

Roberto Gerosa
Gianluca Menegazzi
Mario Ferraro
Luca Valentini
Giacomo Cavalleri

Università degli Studi di Verona
Cattedra di Odontoiatria Conservatrice
Titolare: Prof. Giacomo Cavalleri

Corrispondenza:
Dr. Gianluca Menegazzi
Clinica Odontoiatrica
Università degli Studi di Verona
37134 Verona - Via delle Menegone
Tel. 045/8074251-8074254 - Fax 045/8202142

Utilizzo della spettroscopia in assorbimento atomico per la valutazione dell'efficacia di due sostanze chelanti

An evaluation of the efficacy of two chelants using spectroscopy in atomic absorption

RIASSUNTO

In questo studio gli autori hanno voluto valutare la capacità chelante di due sostanze di comune uso in Endodonzia: LARGAL Ultra ed RC-PREP.

Attraverso il metodo della spettroscopia di fiamma in assorbimento atomico è stata valutata l'azione diretta dei due chelanti.

Il LARGAL Ultra risulta avere un'azione più incisiva rispetto all'RC-PREP.

Rimane il fatto che oggi giorno l'uso dei chelanti appare sempre più necessario sia per la rimozione dei detriti endocanalari, sia per l'alesatura di canali atresici.

Parole chiave: Endodonzia. Chelanti.

ABSTRACT

Introduction

From a microscopic point of view, the smear layer is barely distinguishable from the dentinal tubules to which it adheres; its thickness and composition vary depending on the native dentin and the mechanical means utilized. The use of a low-speed drill (15,000 rpm), especially when not accompanied by a water spray, increases the thickness of the smear layer, which at any rate does not exceed 5 microns if you don't consider the debris that penetrates into the dentinal tubules and forms the smear plug. Several authors have suggested various irrigating solutions for removing the smear layer, such as physiological solutions and hydrogen peroxide, which proved inadequate; and sodium hypochlorite at 2-5%, which is capable of dissolving organic tissue, but which is unable to remove the smear layer. Other acidic solutions have been used such as polyacrylic acid at 20%, which was satisfactory in removing the smear layer, and even though it left substantial debris, the dentinal tubules were nonetheless patent. Citric acid at 10% gives the same results. Other recommendations have been orthophosphoric acid and maleic acid, which cause a rapid disappearance of

peritubular tissue and funnel-shaped widening of the tubules. It is important to point out that there are several problems connected with the use of acidic solutions: their effectiveness will depend on the acid used, its concentration and the amount of time applied. These parameters are not easily controllable. The most widespread irrigating solution today is EDTA (ethylenediamine tetra-acetic acid) associated with sodium hypochlorite, because it appears that the combined action of the two removes the mineralized components of dentin. The EDTA exposes the organic parts, making them accessible to the action of solvents like sodium hypochlorite.

Materials and Methods

For our study we used EDTA or ethylenediaminetetra-acetic acid, which, in the pure state, appears as a white, crystalline, odourless powder, is stable at high temperatures, has a high point of fusion, an acidic taste, and is not toxic.

In order to evaluate the chelating action of this substance, we used two commercial products both based on EDTA:

1. RC-PREP (Medical Products Laboratories, Oral Pharmaceuticals Division, Philadelphia, PA, 19115 USA), which is a gel made up of 15% EDTA and 10% urea peroxide in a propylene base, with a pH of 3.

2. LARGAL Ultra (Specialites Septodont 58, rue du Pont de créteil, 94100 Saint-Maur, France), available in 13 ml phials containing 15 g of EDTA, 0.75 g cetrimide, and excipients as needed for 100 ml.

We used 45 grams of tooth substance obtained by sectioning teeth with a diamond disc. We eliminated any residual pulp in the root canals by soaking the fragments in sodium hypochlorite for about 45 minutes. We then washed them in distilled water and dried them under lamps. We divided the material into 8 specimens of 5 g each; 4 were used in the LARGAL Ultra tests, and 4 with RC-PREP. The specimens were soaked in the solutions and labeled according to the length of time they remained: specimen 1: for 1/4 h; specimen 2: 1/2 h; specimen 3: 1 h; specimen 4: 2 h. In both cases the amount of solution was standardized and measured at 6 cc for each specimen. After

leaving the samples in their solutions for the relative times, the latter were collected in test tubes and the former were washed again in distilled water and dried under lamps. The teeth fragments were then weighed again; and, using chemical procedures, the chelating action of the solutions was assessed as well as any variation in their pH.

Results

Chelation was assessed by measuring the amount of calcium present in the 8 specimens through the use of flame spectroscopy in atomic absorption. This technique is based on two principles:

1. the absorption of a certain element upon electronic transition is an indication of the presence of that element (qualitative analysis);

2. the law of Laber-Beer states that the degree of absorption is closely related to the concentration of the element in the absorbing cell (quantitative analysis).

Regarding calcium content, an analysis of the LARGAL Ultra solution gave the results shown in Tab. 1. As you can see, the chelating phenomenon is not constant over time, in the sense that even though the concentration of calcium increases for the various specimens, it has a decreasing pattern. The fragments soaked in the LARGAL Ultra solution were weighed before and after treatment using a scale calibrated to 1/100th of a gram. The results are shown in Tab. 2.

In this case too the decrease in weight of the various specimens is not constant. Variations of pH were assessed for the LARGAL Ultra solutions, and the results are shown in Tab. 3. The pH decreased the longer the fragments were allowed to soak and according to the chelating action, which turned toward a relative acidity.

Tab. 4 shows the results obtained from the specimens soaked in the RC-PREP solution. You can see that the amount of calcium chelated is minimal. Tab. 5 shows the differences in weight of the tooth sections before and after treatment in the RC-PREP solution. It is obvious that the variations in weight were minimal, especially for the first two samples for which the very sensitive scale measured no difference. The pH was tested and the results are included in Tab.

Gerosa R. Menegazzi G. Ferraro M. Valentini L. Cavalleri G. Utilizzo della spettroscopia in assorbimento atomico per la valutazione dell'efficacia di due sostanze chelanti. *G It Endo* 1996; 3: 96-100

6. We found that also for the RC-PREP solution there were no important variations in the chelating effect or the weight. In fact, specimen 1 is the only one that has a different pH than the others, which stabilized at a pH slightly below the first and which remained constant during the various time periods.

Discussion

Chemical analysis showed that the efficacy in removing the smear layer was far greater with LARGAL Ultra than with RC-PREP, as shown in Tab. 7 (The first number refers to LARGAL Ultra, the second to RC-PREP). (Author's note: 3,7 would read 3.7 in English).

We believe that the differences in resulting values, and therefore in the different clinical behaviours, of the two solutions are attributable to their different composition, to the various reacting times, to the relationship interface/EDTA as well as to pH levels. In fact, LARGAL Ultra is comprised of EDTA and cetrimide; the latter acts directly on the organic matrix of the tooth, therefore allowing direct contact of the EDTA with inorganic substances. This does not occur for RC-PREP which is made up of EDTA and urea peroxide. In this case, a three-dimensional web of organic material forms on the surface of the root canal which hinders any contact between the EDTA and calcified substance. An important factor is the pH at which these materials react. In fact, the initial pH is quite different for the two solutions: 3.9 for RC-PREP and 7.5 for LARGAL Ultra. The fact that RC-PREP works at this pH indicates that the substance tends to form acid/base complexes and to salify so that its chelating action is scarce. Moreover, the resulting salts often deposit on the canal surfaces leaving them less than perfectly clean. The pH of LARGAL Ultra seems to be the optimal level because the chelating action was good and no salts were formed.

Conclusions

The use of chelants in endodontics is a therapeutic practice that we feel offers several advantages:

- it permits drilling of atresic canals or tho-

se with calcium formations that render the canals tortuous and threadlike;

- following instrumentation the canal walls are free of debris, therefore making filling easier with the endodontic materials used in root canals;

- the materials used in the reconstruction of endodontically treated teeth for future posts adhere better to the canal walls;

- it allows medicinal materials inside the canals to reach even the dentinal tubules, therefore guaranteeing a more complete function.

From our observations we can conclude that for EDTA to be truly effective it must be associated with another substance that acts on organic components of the tooth. We noticed that the ideal pH is 7-8, because the chelating capability of EDTA was at its height at that level. Finally, we recommend that EDTA be used in association with the Crown-Down technique where a coronal-apical flaring is done, creating a sort of "reservoir" that will supply the solution to the most apical regions.

Key words: Endodontics. Chelants.

INTRODUZIONE

Il fango dentinale da un punto di vista microscopico è difficilmente distinguibile dalla dentina intertubulare cui aderisce; il suo spessore e la sua composizione variano a seconda della dentina nativa e dei mezzi meccanici impiegati. L'uso di frese a bassa velocità di rotazione (15000 g/m), specie senza raffreddamento con uno spray di acqua, aumenta lo spessore dello strato di smear layer che comunque non supera i 5 micron a meno di non considerare i detriti che penetrano nei tubuli dentinali e che costituiscono lo smear plug (1). Il fango dentinale è organizzato in sub-unità globulari di 0,05-0,1 micron di diametro costituite da particelle di idrossiapatite immerse in un film organico di collagene gelatinoso il quale deriverebbe da diversi materiali organici come processi odontoblastici, cellule del sangue, detriti pulpari e/o batterici (2). Maeder e collaboratori (3), in un'indagine al

SEM, hanno dimostrato che la superficie canalare strumentata risulta irriconoscibile ultrastrutturalmente per la presenza del fango dentinale organizzato tridimensionalmente in due componenti: smear layer di superficie disposto in uno strato di 1-2 micron (4) sulla dentina intertubulare su cui aderisce e da cui risulta indistinguibile; smear layer tubulare (smear plug) impaccettato nei tubuli dentinali per 2-40 micron (5), formato da particelle più fini e con aspetto digitiforme o tubulare segmentato. Il fango dentinale depositatosi sulla parete canalare può in teoria avere due effetti positivi (6): riduzione della permeabilità dentinale valutabile intorno al 40%, come confermato da Dippel e Coll. (7) nel 1981 sulla base di misurazioni del coefficiente di diffusione dell'H₂ sorbitolo; ostacolo meccanico al passaggio dei batteri e dei loro prodotti nei tubuli. Ma il fango dentinale costituisce davvero una barriera così solida ed impenetrabile ai microorganismi? (8, 9). La permeabilità dello smear layer agli streptococchi e la sua solubilità nelle sostanze acide è stata confermata da Akpata e Blechman (10) nel 1982. Brannstrom e Nyborg (11) sostengono che il fango dentinale endodontico possa persino dare rifugio al suo interno a microorganismi anaerobi costituendo un focolaio cronico di sostanze irritanti.

Per Pashley, Michelich e Kehl (1) il fango dentinale forma una barriera meccanica responsabile per l'86% della resistenza al movimento di fluidi attraverso la dentina; non costituisce però un sigillo ermetico poiché consente il passaggio anche di grosse molecole come l'albumina.

Williams e Goldman (6) nel 1984 hanno provato che il fango dentinale può al massimo rallentare, ma non bloccare il passaggio dei microorganismi attraverso i tubuli dentinali.

Nissan e Coll. (12) fanno notare che, se pure i batteri sono rallentati dalla presenza di detriti nei tubuli, possono non esserlo i loro prodotti come ad esempio l'endotossina polisaccaridica (LPS) prodotta dall'*Actinobacillus Actinocyetes Comitans* che permea con relativa facilità la dentina umana anche in presenza di fango dentinale. Per quanto riguarda i materiali impiegati per l'otturazione canalare e per le ricostruzioni postendo-

dontiche (cementi, resine e guttaperca) (4, 13, 14) il fango dentinale impedisce il loro diretto contatto con le pareti radicolari, ostacolandone l'adesione alla dentina. Inoltre la presenza dello smear layer riduce del 25-30% (15) la diffusione attraverso i tubuli dentinali e di conseguenza l'efficacia di molti medicamenti applicati nel canale radicolare, come ad esempio il triamcinolone associato alla dimetilclortetraciclina (16) e l'idrossido di calcio (17).

Mc Comb e Smith (2) sono stati i primi ricercatori nel 1984 a correlare la presenza di smear layer con le procedure di strumentazione endodontica. In seguito ai loro studi, diversi autori proposero varie soluzioni irriganti per rimuovere questo smear layer: soluzione fisiologica e perossido di idrogeno, i quali però si rivelarono privi di effetto nella rimozione dello smear layer; ipoclorito di sodio dal 2% al 5% che ha una buona azione nella dissoluzione del tessuto organico mentre è nulla nei confronti del fango dentinale. Altre sostanze utilizzate sono le soluzioni acide quali acido poliacrilico al 20% che possiede una buona azione nella rimozione dello smear layer e, anche se lascia molti detriti, i tubuli dentinali risultano pervi. Gli stessi risultati si ottengono anche con l'acido citrico al 10%. Infine si sono proposti anche l'acido ortofosforico e l'acido maleico che causano la rapida scomparsa della componente peritubulare e provocano l'allargamento imbutiforme dei tubuli. È importante però ricordare che queste soluzioni acide presentano delle difficoltà nell'utilizzo perché l'effetto varia a seconda dell'acido utilizzato, dalla concentrazione e dal tempo di applicazione, parametri questi di non facile controllo. Oggi l'irrigante che raccoglie i più vasti consensi è l'EDTA (acido etilendiaminotetracetico) (18-21) associato all'ipoclorito di sodio, in quanto sembrerebbe che l'azione combinata dei due porti alla rimozione della componente mineralizzata della dentina. L'EDTA espone la parte organica rendendola accessibile all'azione di solventi come l'ipoclorito di sodio.

MATERIALI E METODI

Per questa ricerca ci si è serviti dell'EDTA o acido etilendiaminotetracetico che allo stato puro si presenta come una polvere bianca, cristallina, inodore, stabile alle alte temperature, ha un elevato punto di fusione, un sapore acido e non è velenosa. Inoltre è solubile in soluzioni acide, caustiche e moderatamente in acqua. Chimicamente presenta la seguente formula bruta: $C_{10}H_{16}N_2O_8$ (20). Questa particolare formula è caratterizzata dalla presenza di gruppi COOH, i quali perdendo l'H⁺ si caricano negativamente diventando COO⁻, a cui si può legare il calcio mediante un legame ionico, con formazione di un sale che non è l'obiettivo dell'azione chelante. Per l'azione chelante il calcio, o lo ione metallico, dovrebbe legarsi mediante legame di coordinazione agli atomi di azoto. L'introduzione dell'EDTA come agente chelante nella terapia canalare risale al 1957 quando Nygaard-Östby pubblicò le prime ricerche su questa sostanza (21). In medicina viene adoperato il calcio-disodio edetato ($CaNa_2EDTA$) negli avvelenamenti di metalli pesanti, quali piombo, iniettato per via endovenosa lenta al dosaggio terapeutico di 1,00 g disciolto in 500 ml di soluzione salina isotonica. Gli effetti farmacologici dell'EDTA dipendono dalla sua affinità verso i metalli bi o trivalenti. L'attività di chelazione dell'EDTA sembra essere autolimitante (5), cioè si esaurisce con la saturazione dei "recettori" per il calcio, per cui il danno alle pareti canalari è minimo. Inoltre il contatto accidentale con i tessuti periapicali è privo di conseguenze (23) in quanto l'EDTA possiede un buon indice di biocompatibilità ed un eventuale assorbimento sistemico non comporta problemi poiché l'EDTA viene rapidamente metabolizzato ed escreto con le urine in 24 ore. Per valutare l'effettiva azione chelante di questa sostanza si sono utilizzati due preparati commerciali entrambi a base di EDTA:

1. RC-PREP (Medical Products Laboratories Oral Pharmaceuticals Division Philadelphia, PA 19115 USA): si presenta sotto forma di gel costituito da EDTA al 15% e perossido di urea al 10%, base di propilenico;

presenta inoltre un pH 3 (Fig. 1).

2. LARGAL Ultra (Specialites Septodont 58, rue du Pont de créteil 94100 Saint-Maur, France): disponibile in flaconi da 13 ml contenenti EDTA 15 g cetrimide 0,75 g eccipienti q.b. a 100 ml (Fig. 2).

Sono stati utilizzati 45 g di sostanza dentale ottenuta mediante sezione di elementi dentali con l'ausilio di un disco diamantato. Dopo la sezione si è proceduto alla eliminazione dei residui pulpari presenti a livello del canale mediante immersione in soluzione di ipoclorito di sodio per circa 45 minuti. Successivamente si è provveduto al lavaggio mediante acqua distillata. Si è quindi passati all'asciugatura mediante utilizzo di lampade. Infine si è proceduto alla suddivisione del materiale in 8 campioni ciascuno del peso complessivo di 5,00 g. Di questi campioni, 4 sono stati utilizzati per testare il LARGAL Ultra e gli altri 4 per l'RC-PREP. Questi campioni sono stati immersi nelle due soluzioni e distinti in relazione al periodo di contatto:

campione 1=1/4 h; campione 2=1/2 h; cam-



Fig. 1 - Confezione di RC-PREP in siringa.

Fig. 1 - One sample of RC-PREP.



Fig. 2 - Confezione di LARGAL Ultra.

Fig. 2 - One sample of LARGAL Ultra.

Tab. 1

Campione	Concentrazione di Ca (mg/l)
1	3.500
2	5.000
3	8.960
4	10.680

pione 3=1 h; campione 4=2 h.

In entrambi i casi la quantità di soluzione è stata standardizzata e misurata in 6 cc per ogni campione esaminato. Dopo aver fatto agire la soluzione per i tempi previsti si è passati alla raccolta della stessa la quale è stata posta in provette, mentre la sostanza dentale è stata nuovamente lavata con acqua distillata ed asciugata sempre mediante l'ausilio di lampade. Si è quindi passati ancora una volta a pesare i diversi campioni. Per quanto riguarda le provette contenenti le soluzioni, con procedure chimiche, sono state quindi valutate l'effettiva azione chelante nonché la variazione di pH provocata dai due chelanti esaminati.

RISULTATI

L'azione chelante è stata valutata mediante misurazione della quantità di calcio presente negli 8 campioni rispetto alle soluzioni di partenza utilizzando la spettroscopia di fiamma in assorbimento atomico. Tale tecnica si basa su due principi:

1. l'assorbimento ad una transizione elettronica permessa per un dato elemento è indice della presenza di quell'elemento (analisi qualitativa);

2. l'entità dell'assorbimento è strettamente legata, attraverso la legge di Lamber-Beer, alla concentrazione dell'elemento stesso nella cella di assorbimento (analisi quantitativa). Dall'analisi della soluzione di LARGAL Ultra, per quanto riguarda il contenuto di calcio, si sono ottenuti i risultati riassunti nella Tabella 1.

Si può notare dalla tabella che il fenomeno di chelazione non si mantiene costante nel tempo nel senso che anche se la concentrazione di calcio aumenta nei diversi campioni da 1 a 4 questa presenta un andamento decrescente. Sempre per il LARGAL Ultra si è valutato il peso dei campioni prima e dopo il trattamento utilizzando una bilancia con la sensibilità al centesimo di grammo. I risultati ottenuti sono riassunti nella Tabella 2.

Anche in questo caso la perdita di peso nei diversi campioni non è costante. Infine si è valutata la variazione del pH della soluzione contenente LARGAL Ultra ottenendo i risultati indicati nella Tabella 3.

Dalla tabella si nota che il pH decresce con il passare del tempo e con l'attività chelante della soluzione virando verso un'acidità relativa.

I risultati ottenuti dai campioni contenenti la soluzione di RC-PREP hanno dato i valori contenuti nella Tabella 4.

Dalla tabella si nota che la quantità di calcio che risulta essere chelato dall'RC-PREP è

minima.

Per quanto riguarda la variazione di peso subita dalla sostanza dentale dopo il trattamento con la soluzione di RC-PREP si sono ottenuti i risultati riassunti nella Tabella 5.

È evidente che in questo caso la variazione di peso è minima specie per i primi due campioni per i quali la bilancia, con sensibilità al centesimo di grammo non è riuscita a visualizzare nessuna variazione di peso.

Così come abbiamo fatto per il LARGAL Ultra anche per l'RC-PREP si è determinata la variazione di pH conseguente al suo utilizzo e abbiamo raccolto i dati ottenuti nella Tabella 6.

Abbiamo constatato che anche in questo caso così come nell'effetto chelante e nella variazione di peso del materiale non ci sono state delle variazioni importanti. Infatti il primo campione è l'unico che differisce in pH dagli altri i quali si stabilizzano ad un pH leggermente inferiore mantenendolo costante nel tempo.

DISCUSSIONE

Dalle analisi chimiche si deduce che l'efficacia nel rimuovere lo strato di smear layer da parte del LARGAL Ultra è di gran lunga

Tab. 2

Campione	Peso	
	Pre (g)	Post (g)
1	5,00	4,86
2	5,00	4,80
3	5,00	4,75
4	5,00	4,72

Tab. 3

Campione	pH
1	7,50
2	7,30
3	7,25
4	7,00

Tab. 5

Campione	Peso	
	Pre (g)	Post (g)
1	5,00	5,00
2	5,00	5,00
3	5,00	4,99
4	5,00	4,96

Tab. 4

Campione	Concentrazione di Ca (mg/l)
1	35,3
2	82,3
3	117,6
4	206,0

Tab. 6

Campione	pH
1	3,9
2	3,7
3	3,7
4	3,7

maggiore di quella dell'RC-PREP come è evidenziato nella Tabella 7.

(Il primo valore si riferisce al LARGAL Ultra; il secondo valore al RC-PREP).

Le differenze dei valori ottenuti e quindi del diverso comportamento clinico delle due soluzioni sono a nostro avviso da imputare alla diversa composizione dei due prodotti, al tempo d'azione, al rapporto interfaccia/EDTA nonché al diverso pH a cui queste soluzioni agiscono. Infatti il LARGAL Ultra è costituito da EDTA e Cetrimide; quest'ultimo ha un'azione diretta nei confronti della matrice organica della struttura dentale per cui permette un contatto diretto dell'EDTA con la sostanza inorganica. Ciò non si verifica per l'RC-PREP il quale risulta costituito da EDTA e perossido di urea. Infatti in questo caso si ha la formazione sulla superficie del canale radicolare di una trama tridimensionale di materiale organico che impedisce il contatto diretto dell'EDTA con la sostanza calcificata. Un fattore tra i più

importanti, è il pH al quale questi materiali agiscono. Infatti il pH di partenza delle due soluzioni è diverso, precisamente di 3,9 per l'RC-PREP mentre per il LARGAL Ultra è di 7,5. Il fatto che RC-PREP lavori a questo pH comporta che la sostanza tenda a formare complessi acido-base e a salificare per cui la sua azione chelante è scarsa. Inoltre il sale che ne deriva il più delle volte si deposita sulla superficie canalare rendendola non perfettamente pulita. Invece il pH al quale agisce il LARGAL Ultra sembra essere quello ottimale. Infatti presenta un'ottima azione chelante senza che vi sia formazione di sali.

CONCLUSIONI

L'uso dei chelanti in Endodonzia è una pratica terapeutica che a nostro avviso possiede notevoli vantaggi:

■ permette l'alesatura dei canali atresici o con formazioni calcifiche che rendono il canale tortuoso e filiforme;

■ a fine strumentazione si ottengono pareti canalari prive di detriti e quindi più facilmente sigillabili da parte dei materiali endodontici utilizzati nelle otturazioni radicolari;

■ i materiali utilizzati nelle ricostruzioni a perno dei denti trattati endodonticamente, come i cementi di fissazione, aderiscono in modo corretto alle pareti canalari;

■ permette ai materiali medicamentosi messi all'interno dei canali di giungere anche a livello dei tubuli dentinali e quindi esplicare una funzione più completa.

Da quanto osservato si può concludere che l'EDTA per agire al massimo delle sue potenzialità dovrebbe essere associato ad un'altra sostanza che abbia effetto sulla componente organica della struttura dentinale. Inoltre si è visto che il pH ottimale è quello di 7-8 in quanto in questo range l'azione chelante da parte dell'EDTA è massima. Infine se ne consiglia l'uso in associazione con la tecnica Crown-Down dove si effettua una svasatura in direzione corono-apicale per cui si viene a formare una specie di serbatoio che rifornisce di soluzione le zone più apicali.

Tab. 7

Campioni	Conc. calcio (mg/l)	Peso	pH
1	3500; 35,3	4,86; 5,00	7,50; 3,9
2	5000; 82,3	4,80; 5,00	7,30; 3,7
3	8960; 117,6	4,75; 4,99	7,25; 3,7
4	10680; 206,0	4,72; 4,96	7,00; 3,7

BIBLIOGRAFIA

1 - Pashley DH, Michelich V, Kehl T. Dentin permeability: effect of smear layer removal. *J Prosthet Dent* 1981; 46: 531-7
 2 - Mc Comb D, Smith DC. A preliminary scanning electron microscope study of root canals after endodontic procedures. *J Endodon* 1975; 1: 238-42
 3 - Mader LL, Baumgarten JC, Peters DD. A scanning electron microscopic investigation of the smear layer on root canal walls. *J Endodon* 1984; 10: 477-83
 4 - Goldman M, Devitre R, Pier M. Effect of the dentin smeared layer on tensile strenght of cemented post. *Prosthet Dent* 1984; 52: 485-8
 5 - Cantatore G. Struttura dentinale e procedure endodontiche. *Dent Cadmos* 1995; 2: 13-45
 6 - Williams S, Goldman M. Penetrability of the smeared layer by a strain of *Proteus Vulgaris*. *J Endodon* 1985; 11: 385-8
 7 - Dippel H, Hoppenbrouwers PMM, Borggreven J. Influence of the smear layer and intermediary base materials on the permeability of dentin. *J Den Res* 1981; 60: 1211-5
 8 - Dippel H, Borggreven J, Hoppenbrouwers PMM. Morphology and per-

meability of the dentin smear layer. *J Prosthet Dent* 1984; 52: 657-62
 9 - Hoppenbrouwers PMM, Driessens FC, Stadthouders AM. Morphology, composition and wetting of dentinal cavity walls. *J Dent Res* 1974; 53: 1255-62
 10 - Akpata ES, Blechman H. Bacterial invasion of pulpar dentin wall in vitro. *J Dent Res* 1982; 61: 435-8
 11 - Brannstrom M, Nyborg H. Bacterial growth and pulpar changes under inlays cemented with zinc phosphate and epoxy-late CBA 9080. *J Prosthet Dent* 1974; 31: 556-65
 12 - Nissan R, Sehail H, Pashley DH, Trowbridge H. Ability of bacterial endotoxin to permeate human dentin. *J Dent Res* 1993; 92, (Abstr # 186): 127
 13 - Martignoni M et al. Il perno moncone passivo. *Att Dent* 1990; 38: 9-17
 14 - Pashley DH. Dentin bonding: overview of the substrate with respect to adhesive material. *J Esthet Dent Res* 1987; 95: 87-91
 15 - Abbot PC, Hume WR, Heithersay GS. Barriers to diffusion of Ledermix paste in radicular dentin. *Int Endod J* 1989; 5: 98-104

16 - Foster KH, Kulild JC, Weller RN. Effect of smear layer diffusion of calcium hydroxide through radicular dentin. *J Endodon* 1993; 19: 136-40
 17 - Cury JA, Bragotto C, Valdrighi L. The demineralizing efficiency of EDTA solutions on dentin. *Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol* 1981; 52: 446-8
 18 - Zeev Ram, Rehovot Israel. Chelation in root canal therapy. *Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol* 1980; 49: 64-74
 19 - Seidberg BH, Schilder H. An evaluation of EDTA in endodontics. *Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol* 1974; 37: 609-20
 20 - Aktener BO, Bikay U. Smear layer removal with different concentrations of EDTA-ethylenediamine mixtures. *J Endodon* 1993; 19: 228-31
 21 - Östby BN. Chelation in root canal therapy. Ethylenediamine tetra-acetic acid for cleaning and widening of root canals. *Odontol Tidskr* 1957; 65: 3-11
 22 - Masillamoni CMR, Kettering J, Torabinejad M. The biocompatibility of some root canal medicaments and irritant. *J Endodon* 1981; 14: 151-8