

Efectividad antibacteriana entre sistema de irrigación ultrasónica pasiva y continua sobre *Enterococcus faecalis*. Estudio in vitro

Antibacterial effectiveness between passive and continuous ultrasonic irrigation system on *Enterococcus faecalis*. In vitro study

Jessica Fernanda Ibarra de la Vega¹, José Eduardo Maldonado Paredes²,
Laura Cristina Nardello Leite³, Roberto Xavier Romero Cazares⁴



Odontología 23(2) (2021): e3439

Recibido: 20/06/2021 Revisado: 02/07/2021 Publicado: 30/07/2021

Resumen

Para tener éxito en la terapia endodóntica es muy importante la desinfección del canal radicular. **Objetivo.** Comparar la efectividad antibacteriana entre Sistema de Irrigación Ultrasónica Pasiva e Irrigación Ultrasónica Continua sobre biofilm maduro de *Enterococcus faecalis*. **Metodología.** Se cultivó cepas de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 en canales radiculares de premolares uniradiculares durante 21 días. La preparación químico mecánica de los conductos radiculares fue realizada con el sistema Protaper Universal manual e irrigados con 2mL de hipoclorito de sodio al 2,5%. Las muestras fueron colectadas con conos de papel estériles, antes del preparo químico mecánico (S1), después del preparo químico mecánico (S2) y después del protocolo de irrigación final (S3). Los grupos fueron divididos posterior al preparo químico mecánico en dos grupos: G1 (n=10) Irrigación Ultrasónica Pasiva y G2 (n=10) Irrigación Ultrasónica Continua además de un grupo control positivo y un grupo control negativo. Las muestras obtenidas fueron sembradas en Agar Müller-Hinton e incubadas 24 horas a 37° C y se contaron las unidades formadoras de colonia (UFC). Los datos fueron analizados mediante la Prueba de Anova y T Student con un nivel de significancia <0,05%. **Resultados.** El biofilm maduro de *Enterococcus faecalis* fue removido en un 93,9 - 93,9% luego de la preparación químico mecánica, la activación ultrasónica pasiva consiguió reducir un 98,9% y con la activación ultrasónica continua se redujo a 99,2%. Las técnicas de desinfección complementaria utilizadas mostraron diferencias significativas comparadas con el preparo químico mecánico (p=0.000). La activación ultrasónica pasiva comparada con la activación ultrasónica continua no mostraron diferencias significativas (p=0,393). **Conclusión.** Los sistemas de activación complementaria resultan eficaces en la reducción de biofilm de *Enterococcus faecalis*.

Palabras Clave: Biofilm, *Enterococcus Faecalis*, Tratamiento de Conductos, Desinfección Complementaria.

Abstract

To be successful in endodontic therapy, root canal disinfection is very important. **Objective.** To compare the antibacterial effectiveness between the Passive Ultrasonic Irrigation System and the Continuous Ultrasonic Irrigation on a mature *Enterococcus faecalis* biofilm. **Methodology.** Experimental in vitro study. The sample consisted of 30 teeth, single-rooted premolars, which were standardized to a length of 16mm. The experimental units were subjected to an autoclaving process, and then strains of *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 were cultivated by placing approximately 0.01 mL of standard value of the bacterial suspension in each root canal until obtaining mature biofilm for 21 days. The chemical-mechanical preparation was carried out by means of manual instrumentation with files from the universal Protaper system, following the manufacturer's instructions until reaching the Protaper F3 file. During and after the use of each instrument, the canals were irrigated with 2mL of 2.5% NaOCl with Navitip 30-G needles. Root canal samples were collected with sterile #15 paper cones, before mechanical-chemical preparation (S1), after mechanical-chemical preparation (S2) and after the final irrigation protocol (S3). After (S2) the sample was divided into two groups: G1 (n=10) application of Passive Ultrasonic Irrigation, and G2 (n=10) application of Continuous Ultrasonic Irrigation, in addition to a positive control group and a negative control group. The samples obtained were seeded in Müller-Hinton Agar and incubated for 48 hours and subsequently the colony-forming units (CFU) were counted. The data obtained were processed in the statistical program SPSS. Analysis of results. The Shapiro-Wilk Normality test was carried out, in which the values of the level of significance (Sig) were higher than 0.05 (95% reliability); therefore, the samples come from populations with Normal distribution, Parametric tests were used to compare groups: ANOVA, Student's T. Differences between the processes were obtained as a result: Chemical-mechanical preparation eliminated an average of 93.9% of mature *Enterococcus faecalis* biofilm, while passive ultrasonic activation eliminated 98.9% and continuous ultrasonic activation eliminated 99.2%. Therefore, the complementary disinfection techniques used showed significant differences compared to the chemical-mechanical preparation (p=0.000). Passive Ultrasonic Activation does not show significant differences (p = 0.393) compared to Continuous Ultrasonic Activation. With these results, it is concluded that the two complementary activation systems turn out to have the same antibacterial efficacy on *Enterococcus faecalis*.

Keywords: Biofilm, *Enterococcus Faecalis*, Duct Treatment, Complementary Disinfection.

¹ Estudiante; Facultad de Odontología; Universidad Central del Ecuador; Quito, Ecuador.

✉ jfbarrad@uce.edu.ec

<https://orcid.org/0000-0002-1853-2705>

² Facultad de Odontología, Universidad San Francisco de Quito, Quito, Ecuador.

✉ jmaldonadop@usfq.edu.ec

<https://orcid.org/0000-0003-1807-8255>

³ Departamento de Dentística, Facultad de Odontología, Universidad de São Paulo, São Paulo, Brasil.

<https://orcid.org/0000-0003-0981-7626>

⁴ Docente; Facultad de Odontología; Universidad Central del Ecuador; Quito, Ecuador.

✉ xromero@uce.edu.ec

<https://orcid.org/0000-0002-6152-8517>

*Autor de correspondencia: xromero@uce.edu.ec

ODONTOLOGÍA

<https://revistadigital.uce.edu.ec/index.php/odontologia/index>

ISSN-e: 1390-9967

ISSN: 1390-7468

Periodicidad: semestral

vol. 23, núm. 2, 2021

fod.revista@uce.edu.ec

DOI: <https://doi.org/10.29166/odontologia.vol23.n2.2021-e3439>



Esta obra está bajo una licencia internacional Creative Commons Atribución-NoComercial

Introducción

El objetivo del tratamiento del sistema de conductos radiculares consiste en la prevención y cuando sea necesario, curar las patologías periapicales. La terapia endodóntica alcanza esta meta gracias a una razón biológica bien fundamentada que se basa en remover todo el tejido blando, orgánico e inorgánico, tejido que se encuentre infectado o no de los conductos radiculares¹.

El fracaso endodóntico se debe principalmente a la persistencia que existe de los microorganismos en los conductos radiculares². Estos microorganismos involucrados pueden haber sobrevivido al tratamiento y sus diferentes procedimientos³. o, pueden lograr invadir los conductos como resultado de las filtraciones que se producen en la corona de los dientes que se encuentran con tratamientos de conductos obturados⁴.

Diferentes estudios han descubierto que los microorganismos encontrados las piezas dentales en las cuales existió un tratamiento endodóntico fallido, es diferente a los encontrados normalmente en conductos de dientes que no han sido tratados^{5,6}. Los microorganismos presentes en dientes en los que después del tratamiento, existe un fracaso endodóntico, es mayormente Gram positivos y anaerobios facultativos, la especie que se aísla con mayor frecuencia es *Enterococcus faecalis*⁷.

La desinfección y limpieza con soluciones irrigadoras en el conducto radicular implicando todas sus áreas se considera esencial para el éxito del tratamiento endodóntico⁸. Varios estudios han demostrado que, hay muchas zonas del conducto radicular que no son tocadas por los instrumentos⁹, actuando únicamente sobre el cuerpo central del conducto¹⁰.

La desinfección del conducto radicular por medio de la instrumentación e irrigación son factores muy importantes en el tratamiento de conductos. Debido a la imposibilidad de llegar con la instrumentación por completo a las diferentes partes del conducto radicular, hay que tener en cuenta la importancia de la irrigación. Es por ello, que se fueron desarrollando una variedad de sistemas de dispensación y agitación de sustancias irrigadoras, tales como la agitación sónica y ultrasónica¹¹. Según Violich y Chandler tanto la agitación sónica y ultrasónica no resultan totalmente eficaces a lo largo del conducto radicular¹². La activación ultrasónica de los irrigantes se ha asociado directamente a un aumento en la efectividad de la limpieza de los conductos radiculares, pero presenta limitaciones, por ejemplo, resulta ser menos efectiva en el tercio apical al contactar con el instrumento las paredes del conducto radicular, lo cual es conocido como la inhibición del efecto de cavitación. La activación sónica presenta ventajas como evitar perforaciones, riesgo de transporte y desgaste excesivo en las paredes del conducto, teniendo en cuenta que la velocidad de vibración es inferior¹³.

En este contexto el propósito del presente informe de investigación es el determinar la eficacia antibacteriana entre sistema de irrigación ultrasónica pasiva e irrigación ultrasónica continua sobre *Enterococcus faecalis*. La primera técnica, denominada irrigación ultrasónica pasiva (PUI), consiste en dispensar el irrigante en el conducto radicular y posterior a ello agitarlo y activarlo con puntas acopladas al ultrasonido. La segunda técnica denominada irrigación ultrasónica continua (CUI), consiste en dispensar el irrigante de forma continua mientras se lo agita¹⁴.

Materiales y métodos

Estudio experimental in vitro en el cual la muestra fue de 40 dientes, premolares unirradiculares, los cuales fueron estandarizados a una longitud de 16mm. Las unidades experimentales fueron sometidas a proceso de autoclavado, posteriormente se cultivó cepas de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 colocando aproximadamente 0.01 mL de valor estándar de la suspensión bacteriana en cada canal radicular hasta conseguir biofilm maduro durante 21 días. Se realizó la preparación químico mecánica mediante instrumentación manual, con limas del sistema Protaper universal siguiendo las indicaciones del fabricante hasta llegar a lima Protaper F3, durante y después del uso de cada instrumento los conductos fueron irrigados con 2mL de NaOCl al 2,5% con agujas Navitip 30G. Para la aplicación de Irrigación Ultrasónica Pasiva se depositó 3 mL de NaOCl al 2,5% en el conducto, el cual se activó por acción de la punta ultrasónica IRRI S a 1mm de la longitud de trabajo, la activación se realizó por 3 veces con la duración de 20 segundos cada ciclo. Para la aplicación de Irrigación Ultrasónica Continua se colocó un total de 9mL de NaOCl al 2,5% dispensándolo en el conducto y al mismo tiempo fue activado con la punta ultrasónica IRRI S a 1mm de la longitud de trabajo. Se colectaron muestras de los conductos radiculares con conos de papel estériles #15, antes del preparo químico mecánico (S1), después del preparo químico mecánico (S2) y después del protocolo de irrigación final (S3), posterior al preparo

químico mecánico se dividió la muestra en dos grupos: G1 (n=10) aplicación de Irrigación Ultrasónica Pasiva, G2 (n=10) aplicación de Irrigación Ultrasónica Continua además de un grupo control positivo (n=10) y un grupo control negativo (n=10). Las muestras obtenidas fueron sembradas en Agar Müller-Hinton e incubadas 24 horas a 37° C y posteriormente se contaron las unidades formadoras de colonia (UFC).

Resultados

Una vez recolectados los datos en Unidades formadoras de colonias (UFC), se realizó el análisis de los mismos, utilizando el Programa de Análisis Estadístico SPSS statistics 20.0.

En el grupo NaOCl+PUI se observó la reducción bacteriana después del preparo de los conductos radiculares (S2) con una media de 20,6 UFC lo que corresponde al 93,3% de la disminución del biofilm de *E. Faecalis*. De igual manera la reducción bacteriana conseguida después de la activación ultrasónica del hipoclorito de sodio (S3) obtuvo una media de 3,2 UFC con un porcentaje de reducción del 98,9%.

Tabla 1. Estadística descriptiva de las medidas angulares del perfil facial de los estudiantes de la FOUCE.

Table 1. Descriptive statistics of the angular measurements of the facial profile of FOUCE students.

| PREPARACIÓN | N | Media | Desviación Estándar | 95% del intervalo de confianza para la media | | Mínimo | Máximo | ANOVA (p=) |
|-------------|----|-------|---------------------|--|-----------------|--------|--------|------------|
| | | | | Límite inferior | Límite superior | | | |
| S1 | 10 | 310,0 | ±0,0 | 310,0 | 310,0 | 310 | 310 | |
| S2 | 10 | 20,6 | ±6,5 | 16,0 | 25,2 | 11 | 30 | 0,000 |
| S3 | 10 | 3,2 | ±2,3 | 1,6 | 4,8 | 0 | 7 | |

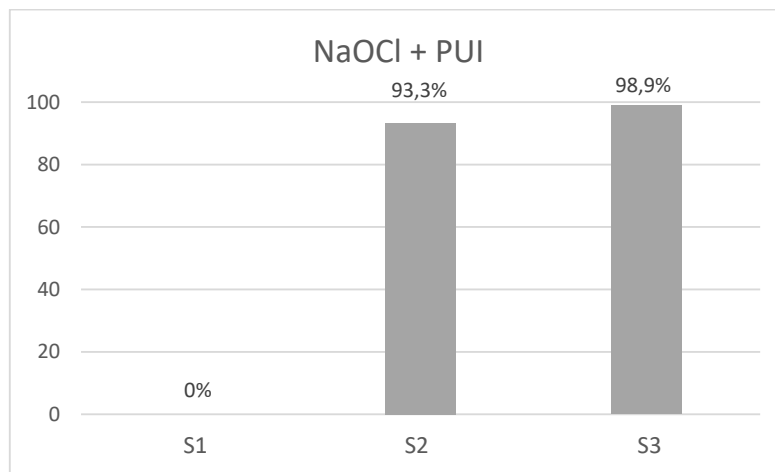


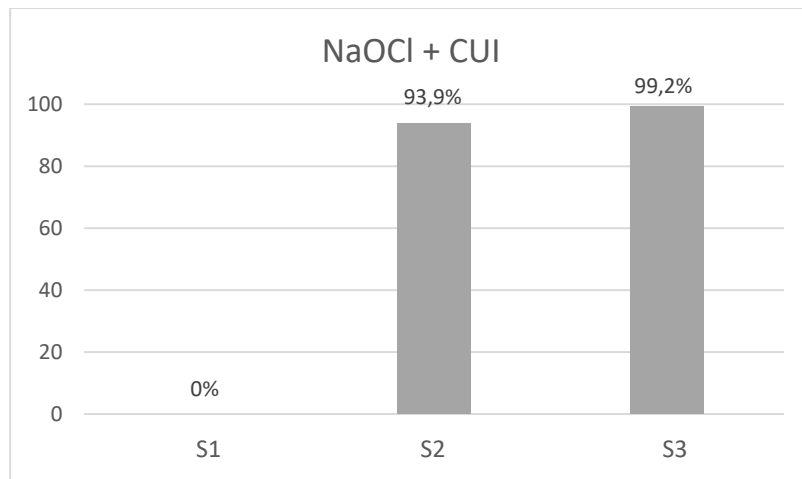
Gráfico 1. Porcentaje de reducción bacteriana de las etapas operatorias NaOCl + PUI.

Graph 1. Percentage of bacterial reduction of the NaOCl + PUI operative stages.

En el grupo NaOCl+CUI la media de la reducción bacteriana después del preparo de los conductos radiculares (S2) fue de 18,8 UFC consiguiendo un 93,9% en la disminución del biofilm de *E. Faecalis*. La irrigación ultrasónica continua del hipoclorito de sodio (S3) obtuvo una media de 2,2 UFC con un porcentaje de reducción del 99,2%.

Tabla 2. Conteo de UFC de las etapas operatorias en la efectividad antibacteriana de la Irrigación Ultrasónica Continua.**Table 2.** CFU count of the operative stages in the antibacterial effectiveness of Continuous Ultrasonic Irrigation.

| NaOCl + CUI (UFC) | | | | | | | | |
|-------------------|----|-------|---------------------|--|-----------------|--------|--------|------------|
| PREPARACIÓN | N | Media | Desviación Estándar | 95% del intervalo de confianza para la media | | Mínimo | Máximo | ANOVA (p=) |
| | | | | Límite inferior | Límite superior | | | |
| S1 | 10 | 310,0 | ±0,0 | 310,0 | 310,0 | 310 | 310 | |
| S2 | 10 | 18,8 | ±5,3 | 15,0 | 22,6 | 11 | 29 | 0,000 |
| S3 | 10 | 2,2 | ±1,7 | 1,0 | 3,4 | 0 | 5 | |

**Gráfico 2.** Porcentaje de reducción bacteriana de las etapas operatorias NaOCl + CUI.**Graph 1.** Percentage of bacterial reduction of the NaOCl + CUI operative stages.

En cuanto a la comparación de los protocolos de desinfección complementaria (S3) no hubo diferencias significativas ($p=0,393$).

Tabla 3. Efectividad antibacteriana después de aplicación de Sistemas complementarios Irrigación Ultrasónica Pasiva e Irrigación Ultrasónica Continua.**Table 3.** Antibacterial effectiveness after application of complementary systems Passive Ultrasonic Irrigation and Continuous Ultrasonic Irrigation.

| | Media (UFC) | N | Desviación Estándar (UFC) | T student (p=) |
|----------------------|-------------|----|---------------------------|----------------|
| S3 NaOCl + PUI (UFC) | 3,20 | 10 | ±2,251 | 0,393 |
| NaOCl + CUI (UFC) | 2,20 | 10 | ±1,687 | |

Discusión

Debido a que las técnicas de instrumentación de conductos radiculares son insuficientes por si solas para disminuir la carga bacteriana dentro de los conductos radiculares, la activación del irrigante químico es importante para ayudar para cumplir con el objetivo de la reducción del número de bacterias y de sus subproductos tóxicos¹⁵.

Cabe mencionar que estudios demuestran que un conducto radicular bien manipulado mecánicamente, ya nos brinda un 97% de probabilidades de éxito, y viceversa, ya que una instrumentación insuficiente e inadecuada casi siempre causa de fracaso después del tratamiento^{16,17}, en el presente estudio después de la preparación químico-mecánica se redujo *Enterococcus faecalis* del nivel inicial >300 UFC a un valor medio de 20,6 y 18.8 UFC, logrando así eliminar el 93,3 % y 93,9% respectivamente.

Se debe tener en cuenta que los conductos radiculares no se limpian y preparan solo con la instrumentación. Es imprescindible emplear métodos de irrigación y algún medio de disolución química de residuos pulpares¹⁸. El hipoclorito de sodio ha sido utilizado frecuentemente como solución para irrigación en el tratamiento de conductos ya que cumple con los objetivos^{19,20}, sin embargo, Pineda (2008), considera que no es completamente efectiva frente a *Enterococcus faecalis* debido a que ha demostrado ser resistente ante distintas concentraciones de hipoclorito de sodio²¹. En un estudio realizado por Joy (2015), demostró que la irrigación ultrasónica pasiva asociada con hipoclorito de sodio al 2,5% fue eficaz en la eliminación del biofilm del interior de los conductos radiculares, comparada con la irrigación convencional con jeringa. Sin embargo, al ser asociado con una concentración del 1% de hipoclorito de sodio, la irrigación ultrasónica pasiva no mostró diferencias significativas en la eliminación del biofilm de *Enterococcus faecalis* en comparación con la irrigación con jeringa^{22,23}, lo cual confirma la resistencia de *Enterococcus faecalis* ante distintas concentraciones. Por otro lado, Dunavant (2006), informó que el irrigante que presenta un mayor efecto contra el biofilm dental de *Enterococcus faecalis* con un 99.99% de efecto positivo fue hipoclorito de sodio al 6%²⁴, en el presente estudio se realizó con hipoclorito de sodio al 2,5% activado por ultrasonidos, sin alcanzar ese porcentaje de efectividad. Algunos autores recomiendan utilizar el hipoclorito de sodio de manera conjunta con activación mecánica con el fin de mejorar su efectividad²⁵.

En el presente estudio se aplicó los dos Sistemas de irrigación, tanto Activación Ultrasónica Pasiva y Activación Ultrasónica Continua en conjunto con hipoclorito de sodio al 2,5%, aumentando la eliminación de contaminación en los conductos radiculares, lo cual demostró la efectividad del uso del hipoclorito complementado con activación ultrasónica, resultado que en estudios como el de Jiménez (2014) se confirman²⁶.

En 2009, Townsend y Maki²⁷, mediante un estudio in vitro compararon la eliminación mecánica bacteriana por medio de 3 sistemas de agitación y 2 de irrigación frente a la activación ultrasónica pasiva en un conducto de un modelo de resina inoculados con *Enterococcus faecalis*. Una de las conclusiones fue que la activación ultrasónica pasiva fue significativamente más efectiva que la irrigación convencional, sin embargo, no eliminó por completo las bacterias de los modelos. Resultados parecidos a los obtenidos en el presente estudio en el cual activación ultrasónica pasiva redujo un 98,93% de contaminación por *Enterococcus faecalis* sin lograr su completa eliminación. Estudios como el de Van Der Sluis y cols, obtuvieron resultados parecidos, en su evaluación determinaron la capacidad de efectividad que tenía irrigación ultrasónica pasiva, llegando a la conclusión de que la misma es más efectiva en limpiar los conductos radiculares que la irrigación manual, evaluaron parámetros como el diámetro del conducto, la conicidad, resultando ser también valiosos al momento de determinar la eficacia de la remoción de residuos de dentina, antiguamente era más difícil conformar y limpiar completamente el conducto radicular, por ese motivo se han desarrollado técnicas como es la irrigación ultrasónica pasiva que ha facilitado efectivamente los resultados²⁸.

Varios estudios han demostrado que la agitación ultrasónica de las soluciones de irrigación después de la instrumentación manual o mecanizada puede mejorar la limpieza de los canales y los istmos²⁹. Situación que se confirmó en el presente estudio ya que posterior a la Activación Ultrasónica Pasiva (PUI) y Activación Ultrasónica Continua (CUI), se observó que las Unidades formadoras de colonia de *Enterococcus faecalis*, disminuyeron un 98,93% de contaminación con PUI y 99,26% de contaminación con CUI. Teniendo mínima significancia entre los dos sistemas complementarios de irrigación, resultado similar al estudio de Castelo-Baz et al³⁰.

Conclusiones

La preparación químico-mecánica redujo significativamente el biofilm maduro de *Enterococcus faecalis* en los conductos radiculares, sin embargo, no logró eliminarlo completamente.

Los sistemas ultrasónicos al ser aplicados como sistemas de activación complementaria después del preparo químico-mecánico, aumentan la capacidad de desinfectar el sistema de conductos radiculares.

En la comparación de los dos sistemas de activación complementaria, no se observaron diferencias significativas, indicándonos que los dos resultan tener la misma eficacia antibacteriana.

Conflicto de intereses

Los autores declararon no tener ningún conflicto de interés personal, financiero, intelectual, económico y de interés corporativo con Universidad Central del Ecuador y los miembros de la revista Odontología.

Contribución de los autores

Jessica Fernanda Ibarra de la Vega, José Eduardo Maldonado Paredes, Laura Cristina Nardello Leite, Roberto Xavier Romero Cazares, son responsables de la: a Concepción y diseño del trabajo; b Recolección/obtención de resultados; c Análisis e interpretación de datos; d Redacción del manuscrito; e Revisión crítica del manuscrito; f Aprobación de su versión final.

Financiación

Este trabajo fue financiado por sus autores.

Referencias

1. Cynthia C. Sankarsingh Morillo. Determinación de Exito y Fracaso en el Tratamiento de Conductos. https://www.carlosboveda.com/Odontologosfolder/odontoinvitadoold/odontoinvitado_33.htm.
2. Siqueira, J. F. Aetiology of root canal treatment failure: Why well-treated teeth can fail. *International Endodontic Journal* vol. 34 1–10 (2001).
3. Sjögren, U., Figdor, D., Persson, S. & Sundqvist, G. Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Int. Endod. J.* 30, 297–306 (2003).
4. Ray, H. A. & Trope, M. Periapical status of endodontically treated teeth in relation to the technical quality of the root filling and the coronal restoration. *Int. Endod. J.* 28, 12–18 (1995).
5. Adib, V., Spratt, D., Ng, Y. L. & Gulabivala, K. Cultivable microbial flora associated with persistent periapical disease and coronal leakage after root canal treatment: A preliminary study. *Int. Endod. J.* 37, 542–551 (2004).
6. Sundqvist, G., Figdor, D., Persson, S. & Sjögren, U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 85, 86–93 (1998).
7. Pinheiro, E. T. et al. Evaluation of root canal microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. *Oral Microbiol. Immunol.* 18, 100–103 (2003).
8. Haapasalo, M., Shen, Y., Qian, W. & Gao, Y. Irrigation in Endodontics. *Dent. Clin. NA* 54, 291–312.
9. Peters, O. A., Schönenberger, K. & Laib, A. Effects of four Ni-Ti preparation techniques on root canal geometry assessed by micro computed tomography. *Int. Endod. J.* 34, 221–230 (2001).
10. Wu, M. K. & Wesselink, P. R. A primary observation on the preparation and obturation of oval canals. *Int. Endod. J.* 34, 137–141 (2001).
11. García Delgado A.*, Martín-González J.*, Castellanos-Cosano L., Martín Jiménez M., S.-E. J. J. . Sistemas ultrasónicos para la irrigación del sistema de conductos radiculares. http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0213-12852014000200004 (2014).

12. Violich, D. R. & Chandler, N. P. The smear layer in endodontics - A review. *International Endodontic Journal* vol. 43 2–15 (2010).
13. Kanter, V. et al. A quantitative and qualitative analysis of ultrasonic versus sonic endodontic systems on canal cleanliness and obturation. *Oral Surgery, Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endodontology* 112, 809–813 (2011).
14. Van Der Sluis, L. W. M., Gambarini, G., Wu, M. K. & Wesselink, P. R. The influence of volume, type of irrigant and flushing method on removing artificially placed dentine debris from the apical root canal during passive ultrasonic irrigation. *Int. Endod. J.* 39, 472–476 (2006).
15. Stuart, C. H., Schwartz, S. A., Beeson, T. J. & Owatz, C. B. *Enterococcus faecalis*: Its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *Journal of Endodontics* vol. 32 93–98 (2006).
16. Chugal, N. et al. “Endodontic Treatment Outcomes.” *Dental clinics of North America* vol. 61,59-80 (2017).
17. Salehrabi, R., and Ilan Rotstein. “Endodontic treatment outcomes in a large patient population in the USA: an epidemiological study.” *Journal of endodontics* vol. 30, 846-50 (2004).
18. Sassone, L. M., Fidel, R. A. S., Fidel, S. R., Dias, M. & Hirata, R. J. Antimicrobial activity of different concentrations of NaOCl and chlorhexidine using a contact test. *Braz. Dent. J.* 14, 99–102 (2003).
19. Sirtes, G., Waltimo, T., Schaetzle, M. & Zehnder, M. The effects of temperature on sodium hypochlorite short-term stability, pulp dissolution capacity, and antimicrobial efficacy. *J. Endod.* 31, 669–671 (2005).
20. Morgan, R. W., Carnes, D. L. & Montgomery, S. The solvent effects of calcium hydroxide irrigating solution on bovine pulp tissue. *J. Endod.* 17, 165–168 (1991).
21. Pineda, E., González, A. & Villa, P. Comparación in vitro de la desinfección del sistema de conductos radiculares con NaOCl al 5.25 y láser diodo. *CES Odontol.* 21, 33-38–38 (2008).
22. Bhuva, B. et al. The effectiveness of passive ultrasonic irrigation on intraradicular *Enterococcus faecalis* biofilms in extracted single-rooted human teeth. *Int. Endod. J.* 43, 241–250 (2010).
23. Guerreiro-Tanomaru, J. M., Chávez-Andrade, G. M., de Faria-Júnior, N. B., Watanabe, E. & Tanomaru-Filho, M. Effect of passive ultrasonic irrigation on *Enterococcus faecalis* from root canals: An ex vivo study. *Braz. Dent. J.* 26, 342–346 (2015).
24. Dunavant, T. R., Regan, J. D., Glickman, G. N., Solomon, E. S. & Honeyman, A. L. Comparative Evaluation of Endodontic Irrigants against *Enterococcus faecalis* Biofilms. *J. Endod.* 32, 527–531 (2006).
25. Siqueira, J. F. et al. Efficacy of instrumentation techniques and irrigation regimens in reducing the bacterial population within root canals. *J. Endod.* 28, 181–184 (2002).
26. Jiménez, L., Gómez, J. & Matos, M. Irrigación ultrasónica pasiva comparada con irrigación manual en la eliminación del *enterococcus faecalis* del sistema de conductos (estudio in vitro). *Acta odontol. venez* (2014).
27. Townsend, C. & Maki, J. An In Vitro Comparison of New Irrigation and Agitation Techniques to Ultrasonic Agitation in Removing Bacteria From a Simulated Root Canal. *J. Endod.* 35, 1040–1043 (2009).
28. Van Der Sluis, L. W. M., Versluis, M., Wu, M. K. & Wesselink, P. R. Passive ultrasonic irrigation of the root canal: A review of the literature. *International Endodontic Journal* vol. 40 415–426 (2007).
29. Burleson, A., Nusstein, J., Reader, A. & Beck, M. The In Vivo Evaluation of Hand/Rotary/Ultrasound Instrumentation in Necrotic, Human Mandibular Molars. *J. Endod.* 33, 782–787 (2007).
30. Castelo-Baz, P. et al. In vitro comparison of passive and continuous ultrasonic irrigation in simulated lateral canals of extracted teeth. *J. Endod.* 38, 688–691 (2012).