminaron completamente el biofilm, mientras que la CHX no lo afectó, aún en su mayor concentración y en el mayor tiempo de exposición.

Francescutti Murad y col.²⁰ evaluaron la eficacia antimicrobiana de NaOCl al 2,5% y 5,25%, CHX líquida y gel al 2%, sobre biofilm de *Enterococcus faecalis* desarrollado sobre trozos radiculares. Las secciones se sumergieron en los irrigantes durante 1, 5, 15 y 30 minutos. Los irrigantes más eficaces fueron NaOCl en todas las concentraciones y 2% en gel de CHX, en todos los intervalos de tiempo ensayados, mientras que la CHX líquida no fue efectiva.

En el presente trabajo al emplear hipoclorito de sodio al 1%, se obtuvieron mejores resultados que Case y col.²¹, quizás porque ellos lo emplearon durante 2 minutos. No obstante al compararlo con el gas ozono sobre biofilm de *E. faecalis* de 14 días de incubación, concluyeron que si bien el irrigante fue más efectivo que el ozono, no inhibió completamente al biofilm, probablemente debido a un menor tiempo de acción que en el presente estudio.

En otros estudios²² realizaron irrigación de NaOCl complementada con activación, demostrando en observaciones al MEB, que este método seguido de la irrigación manual, mejora la eliminación del biofilm. Probablemente este complemento sea incorporar en estudios futuros.

Los resultados desfavorables obtenidos con la clorhexidina, probablemente se deban a que al carecer de poder solvente, es ineficaz al actuar sobre una estructura organizada como el biofilm, a pesar de ser un agente antimicrobiano efectivo sobre biofilm de *E. faecalis* joven de tres días de maduración²³.

El IKI es comúnmente considerado un agente antibacteriano efectivo en la terapia endodóntica. Diversos autores lo recomiendan como solución irrigadora²⁴⁻²⁵.

En el presente estudio no fue capaz de eliminar el biofilm de *E. faecalis*. Estos resultados probablemente se deban a que se empleó el IKI al 0,3%, ya que en estudios previos, fue efectivo aún en bajas concentraciones sobre el *E. faecalis* en forma planctónica.

Tello Barbaran y col.²⁶ encontraron efectiva a la solución de IKI 2% al actuar en conductos mesiales de molares inferiores contaminados con *Enterococcus faecalis*, al usarlo como irrigación final durante 15 minutos, ya que durante 5 minutos no fue efectivo.

Con respecto a la detección de UFC con NaOCl 2,5% no hubo desarrollo en 24 ni 48 hs, el resto de las soluciones mostró desarrollo de diferentes magnitudes. Con NaOCl 1% a las 24 hs no hubo crecimiento del *E. faecalis* y a las 48 hs el desarrollo fue de 14×10^2 , mientras que con el resto de las soluciones hubo mayor desarrollo bacteriano. Lo sucedido con NaOCl 1%, probablemente se deba a que transcurrido más tiempo fueron las colonias intratubulares las que se desarrollaron y se expresaron en el recuento.

Por último, en cuanto a la extrapolación de estos resultados a la clínica, debe hacerse con cuidado ya que no sólo es importante la eficacia de los irrigantes sobre el biofilm, sino la certeza de que éstos puedan contactarlo. Por esto las soluciones irrigadoras deben "mojar" la totalidad de la superficie del conducto, para lo que debe emplearse una técnica de irrigación adecuada.

V. CONCLUSIONES

En las condiciones empleadas en este estudio, al MEB el biofilm de *E. faecalis* fue eliminado con NaOCl 2,5% y NaOCl 1%, mientras que CHX 1% y 2% no fueron efectivas. IKI y agua destilada (control) no afectaron al biofilm, al emplearlos durante 5 minutos. Con respecto al recuento de UFC, al emplear NaOCl 2,5% no se observó desarrollo hasta las 48 hs. mientras que al irrigar con el resto de las soluciones experimentales y con el control hubo desarrollo bacteriano a las 48 hs.

VI. BIBLIOGRAFÍA

1. Gani O. Efecto del uso de limas y escariadores en la preparación quirúrgica estandarizada en conductos radiculares de pacientes jóvenes. 1994 Rev Asoc Odontol Argent; 82:266-73.
2. Mohammadi Z, Abbott PV. The properties and applications of chlorhexidine in endodontics. 2009 Int Endod J.; 42 (4):288-302.
3. Heling I, Chandler P. Antimicrobial effect of irrigant combinations within dentinal tubules. 1998 Int. Dent. J. 31: 8-14.
4. Nair PNR. Light and electron microscopic studies on root canal flora and periapical lesions. 1987 J Endod 13:29-39
5. Lewis K. The riddle of biofilm resistance. Antimicrob Agents 2001. Chemother 45: 999-1007.
6. Nair PNR. Biology and pathology of apical periodontitis. In: Estrela C. Endodontic Science. 2nd ed. São Paulo: Artes Médicas. 2009 p. 285-347
7. Leonardo. Endodoncia. Tratamiento de Conductos Radiculares. Principios Técnicos y Mecánicos. Editora Artes Médicas 2005 p437
8. Ferreira FBA, Ferreira AL, Gomes BPF, Souza-Filho FJ. Resolution of persistent periapical infection by endodontic surgery. 2004 Int Endod J 37; 61-69.
9. Shehab El-Din Mohamed Saber, Soha A. El-Hady. Development of an intracanal mature *Enterococcus faecalis* biofilm and its susceptibility to some antimicrobial intracanal medications; an *in vitro* study. 2012 Eur J Dent:6(1)43-50
10. Bulacio MÁ, Galván LR, Gaudio C, Cangemi R, Erimbaue M. *Enterococcus Faecalis* Biofilm. Formation And Development *In Vitro* Observed By Scanning Electron Microscopy. 2015 Acta Odontol. Latinoam.;28 N° 3:210-214
11. Esterla C, Sydney GB, Figueiredo JP, Esterla ER. A model system to study antimicrobial strategies in endodontic biofilms. 2009 J Appl Oral Sci; 17:87-91.
12. Whitchurch, C. B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P. C., y Mattick, J. S. (2002) Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation, Science 295, 1487
13. Bulacio María de los Angeles, Cangemi Rosa, Cecilia Marta, Raiden Guillermo. In Vitro Antibacterial Effect of Different Irrigating Solutions on *Enterococcus Faecalis*. 2006 Acta Odontol. Latinoam:19 N° 2;75-80
14. Shen Y, Qian W, Chung C, Olsen I, Haapasalo M. Evaluation of the Effect of Two Chlorhexidine Preparations on Biofilm Bacteria In Vitro: A Three-Dimensional Quantitative Analysis. 2009 Journal of Endodontic;35:981-985
15. Wang Z, Shen Y, Haapasalo M. effectiveness of endodontic disinfecting solutions against young and old *Enterococcus faecalis* biofilms in dentin Canals. 2012 J Endod;38(10);1376-79
16. Clegg MS1, Vertucci FJ, Walker C, Belanger M, Britto LR. The effect of exposure to irrigant solutions on apical dentin biofilms in vitro, 2006. J Endod. May; 32 (5):434-7.
17. Dunavant TR, Regan J D, Glickman GN, Solomon ES, and Honeyman. Comparative evaluation of endodontic irrigants against *Enterococcus faecalis* biofilms, 2006 J Endod;32(6):527-531
18. Giardino L, Ambu E, Savoldi E et al. Comparative evaluation of antimicrobial efficacy of sodium hypochlorite, MTAD and Tetraclean against *Enterococcus faecalis* biofilm. 2007 J Endod;33:852-55
19. Machado Oliveira Julio Cezar, Oliveira Brito Luis Renan, Souza Goncalves Lucio. Effectiveness of chlorhexidine and sodium hypochlorite to reduce *Enterococcus faecalis* biofilm biomass. 2014 Journal of Dentistry and Oral. Vol.6(6), pp. 64-69

20. Francescutti Murad C, Moura Sassone L, Souza MC, Fidel RSA, Rivera Fidel S, Hirata Junior R. Antimicrobial activity of sodium hypochlorite, chlorhexidine and MTAD against *Enterococcus faecalis* biofilm on human dentin matrix *in vitro*. 2012 RSBO. Apr-Jun; 9 (2):143-50. Electronic version: 1984-5685
21. Case PD, Bird PS, Kahler WA, George R, Walsh LJ. Treatment of root canal biofilms of *Enterococcus faecalis* with ozone gas and passive ultrasound activation. 2012 J Endod. Apr;38(4):523-6
22. R. Ordinola-Zapata, C. M. Bramante, R. M. Aprecio, R. Handysides, D. E. Jaramillo. Biofilm removal by 6% sodium hypochlorite activated by different irrigation techniques. 2014. International Endodontic Journal. Volume 47, Issue 7 July Pages 659–666
23. Sena NT, Gomez BP, Vianna ME, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, Souza Filho FJ, In vitro antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine against select single species biofilms. 2006 Int Endod J;39(11):878-885
24. Molander A, Reit C, Dahlen G. The antimicrobial effect of calcium hydroxide in root canals pretreated with 5% iodine potassium iodide. 1999 Endodontics & dental traumatology. ; 15 (5):205–9.
25. Hauman CHJ, Love RM. Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: a review. Part 1. Intracanal drugs and substances. 2003 International endodontic journal. ; 36 (2):75–85.)
26. Tello-Barbaran J, Nakata HM, Salcedo-Moncada D, Bramante CM, Ordinola-Zapata R. The antimicrobial effect of iodine-potassium iodide after cleaning and shaping procedures in mesial root canals of mandibular molars. 2010 Acta Odontol Latinoam. ;23(3):244-7.