

Descalcificación de dentina radicular: comparación de dos métodos para su determinación

Gabriela Lucía López^{1,2*}, María Luisa de la Casa^{1,2}, María del Milagro Sáez²,
María Elena López¹

¹Cátedra de Química Biológica.

²Cátedra de Endodoncia.

Facultad de Odontología. Universidad Nacional de Tucumán. Tucumán. Argentina
gabrielalopez@gmail.com, mariae.lopez@odontologia.unt.edu.ar -
mldelacasa@tucbbs.com.ar - milagrosaez@hotmail.com

Resumen

Introducción: Dado que los irrigantes endodónticos producirían la descalcificación de la dentina radicular, resulta significativo adecuar los métodos para cuantificar tal descalcificación. **Objetivo:** Comparar los métodos de espectrometría de absorción atómica y colorimétrico en la determinación del calcio procedente de la dentina radicular humana. **Metodología:** 18 segmentos de dentina del tercio medio radicular de premolares inferiores permanecieron en contacto a 37°C con 1 ml de: agua destilada (control), hipoclorito de sodio 1%; EDTA 17% y ácido cítrico 1%, utilizadas solas 5 minutos o en forma sucesiva durante ese mismo tiempo total. Se determinó calcio en las soluciones por espectrometría de absorción atómica y por el método colorimétrico de cresoftaleín complexona-calcio. Se compararon estadísticamente los resultados utilizando el Test T para muestras homogéneas. Se expresó cada valor como mg/l/g de tejido. **Resultados:** Al comparar el contenido en iones calcio determinados por ambos métodos no hubo diferencias estadísticas entre los mismos. **Conclusión:** La eliminación de los iones calcio de la dentina radicular por acción de las soluciones estudiadas podría ser igualmente determinada tanto por colorimetría como por absorción atómica; excepto en el caso de la solución de EDTA, que sólo puede cuantificarse por el método de absorción atómica.

Palabras clave: dentina radicular humana, iones calcio, espectrometría de absorción atómica, método colorimétrico.

* Autor para correspondencia: Av. Benjamín Aráoz 800 (4000)-San Miguel de Tucumán-Argentina.
Fax N°: 54-381-4227589. Teléfono N°: 54-381-4311395. Teléfono Particular N°: 54-381-4249490.

Decalcification of root dentine: comparison of two methods for its determination

Abstract

Introduction: Given that different substances used as irrigants in an endodontic treatment would produce decalcification on the root dentine, it is important to quantify this effect. **Objective:** To compare the atomic absorption spectrometry and colorimetric methods for determining calcium ions from human root dentin. **Methodology:** 18 human dentine segments extracted from the middle third root of inferior premolars were immersed at 37°C in 1 ml of the following solutions: distilled water (control), 1% sodium hypochlorite, 17% EDTA and 1% citric acid, utilized alone for 5 minutes or successively for the same total time. 12 of them stayed in a single solution for 5 minutes and the others 6 were placed consecutively in EDTA or citric acid and sodium hypochlorite for the same total time. Calcium ions were determined in the solutions using atomic absorption spectrometry and the colorimetric method. Results were analyzed using the T Test for homogenous samples. Each value was expressed as mg/1/g of dentinal tissue. **Results:** There were no statistical differences when comparing the methods for determining calcium ions ($p \geq 0.05$). **Conclusions:** The elimination of calcium ions from root dentin by action of the solutions studied could be determined by both colorimetric or atomic absorption spectrometer methods, except in the case of the EDTA solution, which could only be quantified using the atomic absorption spectrometer.

Key words: human radicular dentin, calcium ions, atomic absorption spectrometry, colorimetric method.

Introducción

Los iones calcio (Ca^{+2}) presentes en los cristales de hidroxiapatita son uno de los principales componentes inorgánicos de la dentina¹. Algunas sustancias utilizadas como irrigantes durante el tratamiento de conducto serían capaces de producir alteraciones en la composición química de la misma²⁻⁴. Cualquier cambio en la concentración de Ca^{+2} alteraría la proporción original de los componentes orgánicos e inorgánicos, afectando las propiedades físicas de la dentina, como la microdureza, rugosidad, humectancia permeabilidad y solubilidad^{5,6}. Además, debido a que la adhesión a dentina depende de la presencia de

Ca^{+2} , la desmineralización de la misma afectaría la capacidad de sellado de algunos cementos a base de resina⁷.

Las soluciones de EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), utilizadas en una concentración de 15-17% pH 7-8 y AC (ácido cítrico) 1-50% pH 0,8-1,9 actúan principalmente sobre el componente inorgánico de la dentina, por su acción quelante y desmineralizante. El AC actúa como tal por su bajo pH. Ambos agentes químicos presentan en sus extremos radicales libres que actúan formando complejos con Ca^{+2} por enlaces coordinados originando quelatos solubles de calcio.

La solución de hipoclorito de sodio (ClONa) 0,5-5,25% pH 11,9, es ampliamente

utilizada en Endodoncia debido a su poder antimicrobiano y solvente de tejido pulpar. Actúa principalmente sobre el componente orgánico de la dentina.

Un régimen efectivo de irrigación debería combinar sustancias que actúen sobre el componente orgánico e inorgánico de la dentina para obtener así una mejor limpieza y conformación de los conductos radiculares^{8,9}. El uso de una sustancia quelante seguida por ClONa ha tenido gran aceptación¹⁰.

El ión Ca^{+2} puede ser determinado por muy variados métodos, difiriendo entre ellos por su sensibilidad y disponibilidad. Así, la sensibilidad del método de espectrometría de absorción atómica es muy superior a la del método colorimétrico pero su disponibilidad es menor y los costos de su utilización son más elevados. La espectrofotometría de absorción atómica, además, permite hacer determinaciones de iones calcio para soluciones de EDTA, lo cual no es posible al utilizar el método colorimétrico.

En trabajos realizados anteriormente por nuestro grupo de estudio se determinaron iones Ca^{+2} y fosfatos por método colorimétrico empleando distintas pastas y soluciones de irrigación usadas frecuentemente en Endodoncia^{11,12}. También se determinaron proteínas por método de espectrofotometría (Método de Lowry) tanto en tejido pulpar como dentinario¹³.

El objetivo de este trabajo fue comparar los métodos de espectrometría de absorción atómica y colorimétrico en la determinación de iones calcio de soluciones de irrigación endodónticas después de haber permanecido en contacto con trozos de dentina radicular humana *in vitro*.

Materiales y métodos

Dientes y soluciones de irrigación. Se emplearon 3 dientes humanos premolares inferiores unirradiculares recientemente extraí-

dos, los cuales fueron almacenados en solución fisiológica a 4°C hasta su utilización. Se cortaron las coronas a nivel de la unión amelocementaria con fresa diamantada n° 2200 (KG Sorensen, SP, Brasil) con pieza de mano de alta rotación, utilizando abundante refrigeración. Luego se removió el cemento con curetas Gracey y se instrumentaron los conductos mediante técnica escalonada con lima maestra n° 50 (Maillefer, East Lansing, MI, EEUU), irrigando entre la utilización de cada lima con 2 ml de agua destilada. Se eliminaron los tercios coronario y apical de cada raíz. El tercio medio radicular fue cortado transversalmente en tres partes de aproximadamente 2 mm de espesor, y a su vez cada parte fue cortada longitudinalmente, resultando 6 segmentos por diente y totalizando 18 segmentos similares que se pesaron en una balanza analítica de precisión (Acculab, BA, Argentina). Se usaron secciones del mismo diente con las distintas soluciones de irrigación.

Se emplearon las soluciones Agua destilada (AD, control), Hipoclorito de sodio 1% (Stanton, Buenos Aires, Argentina), Ácido cítrico 1% (Timper, Buenos Aires, Argentina) y Ácido etilendiaminotetraacético 17% (Biopack, Buenos Aires, Argentina). Se empleó Agua destilada (AD) como control y las soluciones de Hipoclorito de sodio (ClONa) 1% (Stanton, BA, Argentina), Ácido cítrico (AC) 1% (Timper, BA, Argentina) y Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 17% (Biopack, BA, Argentina).

Un segmento de cada elemento dentario permaneció en contacto durante 5 minutos a 37°C en estufa (Dalvo BA, Argentina) con 1 ml de cada solución de irrigación (en total: 4 segmentos, uno para cada solución empleada), otro segmento se colocó 2,5 minutos en AC y 2,5 minutos en ClONa, y el restante, 2,5 minutos en EDTA y 2,5 minutos en ClONa. Este tratamiento se realizó por triplicado. Transcurri-

do el tiempo correspondiente, se removieron los segmentos de las soluciones.

Determinación por Absorción Atómica. Se trasvasaron cuantitativamente 750 µl de cada muestra a matraces de 5 ml y se les adicionaron 5 g/l de cloruro de potasio y 5 g/l de cloruro de lantano para eliminar interferencias, acidificando con ácido clorhídrico 1%. Luego se llevó a volumen final con agua desionizada. Para el trazado de la curva de calibración se analizó el blanco de cada solución de irrigación y las soluciones estándar de 1,5-2,5 y 5 mg/l preparadas a partir de una solución patrón de Ca 1000 mg/l (Certipur Merck trazables a NIST). Se empleó un espectrómetro de absorción atómica (PerkinElmer AAnalyst 100) con llama de acetileno. La lectura de las muestras se realizó a 422,7 nm de longitud de onda. Se expresó cada valor como mg/l/g de tejido dentinario.

Determinación por el Método Colorimétrico Directo (kit Wiener Lab, Rosario, Argentina). Se emplearon 50 µl de la solución

de cresoftaleín complexona 3,7 mmol/l y 3,5 ml de buffer aminometil propanol 0,2 mol/l en metanol 35% V/V, pH final 11. Se determinó si hubo desarrollo de color a 570 nm de longitud de onda. Se agregaron 20 µl de la solución estándar de Ca 10 mg/dl o 20 µl de las muestras. Se mezcló y se cuantificó el color magenta formado a 570 nm nuevamente a los 10 minutos. Se empleó un espectrofotómetro (PG Instruments, Wibtoft, Reino Unido).

Análisis estadístico. Los resultados fueron analizados utilizando el Test T para muestras homogéneas. Se expresó cada valor como mg/l/g de tejido dentinario. Se utilizó un nivel de significancia de $p < 0,05$.

Resultados

En las Tablas 1 y 2 se detalla la concentración de Ca^{+2} (mg/l/g) en las distintas soluciones de irrigación endodónticas empleando el método colorimétrico en 2,5 minutos (Tabla 1) y 5 minutos (Tabla 2). Mientras que en las Ta-

Tabla 1. Determinación de iones calcio en ácido cítrico (AC) e hipoclorito de sodio (ClONa) durante 2,5 minutos de exposición por el método colorimétrico.

Solución	Tiempo (min)	Calcio (mg/L/g) ($x \pm D.S.$)	Categorías*	
AC 1%	2,5	1184,06 ± 319	a	b
ClONa 1%	2,5	353,00 ± 94	a	
AC 1% + ClONa 1%	5	1537,06 ± 408	a	b

*Las categorías indican el grado de similitud entre las soluciones analizadas. Distintas letras indican diferencia significativa ($p > 0,05$); iguales letras indican ausencia de diferencia significativa ($p < 0,05$).

Tabla 2. Determinación de iones calcio en agua destilada (AD), hipoclorito de sodio (ClONa) y ácido cítrico (AC) durante 5 minutos de exposición por el método colorimétrico.

Solución	Tiempo (min)	Calcio (mg/l/gr) ($x \pm D.S.$)	Categorías*	
AD	5	185,32 ± 37	a	
ClONa 1%	5	177,22 ± 47	a	
AC 1%	5	2130,62 ± 1404		B

*Las categorías indican el grado de similitud entre las soluciones analizadas. Distintas letras indican diferencia significativa ($p > 0,05$); iguales letras indican ausencia de diferencia significativa ($p < 0,05$).

Tabla 3. Determinación de iones calcio en ácido cítrico (AC), hipoclorito de sodio (CIONa) y EDTA durante 2,5 minutos de exposición por el método de espectrometría de absorción atómica.

Solución	Tiempo (min)	Media (mg/L/gr) (x±D.S)	Categorías*	
AC 1%	2,5	1426,63 ± 281		c
CIONa 1%	2,5	330,98 ± 127	A	b
AC 1% + CIONa 1%	2,5 + 2,5	1758,16 ± 307		c
EDTA 17%	2,5	1532 ± 979		c
CIONa 1%	2,5	440,84 ± 328	A	b
EDTA 17% + CIONa 1%	2,5 + 2,5	1972,84 ± 764		c

*Las categorías indican el grado de similitud entre las soluciones analizadas. Distintas letras indican diferencia significativa (p>0,05); iguales letras indican ausencia de diferencia significativa (p<0,05).

Tabla 4. Determinación de iones calcio en agua destilada (AD), hipoclorito de sodio (CIONa), ácido cítrico (AC) y EDTA durante 5 minutos de exposición por el método de espectrometría de absorción atómica.

Solución	Tiempo (min)	Calcio (mg/l/gr) (x±D.S.)	Categorías*	
AD	5	96,73 ± 7	a	
CIONa 1%	5	191,09 ± 6	a	
AC 1%	5	2542,93 ± 154		C
EDTA 17%	5	1872,14 ± 98		C

*Las categorías indican el grado de similitud entre las soluciones analizadas. Distintas letras indican diferencia significativa (p>0,05); iguales letras indican ausencia de diferencia significativa (p<0,05).

blas número 3 y 4 se muestra los valores de Ca²⁺ obtenidos en los distintos períodos de tiempo empleados al utilizar el método de espectrofotometría de absorción atómica.

En la Figura 1 se compara el contenido en Ca²⁺, determinado por los métodos colorimétrico y espectrometría de absorción atómica, de las soluciones de irrigación después de haber permanecido en contacto con las secciones de dentina radicular humana durante 2,5 minutos. Igual experiencia se repitió después de un tiempo de exposición de 5 minutos, resultados representados en la Figura 2. No hubo diferencias estadísticas entre ambas determinaciones para AD, CIONa

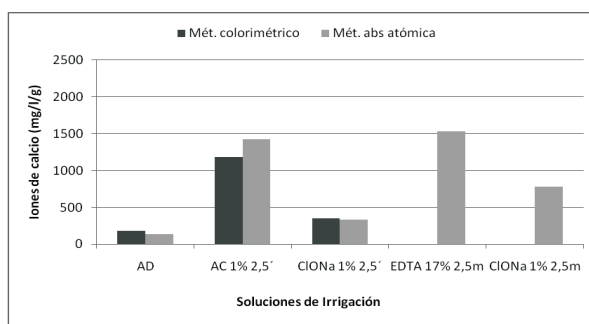


Figura 1. Determinación de iones calcio (mg/l/gr) por el método colorimétrico y de espectrometría de absorción atómica de dentina humana por agua destilada (AD), hipoclorito de sodio (CIONa), ácido cítrico (AC) y EDTA durante 2,5 minutos de exposición.

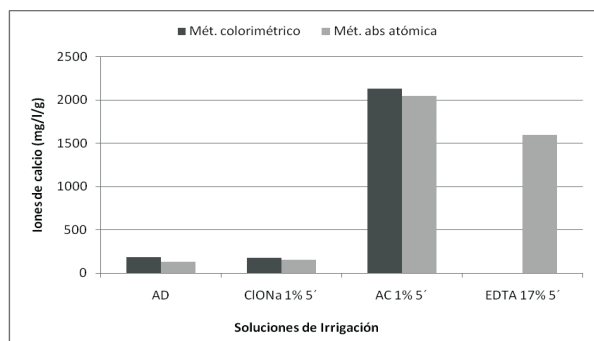


Figura 2. Determinación de iones calcio (mg/l/g) por el método colorimétrico y de espectrometría de absorción atómica extraídos de dentina humana por agua destilada (AD), hipoclorito de sodio (ClONa), ácido cítrico (AC) y EDTA durante 5 minutos de exposición.

1% 2,5 minutos y 5 minutos y AC 1% a 2,5 minutos y 5 minutos de contacto.

Por espectrometría de absorción atómica se determinó el contenido en iones Ca^{+2} en la solución de EDTA que estuvo en contacto con trozos de dentina radicular. Los valores obtenidos fueron 1532 mg/l/g a 2,5 minutos y 1872,14 mg/l/g a 5 minutos. Por el método colorimétrico empleado no se puede determinar el ión Ca^{+2} ya que el mismo permanece quelado con EDTA.

Discusión

El ClONa es un agente oxidante no específico, que actúa fragmentando largas cadenas peptídicas y clorando grupos proteicos terminales, resultando N-cloraminas, que son fácilmente descompuestas en fragmentos más pequeños¹⁴. A pesar de su uso terapéutico comprobado como potente germicida y efectivo solvente de tejido orgánico, el ClONa podría alterar las propiedades mecánicas de la dentina. Una exposición de ClONa en más de 3% por una hora redujo significativamente el módulo de elasticidad y la fuerza flexural de dentina humana, lo cual contribuiría al debilitamiento de dientes tratados endodónticamente

te^{15,16}. En cambio el ClONa usado a una concentración de 1% durante 1 hora no modificó dichas propiedades¹⁷. Esto resulta importante dado que las fracturas verticales de raíces están entre las causas más frecuentes de extracción de dientes tratados endodónticamente¹⁸. La acción de la solución de ClONa sobre el Ca^{+2} fue demostrada por numerosos autores^{3,19,20}. Cambios en la recrystalización de la hidroxiapatita después del uso de ClONa²¹ serían responsables de la reducción de Ca^{+2} y fosfatos en la dentina³. El ClONa además de eliminar inhibidores de la mineralización, aumenta la porosidad de la dentina residual²². Zehnder, 2006⁹, considera que al aumentar la concentración de ClONa, aumenta su poder bactericida y disolvente de tejido pulpar, pero así también la irritación producida sobre los tejidos periapicales. Él concluyó que el ClONa usado en una concentración de 1% es suficiente para producir los efectos antibacteriano y de disolución de tejido pulpar durante un tratamiento de endodoncia.

La solución de EDTA constituye un agente eficiente en remover proteínas no colágenas solubles en agua. Ésta no sólo actúa descalcificando la dentina por su acción quelante, sino que además el Ca^{+2} es removido asociado a las proteínas extraídas²³. El Ca^{+2} extraído por el AC podría también ligarse a proteínas no colágenas. Diversos estudios demostraron que EDTA usado solo o combinado con ClONa redujo el contenido de Ca^{+2} de la dentina significativamente^{3,4}.

Las soluciones de AC usadas en altas concentraciones (25-50%) resultaron más efectivas en la eliminación de Ca^{+2} de la dentina con respecto a las de EDTA²⁴. Sin embargo, AC 1% demostró ser igualmente efectivo en la eliminación de detritus²⁵. Además por su pH ácido podría producir irritación en los tejidos periapicales²⁶. En un trabajo realizado previamente determinamos que la descalcificación producida

por AC 1% y EDTA 17% a 2,5 ó 5 minutos resultó similar para ambas soluciones.

En un estudio realizado anteriormente por nuestro equipo de trabajo se demostró que la microdureza de la dentina está directamente relacionada a su contenido en minerales más que al componente orgánico de la misma²⁷. Por esto resulta de suma importancia la acción de las soluciones utilizadas comúnmente en Endodoncia sobre el componente inorgánico de la dentina.

Numerosos autores determinaron que la concentración de las soluciones empleadas y el tiempo de exposición están directamente relacionados a la descalcificación producida^{9,15,16,19}. Machado-Silveiro y col.²⁴ evaluaron el efecto descalcificante del ácido cítrico al 10%; éste se duplicó con respecto a una concentración de 1% a iguales tiempos de exposición. Cem Sayim y col.²⁰, demostraron que la descalcificación de la dentina radicular producidas por ClONa aumenta al aumentar las concentraciones y los tiempos de exposición empleados.

Calt y Serper²⁸ evaluaron el efecto de EDTA en la remoción del barro dentinario y en la integridad de la dentina. A los 10 minutos de aplicación, EDTA causó excesiva erosión peri e intertubular. Es por esto que en este trabajo se emplearon bajas concentraciones y mínimos tiempos de exposición. Los necesarios y suficientes para producir el efecto deseado por cada solución empleada intentando alterar lo mínimo posible la dentina subyacente.

La solución de EDTA no fue tenida en cuenta para el análisis estadístico debido a que

sólo puede determinarse el contenido en Ca^{+2} por el método de espectrometría de absorción atómica.

Conclusiones

La eliminación de Ca^{+2} de la dentina por parte de AD, ClONa 1% y AC 1% resultó similar a 2,5 minutos y 5 minutos de contacto al comparar los métodos colorimétrico y espectrometría de absorción atómica.

Los resultados evidenciados en este trabajo deberían ser tenidos en cuenta para estudios posteriores por la diferencia de complejidad entre ambos procedimientos. El método colorimétrico es una técnica menos compleja y de costo económico notablemente menor respecto de la espectrometría de absorción atómica. Sin embargo presenta limitaciones para determinar Ca^{+2} en soluciones de EDTA para lo cual se requiere la aplicación del método de espectrometría de absorción atómica.

Agradecimientos

Este estudio fue parcialmente subsidiado por CIUNT (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de la Universidad Nacional de Tucumán). Los autores desean agradecer a la Bioquímica María Mercedes Salas por la asistencia brindada en el Laboratorio de la Cátedra de Química Biológica de la Universidad Nacional de Tucumán y al Ingeniero Alberto Marcial Manlla por su colaboración en el análisis estadístico de datos.

Referencias

1. Marshall GW. Dentin: microstructure and characterization. *Quintessence Int* 1993; 24:606-17.
2. Mishra L, Kumar M, Subba Rao CV. Calcium loss from root canal dentin following EDTA and Tetracycline HCl Treatment with or without subsequent NaOCl irrigation and evaluation of microhardness of dentine. *JOART* 2012; 1(2):1-6.

3. Ari H, Erdemir A. Effects of endodontics irrigation solutions on mineral content of root canal dentine using ICP-AES technique. *J Endod* 2005; 31:187-9.
4. Dogan H, Çalt S. Effects of chelating agents and sodium hypochlorite on mineral content of root dentin. *J Endod* 2001; 27:578-80.
5. Hu X, Ling J, Gao Y. Effect of irrigation solutions on dentin wettability and roughness. *J Endod* 2010; 36:1064-7.
6. Zhang K, Kim YK, Cadenaro M, Bryan TE, Sidow SJ, Loushine RJ y col Effects of different exposure times and concentrations of sodium hypochlorite/ethylenediaminetetraacetic acid on the structural integrity of mineralized dentin. *J Endod* 2010; 36:105-9.
7. García Godoy F, Loushine RJ, Itthagarun A, Weller RN, Murray PE, Feilzer AJ et al. Application of biologically-oriented dentin bonding principles to the use of endodontic irrigants. *Am J Dent* 2005; 18:281-90.
8. Zehnder M, Schmidlin P, Sener B, Waltimo T. Chelation in root canal therapy reconsidered. *J Endod* 2005; 31:817-20.
9. Zehnder M. Root canals irrigants. *J Endod*. 2006; 32:389-98.
10. Torabinejad M, Handysides R, Khademi A, Bakland L. Clinical implications of the smear layer in endodontics: a review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002; 94:658-66.
11. Pacios MG, de la Casa ML, Bulacio MA, López ME. Calcium hydroxide associated to different vehicles: *in vitro* action on some chemical dentinal components. *Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol, Oral Radiol Endod* 2003; 95:348-54.
12. Pacios MG, Lagarrigue G, López ME, Nieva N. Ca(OH)₂ pastes on microhardness and action on the surface of root dentin. [Abstract] *Biocell* 2006; 30:115.
13. de la Casa ML, Salas MM, López ME, Radien G. Protein content in irrigating solutions in contact with pulp tissue. *Acta Odontol Latinoam* 2008; 21:65-8.
14. Sim T, Knowles J, Ng Y, Gulabivala K. Effect of sodium hypochlorite on mechanical properties of dentine and tooth surface strain. *Int Endod J* 2001; 34:120-32.
15. Grigoratos D, Knowles J, Ng YL, Gulabivala K. Effect of exposing dentine to sodium hypochlorite and calcium hydroxide on its flexural strength and elastic modulus. *Int Endod J* 2001; 34:113-9.
16. Marending M, Paqué F, Fischer J, Zehnder M. Impact of irrigant sequence on mechanical properties on human root dentine. *J Endod* 2007; 33:1325-8.
17. Vire D. Failure on endodontically treated teeth: classification and evaluation. *J Endod* 1991; 17:338-42.
18. Caplan D, Weintraub J. Factors related to loss of root canal filled teeth. *J Public Health Dent* 1997; 57: 31-9.
19. Perez Heredia M, Ferrer-Luque CM, González-Rodríguez MP, Marín-Peinado FJ, González-López S. Decalcifying effect of 15% EDTA, 15% citric acid, 5% phosphoric acid and 2.5% sodium hypochlorite on root canal dentine. *Int Endod J* 2008; 41:418-23.
20. Sayin TC, Cehreli ZC, Deniz D, Akcay A, Tuncel B, Dagli F y col. Time-dependent decalcifying effects of endodontic irrigants with antibacterial properties. *J Endod* 2009; 35:280-3.
21. Perdigao J, Lopes M, Geraldeli S, Lopes GC, Gacia-Godoy F. Effect of sodium hypochlorite gel on dentin bonding. *Dent Mater* 2000; 16:311-23.
22. Inaba D, Ruben J, Takagi O, Arends J. Effect of sodium hypochlorite treatment on remineralization of human root dentine *in vitro*. *Caries Res* 1996; 30:218-24.

23. Verdelis K, Eliades G, Oviir T, Margelos J. Effect of chelating agents on the molecular composition and extent of decalcification at cervical, middle and apical dentin locations. *Endod Dent Traumatol* 1999; 15:164-70.
24. Machado-Silveiro LF, González-López S, González-Rodríguez MP, Decalcification of root canal dentine by citric acid, EDTA and sodium citrate. *Int Endod J* 2004; 37:365-9.
25. Brancini MR, Bramante CM, Berbet A. Poder de limpeza de algumas soluções irrigadoras analizadas pelo microscópio de barredura. *Rev Pau Endodon* 1983; 4:116-23.
26. Garberoglio R, Becce R. Smear layer removal by root Canals irrigants. A comparative scanning electron microscopic study. *Oral Surg Oral Med Oral Path* 1994; 78:359-67.
27. López GL, Pacios MG, de la Casa ML, Salas MM, López ME. Evaluation of the effect of irrigating solutions on the microhardness and the organic and inorganic content of radicular dentine *J Dent Res* (abstract). 2009. <http://iadr.confex.com/iadr/search.epl>
28. Calt S, Serper A. Time-dependent effects of EDTA on dentin structures. *J Endod* 2002; 28:17-9.