

## AVALIAÇÃO DA EFETIVIDADE DO QMIX EM BIOFILMES DE ENTEROCOCCUS FAECALIS

*The effectiveness of qmix assessment biofilms enterococcus faecalis*

Samuel Lucas Fernandes<sup>1</sup>, Layla Regina Silva Munhoz de Vasconcelos<sup>2</sup>, Raquel Zanin Mídena<sup>3</sup>, Marcelo Juliano Moretto<sup>4</sup>, Juliana Delatorre Bronzato<sup>5</sup>, Paulo Henrique Weckwerth<sup>6</sup>, Marco Antonio Hungaro Duarte<sup>7</sup>

<sup>1</sup>Professor Mestre da disciplina de Endodontia, Faculdade Mineirense - FAMA, Mineiros, Goiás, Brasil.

<sup>2</sup>Mestre em Endodontia, Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo, Bauru, São Paulo, Brasil.

<sup>3</sup>Doutora em Endodontia, Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo, Bauru, São Paulo, Brasil.

<sup>4</sup>Professor Doutor da disciplina de Odontopediatria, Faculdade Mineirense - FAMA, Mineiros, Goiás, Brasil.

<sup>5</sup>Doutoranda pela University of Dundee, School of Dentistry. Dundee, Reino Unido.

<sup>6</sup> Professor Doutor de Microbiologia, Universidade Sagrado do Coração – USC, Bauru, São Paulo, Brasil

<sup>7</sup>Professor Associado do Departamento de Dentística, Endodontia e Materiais Odontológicos, Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo, Bauru, São Paulo, Brasil.

## RESUMO

O objetivo desse estudo foi avaliar a efetividade do irrigante QMix sobre biofilme *in vitro* de *Enterococcus faecalis*. Para o estudo foram utilizados 15 discos de 4mm de diâmetro de dentina retirados do terço médio de incisivos bovinos. Os espécimes foram alocados em 3 grupos (NaOCl 1%, QMix e Solução fisiológica) de 6 espécimes cada. Os espécimes foram tratados com EDTA por 5 minutos e esterilizados. A contaminação dos discos foi feita com *Enterococcus faecalis* (ATCC 4083) e a formação do biofilme *in vitro* se deu no período de 21 dias. Após esse período os espécimes foram tratados por cinco minutos com os respectivos agentes irrigantes. Após o tratamento os espécimes foram corados por dez minutos com o corante live and dead e avaliados em microscopia confocal de varredura a laser capturando-se 4 imagens por amostra. As imagens capturadas foram analisadas pelo programa bioimage analisando o biovolume e a % de bactérias vivas. A análise estatística foi realizada com os testes Kruskal-Wallis e Dunn`s não paramétricos, pois os dados não apresentaram distribuição normal. O NaOCl 1% proporcionou uma maior remoção de biofilme diferenciando-se estatisticamente dos demais grupos, e em relação a viabilidade diferenciou-se apenas da solução fisiológica. O QMix proporcionou uma dissolução considerável do biofilme diferenciando-se estatisticamente da solução fisiológica, tanto na dissolução quanto na capacidade antimicrobiana.

**Palavras-chave:** Endodontia, Biofilme, *Enterococcus faecalis*.

## ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effectiveness of the irrigant QMix on in vitro *Enterococcus faecalis* biofilm. Fifteen dentin discs of 4mm diameter from the middle third of bovine incisors were used in this study. The specimens were divided into 3 groups (1% NaOCl, QMix, and physiological solution) 6 specimens each. The samples were treated with EDTA for 5 minutes and sterilized. The contamination of the disks was done with *Enterococcus faecalis* (ATCC 4083) and the formation of biofilm in vitro occurred in 21 days. Subsequently this period, specimens were treated for five minutes with their irrigant solutions and then were stained by ten minutes with live and dead dye. Finally, samples were evaluated in confocal scanning laser capturing up 4 images per sample. The captured images were analyzed by the program bioimage analyzing biovolume and % of live bacteria. Statistical analysis was performed using Kruskal-Wallis and Dunn`s nonparametric because the data did not show normal distribution. Significantly different from the other groups, 1% NaOCl provided a greater removal of biofilm and regarding the viability differed only from the physiological solution. QMix provided considerable dissolution of the biofilm differentiating statistically from saline solution in both the dissolution and in antimicrobial capacity.

**Keywords:** Endodontics, Biofilm, *Enterococcus faecalis*.

## INTRODUÇÃO

A limpeza e antissepsia dos sistemas de canais radiculares é uma etapa fundamental na realização do tratamento endodôntico, que influencia no sucesso da endodontia. Devido os instrumentos não tocarem todas as paredes do canal radicular e não atuar em áreas de achatamento e istmo<sup>[1,2]</sup>, a irrigação tem papel fundamental para atingir essas áreas não tocadas afim de proporcionar uma limpeza e antissepsia adequada, removendo tecido pulpar vital ou necrótico, micro-organismos e seus subprodutos, debris e smear layer<sup>[3,4,5]</sup>. Para isso, é necessário que a solução irrigadora possua capacidade de agir sobre matéria orgânica, inorgânica além de possuir atividade antimicrobiana. O Hipoclorito de sódio (NaOCl) e o EDTA são as soluções irrigadoras mais utilizadas na endodontia<sup>[4]</sup>, sendo que o NaOCl atua sobre matéria orgânica e microrganismos<sup>[6]</sup> e o EDTA, que é utilizado como um irrigante final, atua sobre matéria inorgânica buscando a limpeza de debris dentinários e smear layer<sup>[7]</sup>. No entanto, o EDTA não possui capacidade antimicrobiana adequada<sup>[8]</sup>.

Diante disso, tem-se buscado soluções irrigadoras que reúnam todas essas propriedades ou irrigantes finais que possuam mais propriedades que o EDTA, principalmente com ação antimicrobiana, sendo dessa forma mais eficazes na irrigação final.

Dentre esses irrigantes, o QMix 2 in 1 (Dentsply Tulsa Dental, Tulsa, OK) foi um desenvolvido almejando coadjuvar os efeitos quelantes com os antimicrobianos, uma vez que apresenta o EDTA, clorexidina e certramida, em sua composição<sup>[9]</sup>. Esse estudo teve como objetivo avaliar a efetividade antimicrobiana e o poder de dissolução do irrigante QMix sobre biofilme in vitro de enterococcus faecalis.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Seleção e preparo dos espécimes

Para se obter a 21 raízes de dentes bovinos necessárias para a realização do estudo que tivessem diâmetro anatômico 40, foram selecionadas oitocentas raízes de incisivos bovinos, de forma que não apresentassem fraturas, má formações, formação incompleta do ápice e fossem retas. Com a finalidade de se obter raízes com 15 mm de comprimento, a partir do ápice radicular os dentes bovinos foram medidos com paquímetro digital (Starrett Indústria e Comércio Ltda., São Paulo, Brasil), e cortados a 15 mm a partir do ponto de referência. Para isso, os dentes foram

fixados em uma base de resina (Resina T-208, Redifibra Comércio de Produtos para Fiberglass Ltda, São Paulo, Brasil, 40x40x5 mm<sup>3</sup>), pela superfície oclusal com cera pegajosa (Asfer Industria Química Ltda). Para o corte das raízes foi utilizado um disco diamantado de dupla face - XL 12205, “High concentration”, 102 x 0,3 x 12,7 mm<sup>3</sup> (Extec Corp. Enfield, CT, USA/ Ref: 12205), devidamente acoplado à máquina de corte ISOMET 1000 (Extec Corporation, Labcut 1010, USA).

Após o corte os espécimes a serem inseridos no estudo foram selecionados a partir de uma calibragem através da inserção de limas tipo K no canal. Foram selecionadas amostras em que o instrumento de calibre 40 travasse em 14 mm a partir da borda coronal do corte, totalizando 21 espécimes. A instrumentação de todos os espécimes foi realizada utilizando-se broca brocas LaAxxess 45/.06 (SybronEndo, EUA) à 10 mm da borda coronal da raiz, para preparo do terço cervical e médio, e com Reciproc 50.05 (VDW, Alemanha) na extensão de instrumentação, que foi de 14mm. Durante o preparo dos canais, foi utilizado 5 mL de Hipoclorito de sódio Cloro Rio 2,5% (Rioquímica, São José do Rio Preto, SP, Brasil).

## **Ação Antimicrobiana e Dissolução do biofilme in vitro**

As raízes direcionadas para essa fase do estudo foram incluídas em silicona de condensação densa em mufla, com o intuito de evitar o extravasamento da solução irrigadora e proporcionar uma maior simulação da realidade. Discos de dentina radicular de origem bovina foram utilizados como meio formador de biofilme. Para isso foi retirada da região do terço médio de raízes de incisivos bovinos um disco de dentina de 3mm de diâmetro com uma broca trefina, sendo estes identificados de acordo com os referidos dentes. Os discos foram retirados à de 5mm do ápice do dente. As superfícies dentinárias desses discos obtidos foram polidas tentando padronizar o tempo de polimento em cada superfície com a finalidade de manter uma espessura mínima de 1,00mm. Assim a regularização foi feita através do polimento com lixas de carbetto de silício (Buheler Ltda, Illinois, USA) de granulação 600, acopladas em uma máquina politriz (Fortel Indústria e Comércio Ltda., Brasil), sendo que os discos eram apoiados manualmente, sob refrigeração, por alguns segundos, até ser conseguida uma superfície lisa.

Para a confirmação da espessura de cada disco de dentina, foi utilizado um paquímetro digital (Starrett Indústria e Comércio Ltda., São Paulo, Brasil). Estes discos foram tratados com hipoclorito de sódio 1% (Rioquímica Ltda., São José do Rio Preto, SP, Brasil) durante 15 minutos, em seguida com EDTA a 17% (Biodinâmica, Ibioporã, PR, Brasil) por 5 minutos. Esse tratamento químico teve por objetivo remover resíduos orgânicos e possível presença de raspas de dentina,

oriundas do corte. Para constatar a eficácia da limpeza, dois discos por grupo foram aleatoriamente selecionados para a visualização por meio do Microscópio Eletrônico de Varredura. Após essa etapa, todos os discos foram acondicionados em eppendorfs, contendo 1mL de água destilada, esse conjunto foi esterilizado em autoclave à 121°C.

## **Formação do biofilme**

Para a formação do biofilme *in vitro*, as amostras esterilizadas foram colocadas em poços de cultura, e foi feita a indução do biofilme puro de *Enterococcus faecalis* ATCC 4083 cultivados em caldo BHI. A indução se deu no período de 21 dias com trocas de meio a cada dois dias, todo o meio dos poços era removido e o novo meio era colocado até o nível de 4/5 do poço de cultura.

## **Irrigação**

Para o estudo foram definidos 3 protocolos de irrigação, sendo os espécimes irrigados com 5 mL do irrigante deixando em repouso 5 minutos dentro do canal, sendo utilizado 10 mL de solução salina para neutralizar o irrigante primário por mais 5 minutos.

A irrigação foi executada utilizando-se pontas de corpo de plástico com pescoço angulado e uma cânula de metal fina (NaviTip®, Ultradent Products, USA) acopladas a uma seringa de plástico descartável transparente de 5 ml com rosca Luer Lock (Ultradent Products, USA), inundando-se o canal com o agente irrigante.

## **Análises da dissolução e ação antimicrobiana - Confocal**

Após a formação do Biofilme, seis discos de dentina por grupo foram selecionados para a análise em confocal sendo que um disco de dentina foi escolhido aleatoriamente e levado ao microscópio de varredura Personal SEM© (PSEM) eXpress™ (Aspex corporation), para captura da imagem do biofilme a fim de confirmar a completa colonização do espécime. Sendo confirmada a formação do biofilme os discos foram reposicionados nos dentes de onde foram tirados a interface selada com cera utilidade e os dentes levados novamente a mufla. Os protocolos de irrigação foram realizados em cada grupo conforme descritos anteriormente.

Após a aplicação dos irrigantes, os discos de dentina foram removidos das respectivas raízes e lavados com 100 µL de PBS para eliminar resíduos e foram corados com 50 µl de uma solução de Syto 9/Iodeto de propídio (Live/Deadtechnique-In Vitro Gen), durante 10 minutos. O Syto9 é um corante fluorescente (verde) seletivo do ácido nucléico, indicado para corar células

vivas e mortas (corante geral). Já o iodeto de propídio visa identificar a população microbiana com membrana celular afetada ou células mortas, apresenta fluorescência vermelha. Ao entrar nas células, a fluorescência vermelha diminui a fluorescência do Syto-9, deixando as células mortas uma fluorescência vermelha ou amarelada. As amostras após a coloração foram avaliadas no Microscópio Confocal de Varredura a Laser (Leica, Mannheim, Alemanha) utilizando um aumento de 10x para obter uma visão panorâmica. No biofilme avaliado foram eleitos 5 pontos, nos quais foram captadas imagens, com aumento de 40x. Essas imagens foram feitas com intervalos de 1µm desde a parte mais superior do biofilme até a superfície dentinária.

As imagens obtidas (arquivos com extensão.lif) foram analisadas no software bioImage\_L : Image Analysis. Software esse que foi desenvolvido para estudos de biofilmes microbianos. E foram avaliados o biovolume total e a porcentagem de células vivas e mortas no biofilme.

## Análise estatística

A análise estatística foi realizada com os testes Kruskal-Wallis e Dunn`s não paramétricos, pois os dados não apresentaram distribuição normal ( $p < 0,05$ ). O Prisma 5.0 (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA) foi utilizado como o software analítico.

## RESULTADOS

O NaOCl 1% proporcionou uma maior remoção de biofilme diferenciando-se estatisticamente dos demais grupos, e em relação a viabilidade diferenciou-se apenas da solução fisiológica. O QMix proporcionou uma dissolução considerável do biofilme diferenciando-se estatisticamente da solução fisiológica, tanto na dissolução quanto na capacidade antimicrobiana.

Tabela 1. Mediana (valores mínimos e máximos), das porcentagens de biofilme viável após os tratamentos bem como do biovolume em µm<sup>3</sup>.

Grupos	NaOCl	QMix	Solução Fisiológica
% Vivas	9,56 (0-36,22) <sup>a</sup>	10,74 (0,04-27,15) <sup>a</sup>	94,45 (75,66-99,99) <sup>b</sup>
Biovolume	8,5 (0,0-27) <sup>a</sup>	6841(1464-9222) <sup>b</sup>	49359 (10112-198505) <sup>c</sup>

Letras diferentes nas linhas significam dados estatisticamente diferentes ( $P < 0,05$ ).

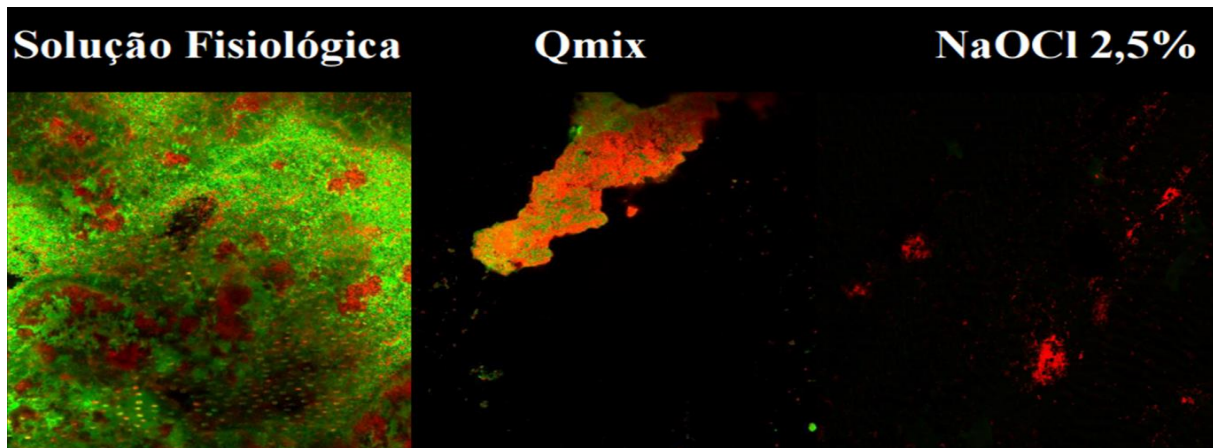


Imagem 1. Imagem representativa dos grupos analisados, onde a cor verde representa as bactérias viáveis e a vermelha a inviáveis, já o preto representa regiões sem a presença de biofilme.

## DISCUSSÃO

Dentes bovinos foram utilizados no estudo com base em estudos anteriores que têm utilizado tanto para estudos em microbiologia<sup>[10]</sup> quanto para estudos na remoção de debris<sup>[11]</sup> e smear layer<sup>[12]</sup>. Os dentes bovinos são uma alternativa a falta de dentes humanos para a demanda amostral dos estudos e as características da dentina se assemelha muito a dentina humana<sup>[13,14]</sup>, justificando-se então o uso dos dentes bovinos neste estudo. Com novos métodos de técnicas de instrumentação a modelagem dos canais radiculares é realizada em pouco tempo<sup>[15,16]</sup> e permite pouco tempo de permanência das soluções irrigadoras no canal. Uma vez que o tempo de contato é importante para a efetividade das soluções irrigadoras torna-se importante se ter soluções irrigadoras eficientes.

Os irrigantes tornam-se importantes uma vez que os instrumentos não tocam todas as paredes do canal durante a modelagem do sistema de canais radiculares e há regiões de complexidade anatômica onde é impossível o alcance pela instrumentação<sup>[17]</sup>. Além disso, a instrumentação dos canais radiculares produz smear layer e debris dentinários<sup>[18,19,20]</sup>. A smear layer fica aderida as paredes dos canais radiculares obliterando os túbulos dentinários e pode impedir a penetração de irrigantes sem poder quelante, medicação intracanal e proporcionar falhas na adaptação de materiais obturadores<sup>[19,21,22]</sup>.

Há uma busca por um irrigante que proporcione a dissolução de matéria orgânica, capacidade antimicrobiana e de remoção de smear layer. Na literatura há trabalhos que sinalizam para o QMix como um irrigante final mais completo<sup>[23,24,25,26,27,28,29]</sup>. A fim de se sanar dúvidas a



respeito da real importância dessa solução esse estudo foi delineado. Em um grupo com solução salina considerando que essa substância não possui capacidade de dissolução<sup>[30]</sup> e não possui ação quelante<sup>[31]</sup>.

Para avaliação da dissolução e viabilidade do biofilme *in vitro* após o tratamento pelos irrigantes foi utilizada a microscopia confocal para visualizar a dissolução volumétrica e a viabilidade do biofilme. Em termos de dissolução o que pode se observar foi o grande poder de dissolução do hipoclorito de sódio em relação ao Qmix e a solução fisiológica. Já com relação a viabilidade o QMix proporcionou uma perda de viabilidade do biofilme que não se diferenciou estatisticamente do NaOCl contrastando com o estudo de Ordinola-Zapata et al. (2013)<sup>[28]</sup>, pode-se ver uma fraca ação antimicrobiana do QMix, contrastando com os resultados encontrado por esse e por outros estudos<sup>[24,25,32]</sup>. Apesar de não possuir uma eficácia da dissolução semelhante ao do hipoclorito de sódio o Qmix mostrou um poder de dissolução do biofilme maior do que o da solução salina.

## CONCLUSÃO

Dentro das limitações desse estudo podemos observar que o QMix tem um efeito antimicrobiano similar ao do hipoclorito de sódio, entretanto, não possui o mesmo poder de dissolução do biofilme.

## AGRADECIMENTOS

Processo Fapesp: 2013/05980-3

## REFERÊNCIAS

- 1 Markvart M, Darvann TA, Larsen P, Dalstra M, Kreiborg S, Bjørndal L. Micro-CT analyses of apical enlargement and molar root canal complexity. *Int Endod J.* 2012;45(3):273-81.
- 2 Anjaneyulu K, Nivedhitha MS. Influence of calcium hydroxide on the post-treatment pain in Endodontics: A systematic review. *J Conserv Dent.* 2014;17(3):200-7.

3 Davis SR, Brayton SM, Goldman M. The morphology of the prepared root canal: a study utilizing injectable silicone. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1972;34(4):642-8.

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

5 Kaushik N, Rehani U, Agarwal A, Kaushik M, Adlakha V. Antimicrobial Efficacy of Endodontic Irrigants against *Enterococcus Faecalis* and *Escherichia Coli*: An in vitro study. *Int J Clin Pediatr Dent* 2013;6(2):178-182.

6 Pasqualini D, Cuffini AM, Scotti N, Mandras N, Scalas D, Pera F, et al. Comparative evaluation of the antimicrobial efficacy of a 5% sodium hypochlorite subsonic-activated solution. *J Endod.* 2010;36:1358–60.

7 Pedullà E, Franciosi G, Ounsi HF, Tricarico M, Rapisarda E, Grandini S. Cyclic fatigue resistance of nickel-titanium instruments after immersion in irrigant solutions with or without surfactants. *J Endod.* 2014;40(8):1245-9.

8 Kaushik N, Rehani U, Agarwal A, Kaushik M, Adlakha V. Antimicrobial Efficacy of Endodontic Irrigants against *Enterococcus Faecalis* and *Escherichia Coli*: An in vitro study. *Int J Clin Pediatr Dent* 2013;6(2):178-182.

9 Dai L, Khechen K, Khan S, Gillen B, Loushine BA, Wimmer CE, Gutmann JL, Pashley D, Tay FR. The effect of QMix, an experimental antibacterial root canal irrigant, on removal of canal wall smear layer and debris. *J Endod.* 2011;37(1):80-4.

10 Gründling GL, Zechin JG, Jardim WM, de Oliveira SD, de Figueiredo JA. Effect of ultrasonics on *Enterococcus faecalis* biofilm in a bovine tooth model. *J Endod.* 2011;37(8):1128-33.

11 Van der Sluis LW, Wu MK, Wesselink PR. The evaluation of removal of calcium hydroxide paste from an artificial standardized groove in the apical root canal using different irrigation methodologies. *Int Endod J* 2007;40:52–7.

12 Castagna F, Rizzon P, da Rosa RA, Santini MF, Barreto MS, Duarte MA, Só MV. Effect of passive ultrasonic instrumentation as a final irrigation protocol on debris and smear layer removal--a SEM analysis. *Microsc Res Tech.* 2013;76(5):496-502.

13 Orstavik D, Haapasalo M. Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. *Endod Dent Traumatol.* 1990;6(4):142-9.

14 Schilke R, Bauss O, Lisson JA, Schuckar M, Geurtsen W. Bovine dentin as a substitute for human dentin in shear bond strength measurements. *Am J Dent.* 1999;12(2):92-6.

15 Bürklein S, Hinschitzka K, Dammaschke T, Schäfer E. Shaping ability and cleaning effectiveness of two single-file systems in severely curved root canals of extracted teeth: Reciproc and WaveOne versus Mtwo and ProTaper. *Int Endod J.* 2012;45(5):449-61.

16 Bürklein S, Schäfer E. Apically extruded debris with reciprocating single-file and full-sequence rotary instrumentation systems. *J Endod.* 2012;38(6):850-2.

17 Arnold M, Ricucci D, Siqueira JF Jr. Infection in a complex network of apical ramifications as the cause of persistent apical periodontitis: a case report. *J Endod.* 2013;39(9):1179-84.

18 Haapasalo M, Shen Y, Qian W, Gao Y. Irrigation in endodontics. *Dent Clin North Am.* 2010;54(2):291-312.

19 Violich DR, Chandler NP. The smear layer in endodontics - a review. *Int Endod J.* 2010;43(1):2-15.

20 Ribeiro EM, Silva-Sousa YT, Souza-Gabriel AE, Sousa-Neto MD, Lorencetti KT, Silva SR. Debris and smear removal in flattened root canals after use of different irrigant agitation protocols. *Microsc Res Tech.* 2012;75(6):781-90.

21 Pashley DH, Kalathoor S, Burnham D. 1986. The effects of calcium hydroxide on dentin permeability. *J Dent Res* 65:417-420.

22 Sisodia R, Ravi KS, Shashikiran ND, Singla S, Kulkarni V. Bacterial penetration along different root canal fillings in the presence or absence of smear layer in primary teeth. *J Clin Pediatr Dent.* 2014;38(3):229-34.

23 Nascimento CA, Tanomaru-Filho M, Faria-Junior NB, Faria G, Guerreiro-Tanomaru JM. Antimicrobial activity of root canal irrigants associated with cetrimide against biofilm and planktonic *Enterococcus faecalis*. *J Contemp Dent Pract.* 2014;15(5):603-7.

24 Wang Z, Shen Y, Haapasalo M. Effectiveness of endodontic disinfecting solutions against young and old *Enterococcus faecalis* biofilms in dentin canals. *J Endod.* 2012;38(10):1376-9.

25 Stojicic S, Shen Y, Qian W, Johnson B, Haapasalo M. Antibacterial and smear layer removal ability of a novel irrigant, QMiX. *Int Endod J.* 2012;45(4):363-71.

26 Morgental RD, Singh A, Sappal H, Kopper PM, Vier-Pelisser FV, Peters OA. Dentin inhibits the antibacterial effect of new and conventional endodontic irrigants. *J Endod.* 2013;39(3):406-10.

27 Wang Z, Shen Y, Haapasalo M. Effect of smear layer against disinfection protocols on *Enterococcus faecalis*-infected dentin. *J Endod.* 2013;39(11):1395-400.

28 Ordinola-Zapata R, Bramante CM, Garcia RB, de Andrade FB, Bernardineli N, de Moraes IG, Duarte MA. The antimicrobial effect of new and conventional endodontic irrigants on intra-orally infected dentin. *Acta Odontol Scand.* 2013;71(3-4):424-31.

29 Cord CB, Velasco RV, Ribeiro Melo Lima LF, Rocha DG, da Silveira Bueno CE, Pinheiro SL. Effective analysis of the use of peracetic acid after instrumentation of root canals contaminated with *Enterococcus faecalis*. *J Endod.* 2014;40(8):1145-8.

30 Ballal NV, Mala K, Bhat KS. Effect of maleic acid and ethylenediaminetetraacetic acid on the dissolution of human pulp tissue--an in vitro study. *Int Endod J.* 2011;44(4):353-6.

31 Baumgartner JC, Brown CM, Mader CL, Peters DD, Shulman JD. A scanning electron microscopic evaluation of root canal debridement using saline, sodium hypochlorite, and citric acid. *J Endod.* 1984;10(11):525-31.

32 Guerreiro-Tanomaru JM, Nascimento CA, Faria-Júnior NB, Graeff MS, Watanabe E, Tanomaru-Filho M. Antibiofilm activity of irrigating solutions associated with cetrimide. Confocal laser scanning microscopy. *Int Endod J.* 2014;47(11):1058-63.