



UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS  
ÁREA QUÍMICA  
DEPARTAMENTO DE ODONTOLÓGÍA CONSERVADORA  
ÁREA ENDODONCIA

**EFFECTIVIDAD DEL AGUA DESTILADA USADA COMO IRRIGANTE  
INTERMEDIO ENTRE HIPOCLORITO DE SODIO 5% Y CLORHEXIDINA 2%  
PARA PREVENIR LA FORMACIÓN DE PARACLOROANILINA DENTRO DEL  
SISTEMA DE CANALES RADICULARES, ESTUDIO *EX VIVO***

**Gabriela Quiroz Dickson**

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN  
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE  
CIRUJANO DENTISTA

**TUTOR PRINCIPAL**

**Prof. Ismael Yévenes López**

**TUTORES ASOCIADOS**

**Dra. Alejandra Fuenzalida Muñoz**

**Dr. Mauricio Ruiz Nolf**

Adscrito a Proyecto FIOUCH 13-015

Santiago – Chile

2015





UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS  
ÁREA QUÍMICA  
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGÍA CONSERVADORA  
ÁREA ENDODONCIA

**EFFECTIVIDAD DEL AGUA DESTILADA USADA COMO IRRIGANTE  
INTERMEDIO ENTRE HIPOCLORITO DE SODIO 5% Y CLORHEXIDINA 2%  
PARA PREVENIR LA FORMACIÓN DE PARACLOROANILINA DENTRO DEL  
SISTEMA DE CANALES RADICULARES, ESTUDIO *EX VIVO***

**Gabriela Quiroz Dickson**

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN  
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE  
CIRUJANO DENTISTA

**TUTOR PRINCIPAL**

**Prof. Ismael Yévenes López**

**TUTORES ASOCIADOS**

**Dra. Alejandra Fuenzalida Muñoz**

**Dr. Mauricio Ruiz Nolf**

Adscrito a Proyecto FIOUCH 13-015

Santiago – Chile

2015

## AGRADECIMIENTOS

*Al llegar al término de esta importante etapa en mi vida, quisiera agradecer a todas aquellas personas, que de alguna u otra forma me acompañaron durante estos años:*

*A mis padres, Katerine y Luis, por todo el amor que me entregan día a día, por su preocupación constante en mi bienestar, por su apoyo incondicional en cada decisión que he tomado y por permitirme con su esfuerzo cumplir mis sueños.*

*A mis amigas y amigos de la Universidad, que sin pensarlo, se convirtieron en un pilar fundamental durante estos seis años de carrera. Muchas gracias por todas las experiencias que vivimos (y que espero continúen), por compartir conmigo los buenos y los malos momentos y por acompañarme y apoyarme siempre que lo necesité.*

*A la Pelu, por toda la ayuda y trabajo dedicado en la realización de esta tesis. Por todo el apoyo, la paciencia y la confianza. Por ser una gran amiga y compañera de trabajo. Gracias por compartir conmigo el día a día durante todo este año.*

*A mis amigos de la vida, los de siempre y los que he conocido durante este último tiempo, gracias por escucharme, animarme y alentarme a perseverar y confiar en mí.*

*A mis tutores, Prof. Ismael Yévenes, Dra. Alejandra Fuenzalida y Dr. Mauricio Ruiz, por su guía, ayuda y excelente disposición durante toda la realización de esta tesis.*

# ÍNDICE

<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
<b>LISTA DE ABREVIACIONES.....</b>	<b>I</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>II</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>4</b>
Hipoclorito de Sodio (NaClO).....	4
Acido Etilendiaminotetraacético (EDTA).....	6
Clorhexidina (CHX).....	6
Interacción entre Irrigantes.....	8
Asociación NaClO y CHX.....	10
<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>14</b>
<b>OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>14</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>14</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>15</b>
1. Tipo de estudio.....	15
2. Materiales.....	15
3. Selección de la muestra.....	17
4. Obtención y almacenamiento de muestras.....	19
5. Tratamiento endodóntico y obtención de las muestras de las fases del tratamiento.....	19
6. Análisis de las muestras.....	23
a. Determinación de la concentración de NaClO, EDTA y CHX.....	23
b. Determinación del espectro de absorción y concentración de PCA.....	26
7. Análisis estadístico.....	28

<b>RESULTADOS</b> .....	29
1. Concentración NaClO, EDTA y CHX: .....	29
2. Concentración PCA .....	32
<b>DISCUSIÓN</b> .....	33
<b>CONCLUSIONES</b> .....	39
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	40
<b>ANEXOS</b> .....	46
Anexo 1: Protocolo de Irrigación .....	46
Anexo 2: Formulario de consentimiento informado .....	49
Anexo 3: Dispositivo para toma de muestras .....	51
Anexo 4: Procedimientos de laboratorio .....	52

**LISTA DE ABREVIACIONES**

<b>Abreviación</b>	<b>Significado</b>
<b>AC</b> .....	Ácido Cítrico
<b>CHX</b> .....	Clorhexidina
<b>Ca(OH)<sub>2</sub></b> .....	Hidróxido de Calcio
<b>EDTA</b> .....	Ácido Etilendiaminotetraacético
<b>IRR</b> .....	Irrigación
<b>NaCl 0,9%</b> .....	Suero Fisiológico
<b>NaClO</b> .....	Hipoclorito de Sodio
<b>PCA</b> .....	Paracloroanilina
<b>PQM</b> .....	Preparación Químio-Mecánica
<b>SEM</b> .....	Microscopía Electrónica de Barrido
<b>SCR</b> .....	Sistema de canales radiculares
<b><math>\lambda_{\text{máx}}</math></b> .....	Lambda máximo

## RESUMEN

**Introducción:** Una irrigación óptima en Endodoncia se basa en el uso combinado de dos o más soluciones en una secuencia específica para obtener el éxito terapéutico. Sin embargo, la interacción de estos irrigantes al interior del canal radicular puede llevar a la formación de subproductos, como la Paracloroanilina (PCA), precipitado tóxico que se forma al interaccionar Hipoclorito de Sodio (NaClO) y Clorhexidina (CHX) y que puede ocluir los túbulos dentinarios comprometiendo el sellado de la obturación del canal radicular. El objetivo de este estudio es determinar *ex vivo* si la formación de PCA puede ser evitada usando agua destilada como irrigante intermedio entre NaClO 5% y CHX 2%.

**Metodología:** Se seleccionaron 30 dientes humanos unirradiculares sanos los cuales fueron divididos en un grupo control y uno experimental. A los dientes se les realizó un tratamiento endodóntico siguiendo el protocolo clínico de irrigación de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, usando suero fisiológico como irrigante intermedio en el grupo control y agua destilada en el grupo experimental, recolectando 13 muestras por diente correspondientes a las distintas fases del tratamiento. En estas muestras se determinó mediante espectrofotometría la concentración de NaClO, EDTA, CHX y PCA.

**Resultados:** Posterior al lavado del canal radicular con el irrigante intermedio y previo a la irrigación con CHX 2% se detectó NaClO residual en una concentración del 0,0029% en el grupo control y 0,0025% en el grupo experimental. Después de la irrigación con CHX 2% se midió una concentración de PCA de 0,00322% en el grupo control y 0,00252% en el grupo experimental. La diferencia en la concentración de PCA medida entre ambos grupos fue estadísticamente significativa.

**Conclusiones:** Se forma PCA al interior del canal radicular por la presencia de NaClO residual y CHX 2%. El uso de agua destilada como irrigante intermedio permite diluir el NaClO del canal radicular, sin embargo, esto no impide la formación de PCA. Se deben utilizar al menos 9 mL de agua destilada para diluir el NaClO 5% a tal punto que en contacto con CHX 2% se produzca la mínima cantidad de PCA.



## INTRODUCCIÓN

Las bacterias han sido reconocidas como el principal factor etiológico en el desarrollo de las patologías pulpares y periapicales. El objetivo del tratamiento endodóntico es eliminar, o al menos reducir, el número de microorganismos y eliminar el tejido pulpar inflamado o necrótico. Debido a la complejidad de la anatomía del sistema de canales radiculares (SCR), la instrumentación mecánica por sí sola es insuficiente para eliminar todos los tejidos infectados y bacterias presentes en istmos y ramificaciones, por lo que, asociado a la instrumentación, se hace necesario el uso de sustancias coadyuvantes como lo son los irrigantes (Zehnder, 2006).

La irrigación en endodoncia consiste en la introducción de una o más soluciones en el SCR con el fin de eliminar restos de tejido pulpar vital o necrótico, limalla dentinaria y microorganismos que pueden permanecer en el canal radicular aun después de una adecuada preparación biomecánica (Lasala, 1992).

Los objetivos de la irrigación del SCR en endodoncia se dividen en mecánicos, químicos y biológicos. Los mecánicos y químicos son:

1. Eliminar detritus
2. Lubricar el canal
3. Disolver tejidos orgánico e inorgánico
4. Prevenir la formación del barro dentinario durante la instrumentación o disolverlo una vez que se ha formado.

Los objetivos biológicos de los irrigantes están relacionados con su función antimicrobiana y son principalmente:

1. La eliminación de microorganismos anaeróbicos y facultativos en su estado libre y en biofilm.
2. Inactivación de endotoxinas.
3. No causar daños a los tejidos periapicales o reacciones anafilácticas en el individuo (Basrani y Haapasalo, 2012).

Las características y requisitos que debería cumplir un irrigante ideal en endodoncia se muestran en la Tabla 1.

**Tabla 1. Características del irrigante ideal (Basrani y Haapasalo, 2012)**

<ul style="list-style-type: none"> <li>• Efectivo germicida y fungicida.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• No irritante para los tejidos periapicales.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Estable en solución.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Efecto antimicrobiano prolongado y sostenido después de su uso.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Activo en la presencia de sangre, suero, y proteínas derivadas de los tejidos.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Capaz de eliminar completamente el barro dentinario.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Baja tensión superficial.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Capaz de desinfectar las dentina / túbulos dentinarios.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• No interfiere con la reparación de los tejidos periapicales.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• No pigmenta la estructura dentaria.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• No induce una respuesta inmune mediada por células. No es antigénico, tóxico ni carcinógeno para las células del tejido que rodea al diente.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• No tiene efectos adversos sobre las propiedades físicas de la dentina.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• No tiene efectos adversos en la capacidad de sellado de los materiales.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fácil de usar / aplicar.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bajo costo.</li> </ul>

Lamentablemente, no existe un solo irrigante que cumpla todas las funciones requeridas, por ello una irrigación óptima se basa en el uso combinado de dos o más sustancias usadas en una secuencia específica para obtener el éxito terapéutico (Haapasalo y cols., 2010).

Cuando se utiliza una combinación de irrigantes durante la terapia endodóntica, es posible que el primer irrigante utilizado no sea eliminado completamente del SCR antes de usar el siguiente. En consecuencia, éstos entran en contacto entre sí y pueden formar subproductos (Basrani y cols., 2007;

Rasimick y cols., 2008), como la Paracloroanilina (PCA), precipitado tóxico que se forma al interaccionar Hipoclorito de Sodio (NaClO) y Clorhexidina (CHX). Este precipitado puede ocluir los túbulos dentinarios interfiriendo en la limpieza y sellado del SCR, por lo que se hace imprescindible el uso de un irrigante intermedio para prevenir su formación (Gasic y cols., 2012; Mortenson y cols., 2012).

El protocolo de irrigación de la Clínica de Endodoncia de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile emplea suero fisiológico como irrigante intermedio entre NaClO al 5% y CHX al 2%. Sin embargo, un estudio *ex vivo* que evaluó el contenido residual de PCA aplicando este protocolo reveló que existe presencia de PCA en las últimas fases del tratamiento endodóntico (Alegre, 2015). Por lo tanto, el propósito de esta investigación es determinar si en un tratamiento endodóntico realizado con este protocolo de irrigación se puede evitar la formación de PCA usando agua destilada como irrigante intermedio entre NaClO 5% y CHX 2%.

## MARCO TEÓRICO

Se han utilizado diferentes sustancias como irrigantes en la terapia endodóntica, tales como el Hipoclorito de Sodio, Clorhexidina, Ácido Etilendiaminotetraacético, Ácido Cítrico, y soluciones de Ácido Fosfórico. A continuación se revisarán las características de los irrigantes más utilizados en la actualidad.

### Hipoclorito de Sodio (NaClO)

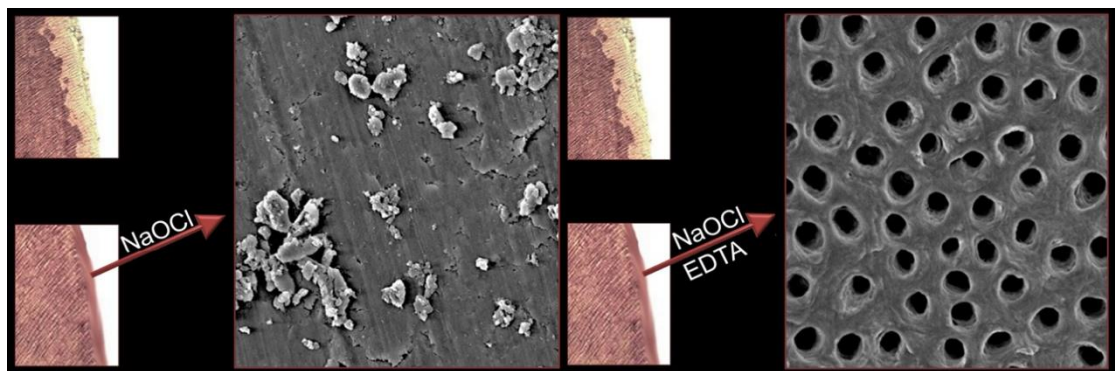
El Hipoclorito de Sodio (NaClO) es el compuesto halogenado más popular utilizado en endodoncia para la irrigación de los canales radiculares, desde principios del Siglo XX (Serper y cols., 2004). Su principal función es disolver restos de tejido pulpar, tanto vital como necrótico, además de ser un potente agente antibacteriano, con alto poder citotóxico (Mhera y cols., 2000).

Cuando el NaClO se disuelve en agua y está en contacto con materia orgánica, forma ácido hipocloroso (HClO). Este ácido actúa como solvente, liberando cloro, el que se combina con los grupos amino ( $\text{NH}_2$ ) de las proteínas formando cloraminas (reacción de cloraminación) que interfieren en el metabolismo celular. El cloro presenta acción antimicrobiana mediante la inhibición de enzimas bacterianas que conducen a la oxidación irreversible de grupos sulfhidrilo de las enzimas esenciales para las bacterias (Estrela y cols., 2006).

Al ser usado como irrigante, el NaClO se utiliza en concentraciones entre 0,5 y 6%. Existe controversia sobre el uso de diferentes concentraciones de NaClO durante el tratamiento endodóntico. Algunos estudios *in vitro* han demostrado que el NaClO al 5,25% es más efectivo contra *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans* (microorganismos comúnmente presentes en las infecciones endodónticas persistentes), que cuando es utilizado al 0,5%, 1%, 2,5% y 4% (Gomes y cols., 2001; Radcliffe y cols., 2004). En contraste, los estudios clínicos han indicado que el NaClO en altas y bajas concentraciones es igualmente eficaz

en la reducción de bacterias del SCR (Basrani y Haapasalo, 2012). En relación a su capacidad de disolución de los tejidos, esta es mejor cuando el NaClO se utiliza en una concentración del 5,25% (Hand y cols., 1978), pero en concentraciones del 1% y 2,5%, y utilizado en grandes volúmenes, puede ser igualmente efectivo (Siqueira y cols., 2000). En cuanto a la toxicidad del NaClO, esta es mayor cuando se emplea en altas concentraciones (Spangberg y cols., 1973); sin embargo, debido a la confinada anatomía del SCR, las concentraciones más altas han sido utilizadas con éxito durante el tratamiento endodóntico con una baja incidencia de accidentes. En general, si se van a utilizar bajas concentraciones para la irrigación intracanal, se recomienda que la solución se utilice en mayor volumen y en intervalos más frecuentes para compensar las limitaciones de las bajas concentraciones (Siqueira y cols., 2000). Por otro lado, la materia orgánica presente al interior del SCR consume el NaClO y debilita su efecto, lo que resulta en una disminución de su concentración y actividad local. Por lo tanto, la irrigación continua y el tiempo de exposición son factores importantes a considerar también para mantener la eficacia del NaClO (Haapasalo y cols., 2000).

El NaClO es el único irrigante usado en endodoncia que disuelve tejidos orgánicos vitales y necróticos. Aunque por sí solo no remueve el barro dentinario en su totalidad, sí puede eliminar la parte orgánica de éste y, al ser asociado con una irrigación posterior con EDTA o Ácido cítrico (AC) usado como irrigante final, previo a la medicación o la obturación del SCR, se puede conseguir la eliminación completa del barro dentinario dentro del canal radicular preparado (Fig. 1).



**Fig. 1. NaClO seguido de una irrigación final con EDTA elimina por completo el barro dentinario (Haapasalo y cols., 2012).**

### **Ácido Etilendiaminotetraacético (EDTA)**

El EDTA se sugiere como una solución irrigante debido a su acción quelante y la capacidad de remover la porción mineralizada del barro dentinario. Su importancia como agente quelante surge de su capacidad para "secuestrar" iones metálicos di- y tri- catiónicos tales como  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{Fe}^{+3}$  (Basrani y Haapasalo, 2012). Con la exposición directa durante un período prolongado de tiempo, el EDTA extrae las proteínas de la superficie bacteriana mediante la combinación con iones metálicos de la envoltura celular, lo que eventualmente puede conducir a la muerte de las bacterias. Además, puede desprender el biofilm adherido a las paredes del canal radicular.

El EDTA no puede eliminar el barro dentinario completamente; un agente proteolítico ( $\text{NaClO}$ ) debe ser utilizado en combinación con este quelante (preferiblemente antes del EDTA) para eliminar los componentes orgánicos de la capa de barro dentinario (Goldman y cols., 1976).

El EDTA se utiliza normalmente a una concentración que va del 10% al 17%. Elimina el barro dentinario en menos de 1 minuto si la solución alcanza la superficie de la pared del canal radicular. El proceso de descalcificación es auto-limitante porque el quelante se va agotando. Crumpton y cols. (2005), han demostrado que el volumen de irrigación no influye en la calidad de remoción del barro dentinario. En su estudio verificaron que utilizar 1 mL de EDTA al 17% por 1 minuto en contacto con las paredes del canal radicular, fue tan efectivo como utilizar 10 mL de esta solución.

### **Clorhexidina (CHX)**

La CHX es un agente antimicrobiano de amplio espectro, activo contra las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, y levaduras. Presenta varias aplicaciones en odontología; soluciones acuosas de CHX entre 0,1% y 0,2% son recomendadas para el control químico de la placa bacteriana en la cavidad oral, mientras que al 2% es utilizada como solución irrigante y medicación en endodoncia (Zehnder, 2006).

La CHX es una base fuerte y es más estable cuando se presenta como sal. La forma más común de presentación es el digluconato de clorhexidina, sal soluble en agua que a pH fisiológico se disocia rápidamente y libera el componente de la molécula de CHX cargado positivamente. Debido a su naturaleza catiónica, la CHX es capaz de unirse electrostáticamente a la superficie de la pared bacteriana cargada negativamente (Davis, 1973), dañando las capas externas de la pared celular y provocando una alteración en el equilibrio osmótico de la célula.

Dependiendo de su concentración, puede tener efecto bactericida o bacteriostático. A altas concentraciones, la CHX actúa como un detergente y al dañar la membrana celular causa la precipitación del citoplasma y por lo tanto, ejerce un efecto bactericida. A bajas concentraciones, la CHX es bacteriostática, causando que sustancias de bajo peso molecular como el potasio y el fósforo, salgan de la célula sin que ésta se vea dañada de forma irreversible.

Debido a la naturaleza catiónica que posee la molécula de CHX, ésta puede unirse a sustratos aniónicos como la mucosa oral, proteínas como la albumina, película salival del diente, dentina y otras glicoproteínas salivales (Basrani y Haapasalo, 2012). Esta reacción reversible, de absorción y liberación, le confiere a la CHX una actividad antimicrobiana residual, que se conoce como "sustantividad" (Khademi y cols., 2008) y que depende de su concentración. A bajas concentraciones (0,005-0,01%), se forma una monocapa estable de CHX sobre la superficie del diente, la cual puede cambiar las propiedades físicas y químicas de la superficie y puede prevenir o reducir la colonización bacteriana. A concentraciones más altas (>0,02%), se forma una multicapa de CHX, creando un reservorio de CHX, la cual puede ser liberada si disminuye la concentración de ésta en el ambiente (Basrani y Haapasalo, 2012). Los estudios de Rosenthal y cols. (2004) y Mohammadi y Abbott (2009), muestran que la sustentividad antibacteriana de la CHX tiene una duración de hasta 12 semanas en la dentina del SCR.

En endodoncia, la CHX se ha estudiado como irrigante y medicación intracanal. Se ha demostrado *in vitro* que la CHX al 2% utilizada como irrigante tiene una mejor eficacia antibacteriana que la CHX al 0,12%. Por lo tanto, la eficacia antibacteriana de la CHX depende de su concentración (Basrani y cols., 2003). Como medicación intracanal, se ha demostrado que, en canales radiculares infectados, la CHX reduce las bacterias tan eficazmente como el Hidróxido de Calcio ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ) cuando se aplica por 1 semana. Una revisión sistemática publicada el año 2009 concluyó que la CHX al 2% fue más efectiva que el  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  en eliminar al *Enterococcus faecalis*, que es la bacteria encontrada con mayor frecuencia en dientes con fracasos endodónticos (Mohammadi y Abbott, 2009).

La CHX posee un amplio espectro de acción sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas, aunque su mayor efectividad es contra microorganismos Gram positivos. Sin embargo, no posee la capacidad de disolver tejidos orgánicos, por lo que no reemplaza al NaClO como el irrigante de elección en endodoncia. Sí es útil como agente coadyuvante durante el tratamiento endodóntico, tal como sugiere el protocolo propuesto por Zehnder (2006) que consiste en irrigar con NaClO durante la instrumentación para disolver el componente orgánico, luego irrigar con EDTA para eliminar el barro dentinario y por último una irrigación final con CHX debido a su amplio espectro antibacteriano y la capacidad de sustantividad que esta posee.

### **Interacción entre irrigantes**

Debido a que no existe en la actualidad alguna solución que cumpla con todas las características ideales de un irrigante en endodoncia, se hace necesario el uso de diferentes soluciones en asociación con la instrumentación mecánica del canal radicular.

Se ha demostrado que cuando se usa una combinación de irrigantes, la primera solución irrigante utilizada no es completamente eliminada del SCR antes de aplicar la siguiente. Como resultado, ambos irrigantes entran en contacto uno con el otro en el interior del canal radicular pudiendo formar subproductos (Prado y



cols., 2013). Este conocimiento es importante porque estos subproductos pueden ser tóxicos para los tejidos periapicales y formar precipitados que pueden ocluir los túbulos dentinarios interfiriendo con la desinfección y el sellado del SCR (Krishnamurty y Sudhakaran, 2010, Rossi-Fedele y cols., 2012). Por lo tanto, es primordial la eliminación de dichos subproductos una vez generados dentro del canal radicular y, más aún, evitar que éstos se formen.

Cuando se asocia el NaClO a diferentes concentraciones (1%-5,25%) con EDTA al 17%, agua destilada y solución salina, no se produce ningún precipitado. Cuando el NaClO se mezcla con EDTA se observa una reacción exotérmica con la formación de burbujas que corresponden principalmente a gas cloro, un producto tóxico (Prado y cols., 2013). Esta interacción de NaClO con EDTA, provoca la pérdida de la capacidad del NaClO de disolver tejidos orgánicos ya que se reduce significativamente la cantidad de  $\text{Cl}^-$  libre, dejándolo inefectivo contra bacterias y tejido necrótico (Rossi-Fedele y cols., 2012). Esto sugiere que clínicamente ambas soluciones deben utilizarse de manera separada y que grandes cantidades de NaClO se podrían usar para lavar los remanentes de EDTA que queden en el interior del SCR y así garantizar la efectividad del NaClO (Grawehr y cols., 2003; Zehnder, 2006). Sin embargo, el uso de NaClO posterior al EDTA produciría erosión en las paredes del canal dentinario, por lo que debe ser evitado. (Quian y cols., 2011; Niu y cols., 2002). Por otro lado, la degradación y consecuente desactivación del EDTA luego de interactuar con NaClO se produce por una reacción de oxidación extremadamente lenta y por lo tanto, no se compromete la acción quelante de EDTA dentro del periodo de uso clínico (Grawehr y cols., 2003; Grande y cols., 2006).

La combinación de CHX y EDTA genera una reacción ácido-base (Zehnder, 2006) produciendo un precipitado de color blanco lechoso. La asociación CHX/ solución salina produce una precipitación de sal después de 5 segundos. No se observa ninguna precipitación cuando la CHX se asocia con agua destilada (Prado y cols., 2013).

### **Asociación NaClO y CHX**

La asociación de NaClO a diferentes concentraciones con CHX al 2% produce un precipitado de color naranja-marrón cuya composición química no está completamente dilucidada.

La formación de este precipitado se puede explicar por una reacción ácido-base que se produce cuando el NaClO y la CHX se mezclan entre sí. La CHX es un ácido di catiónico que tiene la habilidad de donar protones, mientras que el NaClO es alcalino y puede recibir protones de la CHX. Este intercambio de protones produce la formación de una sustancia neutra e insoluble que precipita. (Mohammadi y Abbott, 2009).

En un estudio realizado el año 2012 por Gasic y cols., se analizó bajo microscopia electrónica de barrido (SEM) la ultraestructura de las paredes dentinarias luego de irrigar con NaClO 0,5% y CHX 0,2%. Los resultados mostraron obliteración de los túbulos dentinarios en el tercio medio y cervical del canal radicular, lo cual podría comprometer la limpieza y sellado del SCR y por ende, afectar el éxito del tratamiento (Krishnamurthy y Sudhakaran 2010; Mortenson y cols., 2012). Por esta razón, se sugiere el uso de irrigantes intermedios entre NaClO y CHX para prevenir así la formación de este precipitado (Gasic y cols., 2012; Mortenson y cols., 2012).

En el precipitado formado por la interacción entre CHX y NaClO, diversos autores han demostrado la presencia de un compuesto llamado Paracloroanilina, 1-amina-4-clorobenceno, p-cloroanilina o PCA. (Basrani y cols., 2007; Bui y cols., 2008, Arslan y cols., 2015).

Basrani y cols. (2007), concluyeron que la formación y cantidad de PCA está en relación directa con la concentración de NaClO, siendo 0,023% la menor concentración a la cual se observó cambio de coloración y 0,19% la mínima a la cual se formó el precipitado.

También se ha descrito que sin la presencia de NaClO, la CHX puede hidrolizarse espontáneamente y formar PCA en presencia de calor, luz y un ambiente alcalino (Basrani y cols., 2007) y que al aumentar la temperatura de la CHX por sobre los 45°C se produce PCA como subproducto, por lo tanto, no debe combinarse el uso de CHX y ultrasonido. Barbin y cols. (2013), detectaron PCA en soluciones de CHX al 2% que fueron almacenadas durante 7 días en condiciones de 95% de humedad relativa y 36,5 ° C.

La PCA es fabricada exclusivamente por el hombre y por tal razón no se encuentra en la naturaleza. Solo se produce como resultado de la intervención humana directa o indirecta. Se utiliza como intermediario en la producción de una buena cantidad de productos que incluyen químicos para el agro, pigmentos y colorantes para la industria de los textiles, cosméticos y productos farmacéuticos.

La International Agency for Research on Cancer (IACR) categoriza la PCA en el Grupo 2B (agente potencialmente carcinogénico para los humanos), basado en la escasa evidencia disponible en humanos y la amplia evidencia que existe sobre su efecto carcinogénico en animales de experimentación (World Health Organization, 2006). Se trata de un compuesto tóxico, ya sea por inhalación, ingestión o contacto con la piel, ojos o mucosas. Los efectos tóxicos más prominentes de la PCA se deben a la formación de enlaces covalentes con la hemoglobina y las proteínas en el hígado y los riñones generando problemas en el transporte de oxígeno en la sangre. Estudios toxicológicos en animales han demostrado que la exposición repetida a PCA produce cianosis y metahemoglobinemia, seguidas de efectos en el hígado, bazo y riñón, que se manifiestan a través de cambios en los parámetros hematológicos, esplenomegalia y hemosiderosis (de moderada a grave) en el bazo, el hígado y el riñón, parcialmente acompañada de hematopoyesis extramedular. Estos efectos se producen tras una hemólisis excesiva inducida por el compuesto y son coherentes con una anemia hemolítica (World Health Organization, 2006). Considerando solo los efectos no neoplásicos, como por ejemplo metahemoglobinemia, el nivel máximo tolerable de exposición humana a PCA está en el orden de 2µg/kg de peso/día.

Debido a lo anteriormente expuesto, es que diversos autores han recomendado usar un irrigante intermedio entre NaClO y CHX para prevenir la formación de este precipitado (Basrani y cols., 2007; Prado y cols., 2013). Mortenson y cols., realizaron recientemente un estudio *ex vivo* en el cual se buscó un irrigante intermedio para prevenir la formación de PCA al interior del SCR. Los resultados arrojaron que ninguna de las soluciones estudiadas (suero fisiológico, AC 50% y EDTA 14%) fueron capaces de impedir que se formara PCA, sin embargo, el AC obtuvo la menor formación del compuesto. A pesar de que la diferencia de cantidad de PCA encontrada entre el AC y el control negativo no fue estadísticamente significativa, se recomienda evitar el uso combinado de NaClO y CHX (Mortenson y cols., 2012).

Krishnamurty y Sudhakaran (2010), examinaron bajo estereomicroscopía la formación de PCA luego de utilizar 5 mL de distintos irrigantes intermedios entre NaClO 2,5% y CHX 2%. Ellos observaron formación inmediata del precipitado al usar agua destilada y suero fisiológico (NaCl 0,9%) como irrigante intermedio, mientras que en los canales irrigados con alcohol absoluto previo al uso de CHX no hubo evidencia de formación del precipitado. Sin embargo, otro estudio demostró que la asociación CHX/NaCl 0,9% y CHX/alcohol produce una precipitación salina después de 5 segundos, la cual podría ocluir los túbulos dentinarios (Prado y cols., 2013). Por otro lado, el uso de alcohol absoluto como irrigante endodóntico no está bien establecido y la biocompatibilidad del alcohol con los tejidos periapicales sigue siendo una preocupación.

Prado y cols. (2013), realizaron un estudio *in vitro* cuyo objetivo era caracterizar los subproductos formados al asociar los irrigantes más comúnmente usados en endodoncia: NaClO a diferentes concentraciones (0,16%-5,25%), CHX 2%, EDTA 17%, AC 10%, Ácido Fosfórico 37%, NaCl 0,9%, alcohol y agua destilada. Los resultados arrojaron que cuando el NaClO a diferentes concentraciones y la CHX al 2 % gel y solución, se asociaron con agua destilada, no se forma ningún precipitado. Así, el agua destilada parece ser la solución más indicada para ser utilizada como irrigante intermedio para eliminar los restos de la sustancia química utilizada previamente.

Riquelme y cols. (2015), en un estudio *in vitro* evaluaron el efecto del suero fisiológico y agua destilada en la formación de PCA. Se demostró que el suero fisiológico disminuye la formación de PCA ya que interactúa con CHX, formando una precipitación salina, dejando menos CHX disponible para interactuar con NaClO y producir PCA. Por otro lado, el agua destilada disminuye la formación de PCA, pero no la elimina por completo, ya que solo reduce la concentración de NaClO, siendo 50 mL el volumen óptimo de lavado entre el NaClO y CHX para prevenir la formación de PCA. Los autores concluyeron que el mejor disolvente de NaClO para evitar la formación de PCA en contacto con CHX es agua destilada.

Dado que la PCA ha demostrado ser dañina para la salud y perjudicial para el éxito del tratamiento endodóntico se hace indispensable cuantificar su potencial formación producto de la interacción entre los distintos irrigantes utilizados durante la terapia endodóntica. Se ha propuesto que sustancias como el EDTA, AC, alcohol absoluto y suero fisiológico son capaces de evitar o disminuir la formación de este compuesto, sin embargo, se ha visto que estos irrigantes al interactuar con la CHX forman un precipitado blanquecino que podría ocluir los túbulos dentinarios impidiendo una adecuada desinfección y un correcto sellado del SCR. Por esta razón, se ha propuesto investigar otras sustancias irrigantes, que impidan la formación de PCA cuando se utilicen como irrigantes intermedios entre NaClO y CHX durante el tratamiento endodóntico. Uno de estos irrigantes es el agua destilada, de la cual existe poca evidencia en relación a su influencia en la formación de PCA al ser utilizada como irrigante intermedio durante el tratamiento endodóntico. El objetivo de esta investigación es determinar si el agua destilada puede evitar la formación de PCA *ex vivo* cuando se utiliza como irrigante intermedio entre NaClO 5% y CHX 2%.

## HIPÓTESIS

El uso de agua destilada como irrigante intermedio entre Hipoclorito de Sodio al 5% y Clorhexidina al 2% evita la formación de Paracloroanilina dentro del sistema de canales radiculares.

## OBJETIVO GENERAL

Determinar *ex vivo* si la formación de PCA puede ser evitada usando agua destilada como irrigante intermedio entre NaClO al 5% y CHX al 2%.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar a través del método espectrofotométrico la concentración de NaClO, EDTA y CHX en las muestras obtenidas de cada etapa del tratamiento endodóntico.
2. Determinar la concentración de PCA formada al usar suero fisiológico como irrigante intermedio control entre NaClO al 5 % y CHX al 2%.
3. Determinar la concentración de PCA formada al usar agua destilada como irrigante intermedio entre NaClO al 5 % y CHX al 2%.
4. Comparar la efectividad del agua destilada y suero fisiológico usados como irrigantes intermedios para prevenir la formación de PCA.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Tipo de estudio

El presente trabajo corresponde a un estudio prospectivo, experimental y explicativo *ex vivo*. El tamaño muestral ( $n$ ) es de 30.

### 2. Materiales

A continuación se detallan los materiales empleados durante los procedimientos clínicos (Tabla 2) y aquellos materiales y reactivos utilizados para realizar los procedimientos de laboratorio (Tabla 3).

<b>Tabla 2. Materiales para Procedimientos Clínicos</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Turbina, micromotor y contrángulo convencionales</b></li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Dispositivo para la toma de muestras (Anexo 3)</b></li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Piedras de diamante redondas de alta velocidad Nº12 y Nº14</b> SS White Burs, Inc. 1145 Towbin Avenue Lakewood, New Jersey 08701, USA.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Fresas carbide redondas de baja velocidad Nº12 y Nº14</b> SS White Burs, Inc. 1145 Towbin Avenue Lakewood, New Jersey 08701, USA.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Fresas Endo Z de baja velocidad</b> Dentsply-Maillefer, Chemin du Verger 3, 1338 Ballaigues, Suisse.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Fresas Gates Glidden Nº 1-2-3</b> MANI, INC. 743 Nakaakutsu, Takanezawa, Shioya, Tochigi 329-1234, Japan.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Jeringas de Irrigación Monoject</b> Covidien lic, 15 Hampshire, Mansfield, MA 02048 USA.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Limas tipo Kerr 1era y 2da Serie</b> Dentsply-Maillefer, Chemin du Verger 3, 1338 Ballaigues, Suisse.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Hipoclorito de Sodio 5%</b> NaOCl, Sigma-Aldrich 3050 Spruce St. St. Louis, MO 63103, USA.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Clorhexidina Digluconato solución tópica 2%</b> Chlorhexidine digluconate solution 20% in H<sub>2</sub>O, Sigma-Aldrich 3050 Spruce St. St. Louis, MO 63103, USA.</li> </ul>

<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>EDTA 10%</b> EDTA, Merck Millipore, Frankfurter Str. 250, 64293 Darmstadt, Germany.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Cloruro de Sodio 0,9%</b> J.T.Baker, Mallinckrodt Baker, S.A. de C.V. Xalostoc, 55320, Edo de Mex. Mexico, USA.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Agua destilada</b> Laboratorio de Química, Facultad de Odontología, Universidad de Chile.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Fermin</b> DETAX GmbH &amp; Co. KG, Carl-Zeiss-Str. 4 76275 Ettlingen, Germany.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Vidrio Ionómero de autocurado</b> DENTSPLY DeTrey GmbH 78467, Konstanz, Germany.</li> </ul>

Tabla 3. Materiales y reactivos para Procedimientos de Laboratorio
<p><b>Todas las soluciones y diluciones usadas en la investigación fueron preparadas en el laboratorio de química de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.</b></p>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Tubos Eppendorf 1,5 MI</b> Biologix Group Limited, No.2766 Ying Xiu Road,High-Tech Industrial Development Zone Jinan, Shandong 250101 P.R., China.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Micropipetas 100 y 1000 Labopette®</b> Hirschmann, Inc. Holloway Road, Suite 104 Bluegrass Industrial Park · Louisville, KY 40299, USA.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Centrífuga Hermle z216 MK</b> HERMLE Labortechnik GmbH, <b>Siemensstr 25 D-78564, Wehingen, Alemania.</b></li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Ácido Clorhídrico</b> J.T.Baker, Mallinckrodt Baker, S.A. de C.V. Xalostoc, 55320, Edo de Mex. Mexico, USA.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Nitrito de Sodio</b> Merck Millipore, Frankfurter Str. 250, 64293 Darmstadt, Alemania.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Sulfamato de Amonio</b> Sigma-Aldrich Chemie GmbH Munich, Germany.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Naftil etilindiamina dihidrocloruro</b> Sigma-Aldrich 3050 Spruce St. St. Louis, MO 63103, USA.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Alcohol 96%</b> Merck Millipore, Frankfurter Str. 250, 64293 Darmstadt, Alemania.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Espectrofotómetro UNICAM®UV/VIS</b> Thermo Spectronic Unicam UV-530 UV-Visible, Rochester, NY, USA.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Cubetas de cuarzo 1cc</b> Sciencetech, Inc. 5649 Arapahoe Avenue Boulder, CO 80303-1399, USA.</li> </ul>



### 3. Selección de la muestra

En este estudio, se medirá la concentración de PCA formada al usar agua destilada como irrigante intermedio entre NaClO 5% y CHX 2%. Los datos de concentración de PCA obtenidos serán comparados con los de un grupo control en el cual se utilizará suero fisiológico como irrigante intermedio. En este contexto, la fórmula matemática que permite calcular el tamaño muestral  $n$  para la comparación de dos medias (SEQC, 2008), es la siguiente:

$$n = \frac{2(z_{\alpha} + z_{\beta})^2 s^2}{d^2}$$

donde:

$z_{\alpha}$  es el valor z correspondiente al riesgo deseado;

$z_{\beta}$  es el valor z correspondiente a la potencia estadística deseada;

$s^2$  es la varianza de la variable cuantitativa que tiene el grupo control;

$d$  es el valor mínimo de la diferencia que se desea detectar.

Para aplicar esta fórmula se necesita el dato de desviación estándar ( $s$ ) del grupo control medido en estudios previos. Se utilizará para este efecto, el estudio de Alegre (2015) quien determinó el contenido residual de PCA que se produce usando suero fisiológico como irrigante intermedio entre NaClO 5% y CHX 2%. Los resultados que obtuvo fueron los siguientes:

**Tabla 4. Concentración de PCA medida en el estudio de Alegre (2015).**

<b>Paracloroanilina</b>	<b>Concentración Mínima</b>	0,00004012%
	<b>Concentración Máxima</b>	0,0013235%
	<b>Concentración Promedio</b>	0,0007312%
	<b>Desviación Estandar</b>	<b>0,0002230</b>

Basándonos en este estudio, se estableció también el valor mínimo de la diferencia que se desea detectar ( $d$ ) en **0,00033**. Este valor corresponde a la diferencia entre la concentración promedio y la concentración mínima de PCA encontrada en el estudio. De esta forma, un  $d$  mayor implicaría que la concentración de PCA encontrada en el grupo experimental es menor a la mínima concentración de PCA medida en el grupo control según este estudio.

Por lo tanto, si se acepta un riesgo de 0,05 ( $Z_{\alpha}= 1,96$ ) y una potencia estadística del 90% ( $Z_{\beta}=1,282$ ), tenemos que:

$$n = \frac{2(1,960 + 1,282)^2 0,000223^2}{0,00033^2} = 9,59996$$

Se corroboró esta medición utilizando el software Calculadora de tamaño muestral GRANMO (IMIM, 2012), adicionando como dato que se desea una razón entre el  $n$  del grupo experimental respecto del control de 2. Esto último porque, en los estudios experimentales, a medida que las repeticiones aumentan, las estimaciones de las medias observadas, se hacen más precisas. En este sentido, como no existen estudios previos en los que se cuantifique la cantidad de PCA formada al usar agua destilada como irrigante intermedio entre NaClO 5% y CHX 2%, un  $n$  mayor en el grupo experimental es deseable.

Introduciendo todos estos datos, según este software, tenemos que se precisa un  $n = 10$  en el grupo control y un  $n = 20$  en el grupo experimental para detectar una diferencia igual o superior a 0.00033 (IMIM, 2012).

#### **4. Obtención y almacenamiento de muestras**

Se montó un modelo *ex vivo* de 30 dientes humanos unirradiculares sanos, extraídos por indicación terapéutica. La exodoncia de los dientes se realizó en la Clínica de Cirugía Maxilofacial de 4to Año de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

Previamente se explicó el procedimiento a los pacientes y se pidió su autorización mediante un consentimiento informado. En caso de ser menores de edad, el consentimiento fue firmado por el adulto responsable del menor (Anexo 2). Los dientes recolectados fueron limpiados, debridados, radiografiados y almacenados en NaCl al 0,9%.

#### **5. Tratamiento endodóntico y obtención de las muestras de las fases del tratamiento.**

Los criterios de selección de las muestras fueron dientes unirradiculares sanos y con calibres de canal medianos o amplios en los tres tercios radiculares analizados en la radiografía previa. Los dientes fueron divididos en dos grupos: un grupo control ( $n=10$ ) y un grupo experimental ( $n=20$ ).

A los dientes del grupo control se les realizó un tratamiento endodóntico de acuerdo al protocolo clínico de irrigación de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile detallado en el Anexo 1.

Mediante la aspiración con un dispositivo especialmente diseñado para este estudio (creado y construido por el Dr. Mauricio Ruiz Nolf) que se muestra en la Fotografía 1, se recolectaron las soluciones obtenidas del canal radicular durante las diferentes fases del tratamiento. Los detalles del dispositivo de succión se describen en el Anexo 3.

**Fotografía 1**

**Dispositivo para la toma de muestras  
Dr. Mauricio Ruiz Nolf**

Las fases en que se realizó la recolección de muestras en el grupo control fueron:

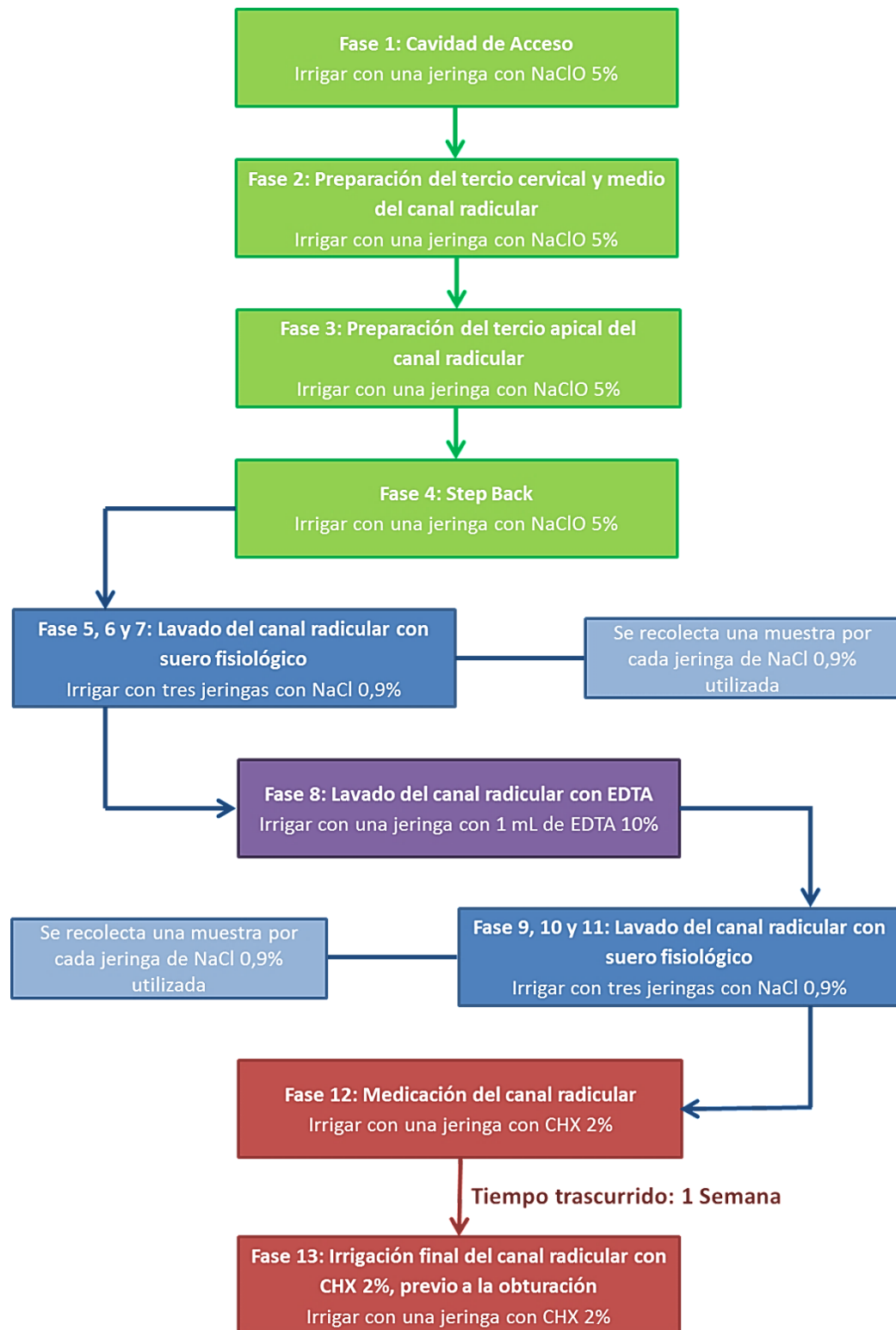
- Inmediatamente después de comunicar y al permeabilizar el canal radicular (fase N° 1), durante la preparación del tercio cervical y medio del canal radicular con Fresas Gates Glidden (fase N° 2) y al realizar la preparación del tercio apical (fase N° 3) y Step Back (fase N° 4). En cada una de estas fases se irrigó con 1 jeringa (3mL) con NaClO 5% y se recolectó lo producido.
- Luego se secó el canal radicular con conos de papel estériles de acuerdo al calibre del canal y se recolectaron los líquidos producidos al lavar con 3 jeringas de irrigación con suero fisiológico (fase N° 5, 6 y 7).
- Posteriormente, se lavó el canal radicular con una jeringa con 1 mL de EDTA 10% y se recolectó lo producido (fase N° 8).
- Luego se volvió a lavar el canal radicular con 3 jeringas de irrigación con suero fisiológico y se recolectaron los líquidos producidos (fase N° 9, 10 y 11).

- En este momento, se irrigó con 1 jeringa (3mL) con CHX 2%, se recolectó la muestra (fase N° 12) y se obturó la cavidad de acceso del diente con doble sellado (Fermín y Vidrio Ionómero de autocurado). Se selló el ápice con cera rosada y se colocó el diente en vial con suero fisiológico y estufa a 37° Celsius por una semana (tiempo habitual de medicación intracanal), simulando las condiciones del medio oral.
- Posterior a los 7 días se volvió a ingresar al canal, retirando el sellado temporal de la cavidad de acceso con fresas de alta velocidad, bajo refrigeración con agua. Se lavó con 1 jeringa (3mL) con CHX 2% y se realizó la última recolección (fase N° 13).

En la Figura 2 se muestra un flujograma de las fases del tratamiento endodóntico de acuerdo al protocolo clínico de irrigación de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile (FOUCH) descrito anteriormente.

A los dientes del grupo experimental se les aplicó el mismo protocolo clínico de irrigación descrito anteriormente, pero en ellos, **se sustituyó el suero fisiológico por agua destilada**. El agua destilada fue utilizada en el mismo volumen que el suero fisiológico, es decir, el equivalente a tres jeringas de irrigación, cada vez que correspondía según el protocolo.

Los 13 volúmenes correspondientes a las muestras de las distintas fases del tratamiento endodóntico fueron guardados en envases sellados y rotulados para ser llevados al laboratorio.



**Fig. 2. Flujograma de las fases del tratamiento endodóntico de acuerdo al protocolo clínico de irrigación de la FOUCH. Para irrigar se utilizó una Jeringa de Irrigación Monoject de 3mL. En cada fase del tratamiento endodóntico se recolectó una muestra, dando un total de 13 muestras recolectadas por diente.**

## 6. Análisis de las muestras

Las 13 muestras recolectadas por cada diente fueron trasladadas a tubos Eppendorf (1,5 mL) y centrifugados a 10.000 rpm durante 5 minutos, para precipitar posibles residuos presentes y posteriormente se procedió a su análisis químico.

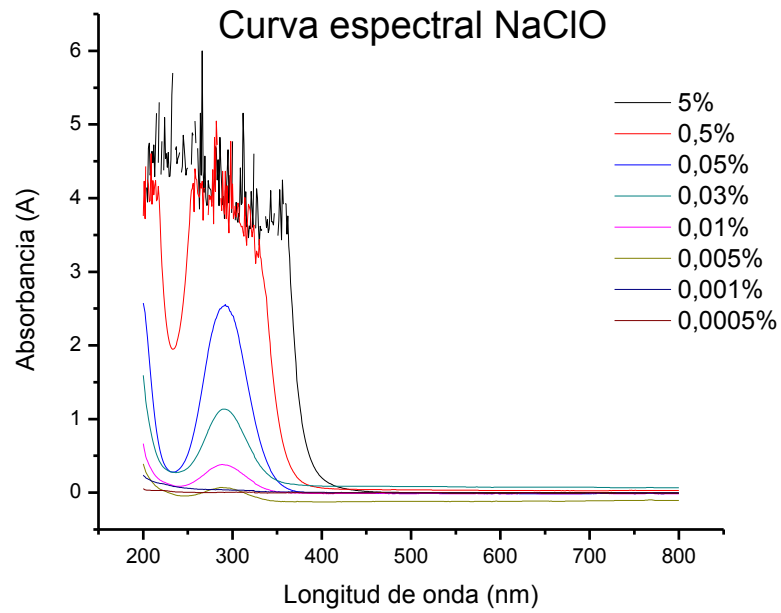
Las fases del tratamiento endodóntico en que fueron medidas las concentraciones de NaClO, EDTA y CHX, se muestran en la Tabla N° 5.

**Tabla 5. Fases del tratamiento endodóntico y solución irrigante que fue medida en cada una de ellas.**

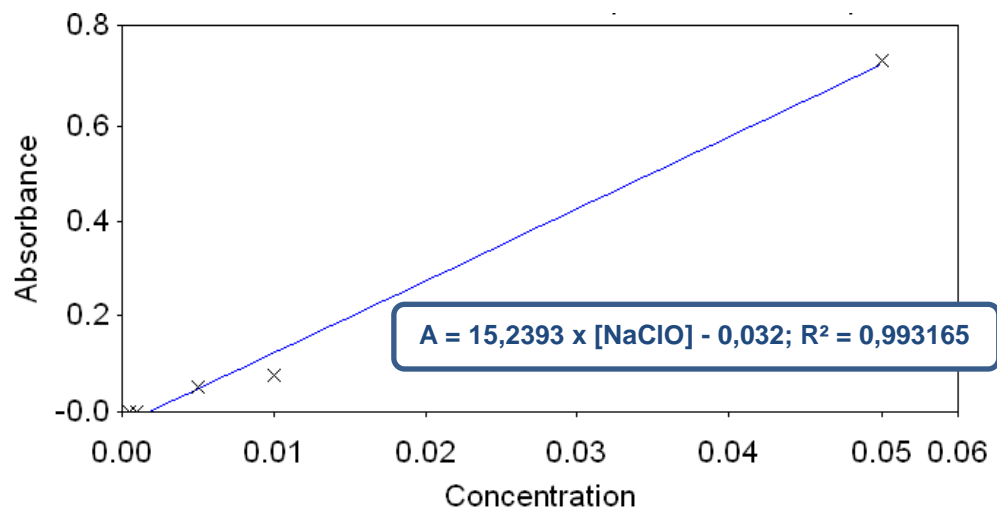
	Fase del tratamiento endodóntico												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
NaClO	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X		
EDTA								X	X	X	X		
CHX												X	X

### a. Determinación de la concentración de NaClO, EDTA y CHX:

**Determinación de la concentración de NaClO:** En primer lugar, se tomó 1 mL de solución de NaClO al 5%, se leyó su absorbancia (A) en el rango UV-visible (200-800 nm) y luego se graficaron los datos obtenidos para obtener su curva espectral. Los altos niveles de absorbancia no permitieron determinar el *lambda* máximo ( $\lambda_{max}$ ). Por lo tanto, a partir de la solución de NaClO al 5% se realizaron una serie de diluciones seriadas, obteniendo así soluciones de concentración conocida. En estas diluciones se determinó la longitud de onda a la cual NaClO tiene máxima absorbancia, el  $\lambda_{max}$  (Gráfico 1), y se construyó la curva de calibración (Gráfico 2), entre 0,0005% y 0,05%, la cual se utilizó para determinar la concentración de NaClO en las muestras recolectadas.



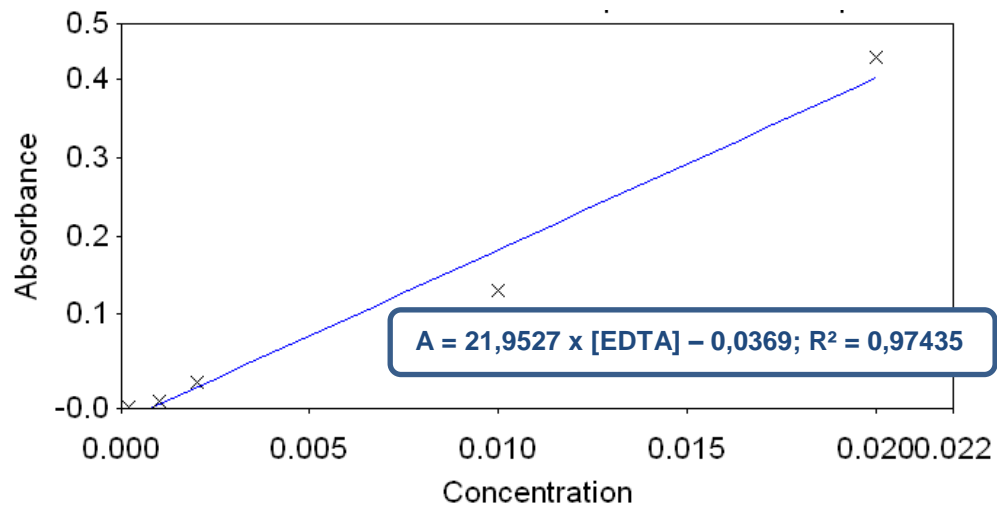
**Gráfico 1: Espectros de Absorción de NaClO al 5% y diluciones a distintas concentraciones.  $\lambda_{max}$ : 292 nm.**



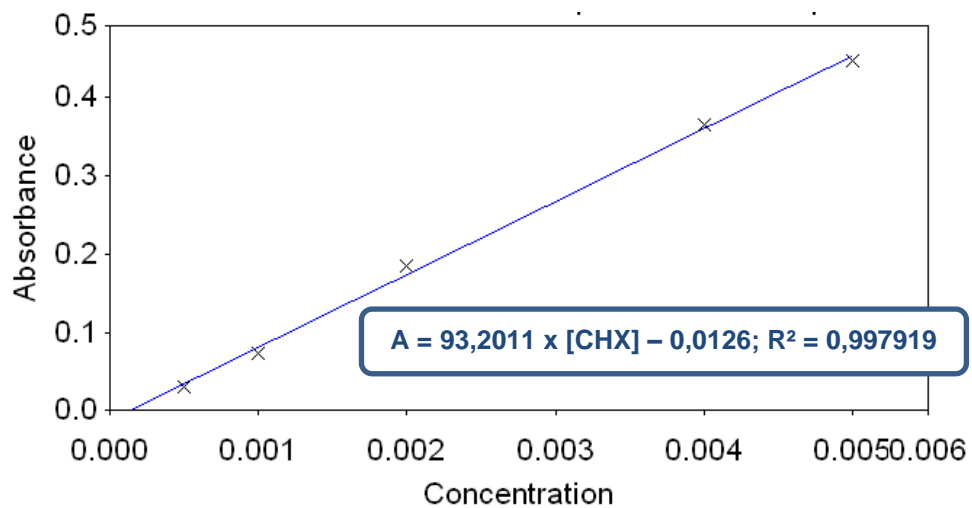
**Gráfico 2: Curva de Calibración del NaClO**



Para la **determinación de la concentración de EDTA y CHX** en las muestras recolectadas, se construyeron sus curvas de calibración (Gráfico 3 y 4 respectivamente), siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente. En el caso del EDTA se determinó el  $\lambda_{max}$  a 207 nm y para la CHX, a 254 nm.



**Gráfico 3: Curva de Calibración del EDTA**



**Gráfico 4: Curva de Calibración de la CHX**

Luego se midió la absorbancia de las muestras recolectadas a  $\lambda_{max}$ , el cual depende de la solución que se desea medir (NaClO: 292 nm, EDTA: 207 nm y CHX: 254 nm), en un espectrofotómetro utilizando una cubeta de cuarzo (1cc) contra agua destilada como blanco y se interpolaron los valores de absorbancia en la ecuación de la curva de calibración correspondiente a dicha solución, para obtener así el valor de su concentración.

En el **Anexo Nº4** se describe de forma más detallada el **método** utilizado **para determinar la concentración del NaClO, EDTA y CHX** en las muestras recolectadas.

**b. Determinación del espectro de absorción y concentración de PCA:**

Para determinar la concentración de PCA en las muestras se aplicó el protocolo para detección de Paracloroanilina en soluciones de digluconato de clorhexidina, descrito en la Farmacopea Europea (2005), ajustado a la cantidad de muestra que se obtuvo en las últimas fases de tratamiento, luego de irrigar con CHX al 2% (Fase 12 y 13).

El protocolo ajustado fue el siguiente:

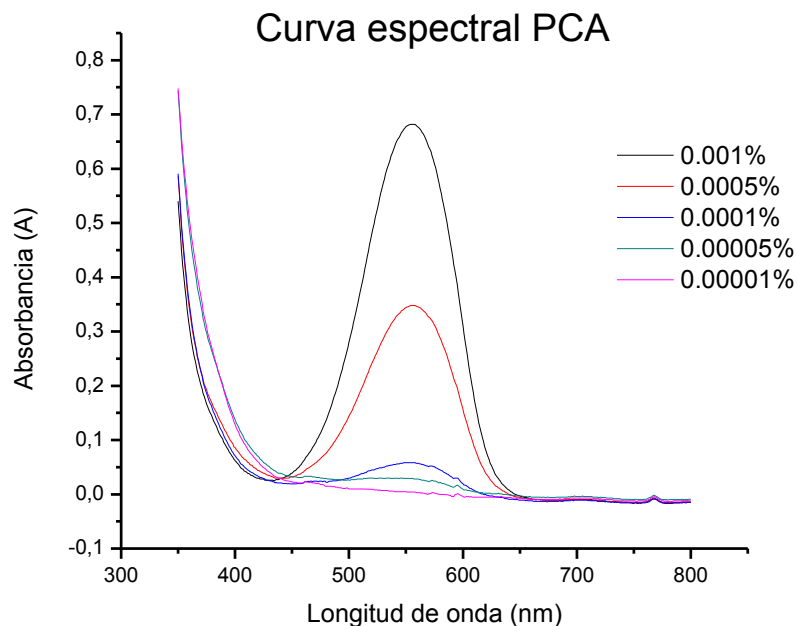
- A 1mL de muestra se agregó 250 $\mu$ L Ácido Clorhídrico diluido (73g/L) y se diluyó hasta 2mL con agua destilada.

Luego, se agregó una serie de soluciones y se agitó la mezcla después de la adición de cada ellas. Las soluciones agregadas fueron las siguientes:

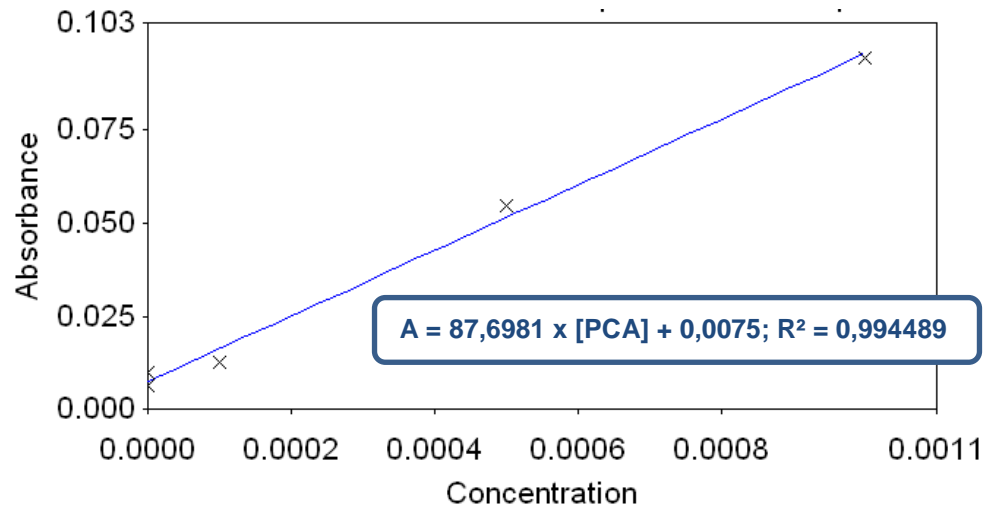
- 36 $\mu$ L de Nitrito de Sodio (solución 100g/L)
- 200 $\mu$ L de Sulfamato de Amonio (solución 50g/L)
- 500 $\mu$ L Naftil etilindiamina dihidrocloruro (solución 1g/L)
- 100 $\mu$ L de Alcohol (solución Etanol 96%)
- Se diluyó hasta 5 mL con agua destilada y se dejó reposar por 30 minutos.

El protocolo fue aplicado a 5 estándares de soluciones de PCA Aldrich® de concentraciones conocidas y se observó un cambio de coloración (rojo- azul) de diferente intensidad según la concentración de PCA. Se leyó su absorbancia en el rango visible (350–800 nm) y se obtuvo su curva espectral (Gráfico 5) para determinar el  $\lambda_{max}$ .

Con las soluciones estándares y el  $\lambda_{max}$  se construyó la curva de calibración (Gráfico 6), la cual se utilizó para determinar la concentración de PCA en las muestras recolectadas de las fases 12 y 13 del tratamiento endodóntico, a través de la ecuación  $A=87,6981 \times [PCA] + 0,0075$ ;  $R^2 = 0,994489$ .



**Gráfico 5: Espectros de Absorción de soluciones de PCA a distintas concentraciones, luego de ser sometidos al protocolo de identificación de PCA.  $\lambda_{max}$ : 552 nm.**



**Gráfico 6: Curva de Calibración de PCA**

## 7. Análisis Estadístico

A través del análisis de los resultados se buscó establecer las diferencias entre las concentraciones medidas de NaClO, EDTA, CHX y PCA en el grupo control (uso de suero fisiológico) con las medidas en el grupo experimental (uso de agua destilada). Los datos obtenidos fueron sometidos al test estadístico Shapiro-Wilk para determinar el tipo de distribución. Este test arrojó que las muestras no tenían distribución normal. Luego, los datos fueron sometidos al test de Mann Whitney para establecer la significancia de las diferencias encontradas utilizando el software estadístico IBM SPSS. Se fijó un intervalo de confianza del 95% aceptando diferencias estadísticamente significativas cuando  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

### 1. Concentración NaClO, EDTA y CHX:

Utilizando las curvas de calibración y absorbancia de las muestras se determinó la concentración de NaClO, EDTA y CHX, en las distintas fases del tratamiento endodóntico bajo el protocolo de irrigación propuesto.

**Tabla 6. Concentración de NaClO durante las fases de preparación químico-mecánica (PQM) del canal radicular.**

	Hipoclorito de Sodio (NaClO)				Valor <i>p</i>
	Grupo Control Suero		Grupo Experimental Agua Destilada		
	Media	DS	Media	DS	
<b>Fase 1</b>	4,737%	0,19885	4,816%	0,16260	0,253
<b>Fase 2</b>	4,875%	0,12930	4,825%	0,22044	0,444
<b>Fase 3</b>	4,887%	0,18133	4,881%	0,26692	0,713
<b>Fase 4</b>	4,901%	0,13967	4,865%	0,23753	0,659

Fase 1: Cavidad de acceso. Fase 2: Preparación del tercio cervical y medio del canal radicular. Fase 3: Preparación del tercio apical del canal radicular. Fase 4: Step-Back. DS: Desviación estándar. *p*: Significancia.

La concentración inicial de NaClO del 5% disminuye posterior a la preparación químico-mecánica del canal radicular, siendo la Fase 1 del tratamiento endodóntico donde se observa la mayor diferencia en ambos grupos.

**Tabla 7. Concentración de NaClO en las fases 5, 6 y 7, durante la irrigación con NaCl 0,9% en el grupo control y agua destilada en el grupo experimental.**

	Hipoclorito de Sodio (NaClO)				Valor <i>p</i>
	Grupo Control Suero		Grupo Experimental Agua Destilada		
	Media	DS	Media	DS	
Fase 5	0,05472%	0,02108	0,05951%	0,02035	0,552
Fase 6	0,00344%	0,00099	0,00365%	0,00172	0,732
Fase 7	0,00279%	0,00049	0,00254%	0,00116	0,532

Fase 5: Primera irrigación con NaCl 0,9% en el grupo control y con agua destilada en el grupo experimental. Fase 6: Segunda irrigación con NaCl 0,9% en el grupo control y con agua destilada en el grupo experimental. Fase 7: Tercera irrigación con NaCl 0,9% en el grupo control y con agua destilada en el grupo experimental. DS: Desviación estándar. *p*: Significancia.

La concentración promedio de NaClO tanto en el grupo control como el grupo experimental va disminuyendo al utilizar el irrigante intermedio. No existen diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en la concentración de NaClO entre ambos grupos en las Fases 5, 6 y 7 del tratamiento endodóntico.

**Tabla 8. Concentración de EDTA**

	Ácido Etilendiaminotetraacético (EDTA)				Valor <i>p</i>
	Grupo Control Suero		Grupo Experimental Agua Destilada		
	Media	DS	Media	DS	
Fase 8	7,480%	1,04849	8,078%	1,11628	0,166

Fase 8: Irrigación con EDTA al 10%. DS: Desviación estándar. *p*: Significancia.

En la Fase 8 del protocolo de irrigación, la concentración promedio de EDTA disminuye a partir de su concentración inicial del 10% luego de su paso por el canal radicular en ambos grupos.

**Tabla 9. Concentración de EDTA en las fases de tratamiento 9, 10 y 11.**

	Ácido Etilendiaminotetraacético (EDTA)				Valor <i>p</i>
	Grupo Control Suero		Grupo Experimental Agua Destilada		
	Media	DS	Media	DS	
Fase 9	0,07989%	0,02026	0,07852%	0,01625	0,307
Fase 10	0,00956%	0,00181	0,00911%	0,00357	0,091
Fase 11	0,00668%	0,00089	0,00600%	0,00193	0,143

Fase 9: Primera irrigación con NaCl 0,9% en el grupo control y con agua destilada en el grupo experimental. Fase 10: Segunda irrigación con NaCl 0,9% en el grupo control y con agua destilada en el grupo experimental. Fase 11: Tercera irrigación con NaCl 0,9% en el grupo control y con agua destilada en el grupo experimental. DS: Desviación estándar. *p*: Significancia.

El lavado sucesivo del canal radicular con el irrigante intermedio, produce en ambos grupos, una disminución gradual de la concentración promedio de EDTA de la Fase 9 a la Fase 11 del tratamiento endodóntico.

**Tabla 10. Concentración de NaClO residual en las fases de tratamiento 9, 10 y 11.**

	Hipoclorito de Sodio (NaClO)				Valor <i>p</i>
	Grupo Control Suero		Grupo Experimental Agua Destilada		
	Media	DS	Media	DS	
Fase 9	0,00492%	0,00156	0,00366%	0,00168	0,056
Fase 10	0,00337%	0,00093	0,00283%	0,00125	0,239
Fase 11	0,00290%	0,00066	0,00250%	0,00099	0,558

Fase 9: Primera irrigación con NaCl 0,9% en el grupo control y con agua destilada en el grupo experimental. Fase 10: Segunda irrigación con NaCl 0,9% en el grupo control y con agua destilada en el grupo experimental. Fase 11: Tercera irrigación con NaCl 0,9% en el grupo control y con agua destilada en el grupo experimental. DS: Desviación estándar. *p*: Significancia.

La irrigación sucesiva con NaCl 0,9% en el grupo control y agua destilada en el grupo experimental, produce una disminución progresiva de la concentración promedio de NaClO de la Fase 9 a la Fase 11 del tratamiento endodóntico.

**Tabla 11. Concentración de CHX determinado en las fases 12 y 13.**

La Fase 12 corresponde a la medicación del canal radicular con CHX 2% y la Fase 13 corresponde a la etapa final de irrigación del canal radicular con CHX 2%, previo a la obturación. La muestra corresponde al eluido obtenido pasado una semana de incubación.

	Clorhexidina (CHX)				Valor <i>p</i>
	Grupo Control Suero		Grupo Experimental Agua Destilada		
	Media	DS	Media	DS	
<b>Fase 12</b>	2,189%	0,15393	2,179%	0,17383	0,812
<b>Fase 13</b>	2,159%	0,09384	2,223%	0,09324	0,120

F12: Primera irrigación con CHX 2%. F13: Segunda irrigación con CHX 2%. DS: Desviación estándar. *p*: Significancia.

## **2. Concentración PCA**

Utilizando la curva de calibración preparada con estándares de PCA y la absorbancia de las muestras luego de ser sometidas al protocolo de identificación de PCA, se determinó su concentración en las Fases 12 y 13 del tratamiento endodóntico posterior al uso de CHX al 2%.

**Tabla 12. Concentración de PCA determinada en las fases 12 y 13.**

	Paracloroanilina (PCA)				Valor <i>p</i>
	Grupo Control Suero		Grupo Experimental Agua Destilada		
	Media	DS	Media	DS	
<b>Fase 12</b>	0,00322%	0,00112	0,00245%	0,00064	<b>0,031</b>
<b>Fase 13</b>	0,00275%	0,00105	0,00252%	0,00033	0,231

F12: Primera irrigación con CHX 2%. F13: Segunda irrigación con CHX 2%. DS: Desviación estándar. *p*: Significancia.

En la Fase 12, existe una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) en la concentración de PCA medida, siendo esta menor en el grupo experimental, donde se utilizó agua destilada como irrigante intermedio.



## DISCUSIÓN

En la actualidad no existe un solo irrigante que cumpla con todas las funciones requeridas, por ello una irrigación óptima se basa en el uso combinado de dos o más soluciones en una secuencia específica para obtener el éxito terapéutico (Haapasalo y cols., 2010). Sin embargo, la interacción de estos irrigantes al interior del SCR puede complicar el tratamiento endodóntico, ya que se pueden formar subproductos tóxicos para los tejidos periapicales y precipitados que pueden ocluir los túbulos dentinarios e interferir con la limpieza y sellado de los canales radiculares (Krishnamurthy y Sudhakaran, 2010). Es el caso de la Paracloroanilina, precipitado insoluble formado por la reacción ácido-base entre el NaClO y la CHX, soluciones empleadas en el protocolo de irrigación de la Clínica de Endodoncia de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

La Paracloroanilina ha mostrado ser citotóxica en ratas y posiblemente carcinogénica en seres humanos. Este precipitado insoluble es difícil de remover del SCR, ocluye los túbulos dentinarios impidiendo la penetración de la medicación intracanal y compromete el sellado de la obturación del canal radicular. Además, la PCA tiñe las paredes del canal y causa la decoloración del diente afectando la estética (Krishnamurthy y Sudhakaran, 2010, Rossi-Fedele y cols., 2012).

Krishnamurthy y Sudhakaran (2010) señalaron que sería prudente reducir la formación de PCA usando suero fisiológico o agua destilada como irrigante intermedio y en grandes volúmenes para así mejorar su efecto de dilución del NaClO. El protocolo de irrigación aplicado al grupo control de este trabajo corresponde al que actualmente se aplica en la Clínica de Endodoncia de la Universidad de Chile y en él se emplea suero fisiológico como irrigante intermedio entre el NaClO y la CHX. Un estudio previo que utilizó la misma metodología para la detección de PCA y el mismo protocolo de irrigación, con NaCl al 0,9% como irrigante intermedio, detectó que existe presencia de PCA en las últimas fases del tratamiento, en una concentración promedio de 0,0007312% (Alegre, 2015).

En el presente trabajo se estudió si la formación de PCA *ex vivo* puede ser evitada utilizando agua destilada en lugar de suero fisiológico como solución irrigadora intermedia entre NaClO al 5% y CHX al 2%. Los resultados revelaron que existe presencia de PCA en las últimas fases del tratamiento, por lo tanto, no se confirma la hipótesis planteada.

En esta investigación también se calculó la concentración de NaClO durante las primeras fases de preparación del canal radicular y se observó que en promedio ésta disminuyó a 4,89% en el grupo control y 4,85% en el grupo experimental. Estudios anteriores han descrito la inactivación del NaClO al interactuar con materia orgánica. Estas reacciones, que ocurren principalmente en la superficie de contacto entre NaClO y la materia orgánica, llevan a la licuefacción del tejido orgánico (Estrela y cols., 2002) y al mismo tiempo, las moléculas de NaClO involucradas se consumen, lo que resulta en una disminución de su concentración y actividad local (Stojicic y cols., 2010). Sin embargo, esta disminución fue muy leve o inexistente ya que se tomaron las precauciones de utilizar el NaClO en un mayor volumen (3 mL en cada una de las cuatro fases de preparación del canal radicular) y en intervalos más frecuentes (irrigación continua) para así evitar su inactivación y mejorar su eficacia. Probablemente tratamientos *in vivo* muestren un consumo mayor de hipoclorito de sodio, algo que no se observó en nuestras muestras *ex vivo*.

En las fases 5, 6 y 7 del protocolo se utilizó un irrigante intermedio con el fin de diluir el NaClO que pudiera quedar al interior de los canales radiculares. Los resultados nos muestran una disminución importante de la concentración de NaClO, que va del 0,05% en la fase 5 al 0,002% en la fase 7 en ambos grupos, pero estudios han evidenciado que al mezclar CHX 2% con diluciones acuosas de NaClO que van del 5% al 0,0005% la solución cambia de color en relación directa a la concentración de NaClO y se evidencia formación de PCA (Bilbao, 2013), lo que se corresponde con resultados obtenidos por Basrani y cols. (2007).

El EDTA al 10% se utilizó en la fase 8 del tratamiento endodóntico con el fin de eliminar el barro dentinario producido por la instrumentación. Se midió la variación de concentración de este irrigante luego de su paso por el canal radicular y se encontró que en ambos grupos la concentración inicial de EDTA del 10% disminuyó en forma importante, a 7,5% en el grupo control y 8,1% en el grupo experimental. Su disminución se debe a su capacidad de “secuestrar” los iones  $\text{Ca}^{+2}$  de la dentina, provocando su desmineralización por quelación durante el tiempo que está en contacto con las paredes del canal radicular. Existen estudios donde se ha empleado el EDTA como irrigante intermedio con el objetivo de lavar e inactivar el NaClO presente en los túbulos dentinarios y así evitar la formación de PCA, sin embargo al igual que en nuestros resultados se encontró la presencia de PCA, luego de usar CHX al 2% (Mortensen y cols., 2012).

En las fases 9, 10 y 11 del protocolo se utilizó nuevamente un irrigante intermedio, esta vez con el objetivo de eliminar el EDTA que pudiera quedar al interior del SCR. Los resultados revelan una baja importante en la concentración de EDTA, que va del 0,07% en la fase 9 (primer lavado del SCR con 3 mL del irrigante intermedio) al 0,006% en la fase 11 (tercer lavado del SCR con el irrigante intermedio) en ambos grupos, lo que indica que tanto el NaCl 0,9% como el agua destilada permiten diluir el EDTA al 10% usado para irrigar el SCR.

En estas fases del tratamiento endodóntico también se midió la concentración de NaClO residual que pudiera quedar en el interior del canal radicular. En ambos grupos fue posible cuantificar NaClO en concentraciones pequeñas, levemente mayores en el grupo control (0,00492% a 0,0029%) en comparación con el grupo experimental (0,00366% a 0,0025%), pero aun así no existe una diferencia estadísticamente significativa entre ambos. Aunque estos valores son pequeños, en presencia de CHX al 2% igual llevaron a la formación de PCA. Esto se condice con los estudios de Bilbao (2013) sobre la influencia de NaCl al 0,9% en la formación de PCA, al ser usado entre NaClO 5% y CHX 2%, donde se demostró que la dilución de NaClO con NaCl 0,9% no impide la formación de PCA. Por otro lado, Riquelme y cols. (2015) en un estudio *in vitro* realizaron una serie de diluciones de NaClO en agua destilada, obteniendo

soluciones de 0,025%, 0,02%, 0,015%, 0,01%, 0,005% y 0,0025% de NaClO, las cuales mezclaron con CHX al 2%. Determinaron que en cada una de estas diluciones era posible encontrar PCA y que esta sustancia siempre se producirá mientras existan remanentes de NaClO.

La CHX al 2% en solución, se utilizó en las fases 12 y 13 del tratamiento endodóntico como medicación intracanal. Un gran número de estudios señalan que la concentración óptima de CHX como medicación intracanal es al 2% (Basrani y cols., 2004; Zehnder, 2006; Siqueira y cols., 2007), dado que es a esta concentración donde la CHX puede eliminar a la *Candida Albicans* (Basrani y cols., 2004) y el *Enterococcus faecalis* (Krithikadatta y cols., 2007), algo que el  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  por sí solo no puede. En nuestro estudio la concentración de CHX de las muestras se mantuvo igual que la concentración inicial al 2%. Posiblemente a nivel *in vivo* la situación sea diferente por la presencia de microorganismos en los canales radiculares, lo que debiera producir una disminución de su concentración.

En este estudio se determinó la concentración de PCA modificando el protocolo usado en la detección de Paracloroanilina en soluciones de digluconato de clorhexidina (cualitativo), descrito en la Farmacopea Europea (2005), en un método cuantitativo. En este modelo *ex vivo* luego de aplicar el protocolo de irrigación propuesto, se determinó la presencia de PCA en las últimas dos fases del tratamiento endodóntico (luego de irrigar con CHX al 2%) en ambos grupos. En la fase 12, el análisis estadístico indica que existe una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) en la concentración de PCA medida, siendo ésta menor en el grupo experimental, donde se utilizó agua destilada como irrigante intermedio (0,00245% de PCA en el grupo experimental vs. 0,00322% de PCA medido en el grupo control). En la fase 13 en cambio, aunque la cantidad de PCA encontrada también fue menor en el grupo experimental que en el grupo control, esta diferencia no resultó ser estadísticamente significativa ( $p > 0,05$ ).

Según lo establecido por la Organización Mundial de la Salud en relación a la exposición a PCA y considerando solo los efectos no neoplásicos, como por ejemplo metahemoglobinemia, el nivel máximo tolerable de exposición humana a

PCA está en el orden de  $2\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso/día (Boehncke y cols., 2003). Asumiendo que la cantidad que permanece al interior del canal radicular y que por ende, podría ingresar al organismo, correspondería a 0,1 mL, el nivel de exposición a la PCA según este estudio sería de  $2\mu\text{g}$ , lo que se encuentra bajo el nivel máximo tolerable. Por lo tanto, los pacientes que se someten a un tratamiento endodóntico que emplea este protocolo de irrigación, no estarían en riesgo de exponerse a los efectos tóxicos de la PCA, sin embargo, estudios *in vivo* son necesarios para confirmar esta aseveración.

Diversos estudios se han realizado para evaluar la formación de PCA luego de usar diferentes soluciones como irrigantes intermedios entre NaClO y CHX. Krishnamurthy y Sudhakaran (2010) evaluaron el uso de irrigantes como el agua destilada, NaCl 0,9% y alcohol absoluto para prevenir la formación de PCA. Los resultados arrojaron que lo único capaz de prevenir la formación de PCA fue la irrigación intermedia con alcohol absoluto. Sin embargo, la interacción de la CHX con el alcohol produce una precipitación salina, la cual podría ocluir los túbulos dentinarios. Además, el uso de alcohol absoluto como irrigante no está bien establecido y la biocompatibilidad de esta solución con los tejidos periapicales no ha sido totalmente estudiada. Mortensen y cols. (2012) evaluaron si era posible evitar la formación de PCA usando NaCl 0,9%, AC y EDTA como irrigantes intermedios. No obstante, los resultados arrojaron que ninguna de las soluciones estudiadas fue capaz de impedir que se formara PCA. En un estudio realizado por Magro y cols. (2015) se evaluó la eficacia del alcohol isopropílico, solución salina y agua destilada para prevenir el precipitado formado al interactuar el NaClO y la CHX y el efecto de éste sobre la fuerza de adhesión a la dentina radicular de un cemento para espiga a base de resina. Los resultados mostraron que ninguna de las soluciones estudiadas fue capaz de impedir la formación del precipitado, sin embargo, este no interfirió con la fuerza de adhesión del cemento para espiga a base de resina. En contraste, Homayouni y cols. (2014) demostraron que la presencia de este precipitado sí tiene un efecto negativo en la capacidad de sellado de la gutapercha y del cemento a base de resina AH26 sealer (materiales de obturación comúnmente utilizados en Endodoncia), por lo que recomiendan prevenir su formación utilizando un irrigante intermedio entre el NaClO y la CHX.

En la presente investigación, aunque el protocolo de irrigación planteado fue distinto a los utilizados en estudios previos, también se encontró PCA, lo que podría deberse a que los irrigantes intermedios utilizados (suero fisiológico, agua destilada y EDTA al 10%, en conjunto con la aspiración y secado del canal radicular con conos de papel) no lograron eliminar completamente los remanentes de NaClO del interior del SCR y, mientras éstos estén presentes, siempre será posible encontrar PCA cuando se irriga posteriormente con CHX 2%. Según Riquelme y cols. (2015), a partir de una concentración de 0,005% de NaClO, la formación de PCA empieza a mantenerse constante, lo que indica que a partir de esta dilución (la que fue alcanzada tanto en el grupo control como en el grupo experimental), se puede obtener la mínima cantidad de PCA en contacto con CHX al 2%.

Es importante recordar que la interacción entre la CHX y el suero fisiológico producen una sal que sin lugar a dudas oblitera los túbulos dentinarios, impidiendo un adecuado contacto entre las paredes del canal radicular, el cemento sellador y la guatapercha utilizada para obturar el SCR, lo que hace disminuir las posibilidades de éxito del tratamiento endodóntico. Por el contrario, cuando la CHX se asocia con agua destilada no se observa ninguna precipitación (Prado y cols., 2013).

En conclusión, ninguna de las soluciones usadas en esta investigación como irrigante intermedio logró prevenir la formación de PCA, por lo tanto, se requieren más estudios en este ámbito con el fin de encontrar un irrigante que impida la formación de este precipitado tóxico y que a la vez sea inocuo para los tejidos periapicales. Por el momento, el agua destilada parece ser la mejor opción como solución irrigadora intermedia, ya que no forma subproductos ni precipitados al interactuar con las otras soluciones utilizadas en el protocolo de irrigación, es inocua para los tejidos periapicales, logra diluir el NaClO hasta una concentración que permite la mínima formación de PCA, siendo la cantidad de este precipitado menor que la que se produce empleando suero fisiológico como irrigante intermedio.

## CONCLUSIONES

A partir del presente trabajo de investigación se puede concluir que:

1. Se forma PCA al interior del SCR por la presencia de NaClO residual y CHX al 2%.
2. El uso de agua destilada como irrigante intermedio diluye el NaClO dentro del canal radicular, pero no impide la formación de PCA.
3. Se deben utilizar al menos 9 mL de agua destilada para diluir el NaClO 5% hasta una concentración tal que al entrar en contacto con CHX 2% produzca la mínima cantidad de PCA.
4. El agua destilada usada como irrigante intermedio es más eficaz que el suero fisiológico en prevenir la formación de PCA.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alegre, O. (2015). *Determinación del contenido residual de Paracloroanilina ex vivo producido en tratamiento endodóntico tras la utilización de Hipoclorito de Sodio 5% y Clorhexidina 2%*. Tesis para optar al título de Cirujano Dentista. Universidad de Chile, Santiago, Chile.

Arslan H, Uygun A. D., Keskin A, Karatas E, Seckin F, Yıldırım A (2015). Evaluation of orange-brown precipitate formed in root canals after irrigation with chlorhexidine and QMix and spectroscopic analysis of precipitates produced by a mixture of chlorhexidine/NaOCl and QMix/NaOCl. *Int Endod J* 48: 1199–1203.

Barbin LE, Estrela C, Guedes DF, Spanó JC, Sousa-Neto MD, Pécora JD (2013). Detection of para-chloroaniline, reactive oxygen species, and 1-chloro-4 nitrobenzene in high concentrations of chlorhexidine and in a mixture of chlorhexidine and calcium hydroxide. *J Endod* 39:664-668.

Basrani B, Haapasalo M (2012). Update on endodontic irrigating solutions. *Endodontic Topics* 27:74–102.

Basrani BR, Manek S, Sodhi R, Fillery E, Manzur A (2007). Interaction between sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate. *J Endod* 33:966-969.

Basrani B, Tjaderhane L, Santos JM, Pascon E, Grad H, Lawrence HP, Friedman S (2003). Efficacy of chlorhexidine- and calcium hydroxide-containing medicaments against *Enterococcus faecalis* *in vitro*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 96:618–624.

Bilbao C (2013). *Influencia del suero fisiológico en la formación de Paracloroanilina, estudio in vitro* Tesis para optar al título de Cirujano Dentista. Universidad de Chile, Santiago, Chile.



Boehncke A, Kielhorn J, Könnecker G, Pohlenz-Michel C, and Mangelsdorf I, (2003). 4-CHLOROANILINE. *Concise International Chemical Assessment Documents*, 48.

Bui TB, Baumgartner JC, Mitchell JC (2008). Evaluation of the interaction between sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate and its effect on root dentin. *J Endod* 34:181–185.

Crompton BJ, Goodell GG, McClanahan SB (2005). Effects on Smear Layer and Debris Removal with Varying Volumes of 17% REDTA after Rotary Instrumentation. *J Endod* 31:536-538.

Davies A (1973). The mode of action of chlorhexidine. *J Periodontal Res* 12:68–69.

Estrela C, Barbin E, Spanó J, Marchesan M, Pécora J (2002). Mechanism of action of sodium hypochlorite. *Braz Dent J* 13:113–117.

Farmacopea Europea (2005). 5ª Edición. Monografías C. Clorhexidina, digluconato de, disolución de [p.–1997; m.–3.0], 1215.

Gasic J, Popovic J, Zivkovic S, Petrovic A, Barac R, Nikolic M (2012). Ultrastructural analysis of the root canal walls after simultaneous irrigation of different Sodium Hypochlorite concentration and 0.2% Chlorhexidine Gluconate. *Microscopy and Research* 75:1099-1103.

Goldman M, Kronman JH, Goldman LB, Clausen H, Grady J (1976). New method of irrigation during endodontic treatment. *J Endod* 2: 257–260.

Gomes B, Ferraz C, Vianna M, Berber V, Teixeira F, Souza-Filho F (2001). *In vitro* antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J* 34: 424–428.

- Grande NM, Plotino G, Falanga A (2006). Interaction between EDTA and sodium hypochlorite: a nuclear magnetic resonance analysis. *J Endod*. 32:460-464.
- Grawehr M, Sener B, Waltimo T, Zehnder M (2003). Interactions of ethylenediaminetetraacetic acid with sodium hypochlorite in aqueous solutions. *Int Endod J*. 36:411–7.
- Haapasalo HK, Siren EK, Waltimo TM (2000). Inactivation of local root canal medicaments by dentine: an in vitro study. *Int Endod J*. 33:126–131.
- Haapasalo M, Shen Y, Qian W, Gao Y (2010). Irrigation in Endodontics. *Dent Clin North Am* 54:291-312.
- Haapasalo M, Qian W, Shen Y (2012). Irrigation: beyond the smear layer. *Endodontic Topics* 27: 35–53.
- Hand RE, Smith ML, Harrison JW (1978). Analysis of the effect of dilution on the necrotic tissue dissolution property of sodium hypochlorite. *J Endod* 4:60–64.
- Homayouni H, Majd NM, Zohrehei H, Mosavari B, Adel M, Dajmar R, Homayouni A (2014). The Effect of Root Canal Irrigation with Combination of Sodium Hypochlorite and Chlorhexidine Gluconate on the Sealing Ability of Obturation Materials. *Open Dent J*. 22; 8: 184-7.
- IMIM (2012). Calculadora de tamaño muestral GRANMO, versión 7.12. *Institut Hospital del Mar d'investigacions Mèdiques*. [Disponible en: <http://www.imim.cat/ofertadeserveis/software-public/granmo/>].
- Khademi AA, Mohammadi Z, Davari AR (2008). Evaluation of the antibacterial substantivity of three concentrations of chlorhexidine in bovine root dentine. *Iranian Endod J* 2:112–115.

Krishnamurthy S, Sudhakaran S (2010). Evaluation and prevention of the precipitate formed on interaction between sodium hypochlorite and chlorhexidine. *J Endod* 36:1154–7.

Krithikadatta J, Indira R, Dorothykalyani AL (2007). Disinfection of Dentinal Tubules with 2% Chlorhexidine, 2% Metronidazole, Bioactive Glass when Compared with Calcium Hydroxide as Intracanal Medicaments. *J Endod*. 33 (12): 1473-6.

Lasala, A. (1992). Endodoncia. México, Salvat.

Magro MG, Kuga MC, Aranda-Garcia AJ, Victorino KR, Chavez-Andrade GM, Faria G, Keine KC, So MVR (2015). Effectiveness of several solutions to prevent the formation of precipitate due to the interaction between sodium hypochlorite and chlorhexidine and its effect on bond strength of an epoxy-based sealer. *Int Endod J*. 48: 478–483.

Mhera P, Clancy Ch, Wu J. (2000). Formation of a facial hematoma during endodontic therapy. *JADA* 131:67-71.

Mohammadi Z, Abbott PV (2009). The properties and applications of chlorhexidine in endodontics. *Int Endod J*. 42:288–230.

Mortenson D, Sadilek M, Flake NM, Paranjpe A, Heling I, Johnson JD, Cohenca N (2012). The effect of using an alternative irrigant between sodium hypochlorite and chlorhexidine to prevent the formation of para-chloroaniline within the root canal system. *Int Endod J*. 45:878–882.

Niu, T.Yoshioka, C. Kobayashi, H. Suda (2002). A scanning electron microscopic study of dentinal erosion by final irrigation with EDTA and NaOCl solutions. *Int Endod J* 35:934–939.

Pontarolo R, Gomara FL, Correr CJ, Sato MEO (2004). Development and validation of a spectrophotometric method for the quantification of kojic acid. *Ars Pharm*, 45 (2): 145-153.

Prado M, Santos Junior HM, Rezende CM, Pinto AC, Farias RB, Simao RA, Gomes BP (2013). Interactions between Irrigants Commonly Used in Endodontic Practice: A Chemical Analysis. *J Endod*. 39:505–510.

Radcliffe C, Potouridou L, Qureshi R, Hababbeh N, Qualtrough A, Worthington H (2004). Antimicrobial activity of varying concentrations of sodium hypochlorite on the endodontic microorganisms *Actinomyces israelii*, *A. naeslundii*, *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J* 37: 438–446.

Riquelme MJ, Correa V, Araya P, Neira M, Yévenes I (2015). Water and physiological saline to prevent the formation of p-chloroaniline. *Int. J. Odontostomat* 9(3): 399-404.

Rosenthal S, Spangberg L, Safavi K (2004). Chlorhexidine substantivity in root canal dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 98:488-92

Rossi-Fedele G, Dogramacı E, Guastalli A, Poli de Figueiredo JA (2012). Antagonistic Interactions between Sodium Hypochlorite, Chlorhexidine, EDTA, and Citric Acid. *J Endod* 38: 426-431.

SEQC (2008). Determinación del tamaño muestral. Curso de estadística para el laboratorio clínico, módulo 2. *Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular*. [Disponible en: [http://www.seqc.es/es/Varios/7/7/Curso de Estadistica para el laboratorio Clinico/](http://www.seqc.es/es/Varios/7/7/Curso_de_Estadistica_para_el_laboratorio_Clinico/)].

Serper, A., Ozbek, M., Calt, S. (2004). Accidental sodium hypochlorite skin injury during endodontic treatment. *J Endod*. 3:180-181.

Siqueira JF, Paiva S, Rocas I (2007). Reduction in the Cultivable Bacterial Populations in Infected Root Canals by a Chlorhexidine-based Antimicrobial Protocol. *J Endod.* 33 (5): 541-7.

Siqueira JF Jr, Rôças IN, Favieri A, Lima KC (2000). Chemomechanical reduction of the bacterial population in the root canal after instrumentation and irrigation with 1%, 2.5%, and 5.25% sodium hypochlorite. *J Endod.* 26:331–334.

Skoog AD, Leary JL (1994). Análisis Instrumental, 4ta edición, McGraw-Hill.

Spångberg L, Engström B, Langeland K (1973). Biologic effects of dental materials. Toxicity and antimicrobial effect of endodontic antiseptics *in vitro*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 36: 856–864.

Stojicic S, Zivkovic S, Qian W, Zhang H, Haapasalo M (2010). Tissue dissolution by sodium hypochlorite: effect of concentration, temperature, agitation and surfactant. *J Endod.* 36:1558–1562.

Thomas y Sem (2010). An in vitro spectroscopic analysis to determine whether Para-Chloroaniline is produced from mixing Sodium Hypochlorite and Chlorhexidine. *J Endod* 36, 315-317.

Triada, M. (2004). Estadística. (9ª ed.). México: Pearson educación.

World Health Organization (2006). IARC monography on the evaluation of carcinogenic risks to human. *International Agency for Research on cancer*. Lyon, France 86:1–25.

Zehnder M (2006). Root canal irrigants. *J. Endod* 32: 389–98.

## ANEXOS

### ANEXO 1

#### PROTOCOLO DE IRRIGACIÓN

##### PRIMERA SESIÓN:

1. Cavidad de acceso: Realizar la cavidad de acceso endodóntico en esmalte dentario con una piedra redonda de alta velocidad (0.12, 0,14, 0.16) de acuerdo al tamaño de la cámara pulpar del diente, refrigerando hasta llegar a dentina. En dentina, cortar con fresas de carburo-tungsteno redondas de baja velocidad de acuerdo a la anatomía del diente hasta realizar la comunicación con la cámara pulpar. Una vez que se comunique, irrigar con NaClO al 5% utilizando una Jeringa de Irrigación Monoject 3mL + Aguja (27x1 1/4). Continuar con el destechamiento de la cámara pulpar, con la misma fresa con movimientos de tracción de adentro hacia afuera. Una vez finalizado el destechamiento, realizar el cateterismo con una lima K fina #10 o #15 graduada a dos tercios de la longitud aparente del diente medida en la radiografía previa, irrigando durante todo el procedimiento con NaClO al 5%.

##### ➔ **Recolección Nº 1**

A continuación, realizar los desgastes compensatorios que en dientes anteriores corresponden al bisel incisal y desgaste de la convexidad palatina y en premolares abordan las vertientes internas de las cúspides vestibular y palatina, con una fresa llama o Endo-Z de baja velocidad.

2. Preparación de los tercios cervical y medio (Crown Down) con fresas Gates-Glidden. La secuencia utilizada se elige de acuerdo al calibre del canal radicular en los tercios cervical y medio. Las fresas deben graduarse a los dos tercios de la longitud aparente del diente medida en la radiografía previa.

En canales amplios utilizar la secuencia 3-2-1 y en canales medios la secuencia 1-2-1 irrigando con NaClO al 5% entre cada paso de fresa Gates-Glidden. → **Recolección Nº 2**

3. Determinación de la Longitud de Trabajo (LT): Se realiza introduciendo la lima hasta que se visualice la punta de esta a través del foramen apical. Se deja la punta de la lima al ras del foramen y se calcula su longitud, la que corresponde a la longitud real del diente (LRD). La longitud de trabajo (LT) se define a -1mm de la LRD.
4. Preparación del tercio apical: Definir la lima maestra (LM) de acuerdo al calibre del canal radicular en apical. En canales de calibre medio instrumentar hasta alcanzar una LM #35 y en canales amplios una LM #45. Irrigar con NaClO al 5 % entre cada paso de lima. → **Recolección Nº 3**
5. Retroceso (Step-Back) desde la LM hasta alcanzar el diámetro de la última fresa Gates Glidden utilizada al realizar el Crown Down (en la mayoría de los casos coincide con la fresa Gates Glidden #1 diámetro #50). Con esto se consigue unir la instrumentación del tercio apical con la preparación de los tercios cervical y medio del canal (Técnica Corono-Apico-Medial). Irrigar con NaClO al 5 % entre cada paso de lima. → **Recolección Nº4**
6. Secado del canal radicular con conos de papel.
7. Irrigación (IRR) con suero fisiológico. Irrigar con 3 jeringas de 3 mL cada una. → **Recolección Nº 5, 6 y 7**
8. Secado del canal radicular con conos de papel.
9. IRR con 1mL de EDTA al 10% durante 1 minuto. → **Recolección Nº 8**
10. Secado del canal radicular con conos de papel.

11. IRR con suero fisiológico. Irrigar con 3 jeringas de 3 mL cada una.  
→ **Recolección N° 9, 10 y 11**
12. Secado del canal radicular con conos de papel.
13. IRR con CHX al 2%. Irrigar con 1 jeringa de 3 mL. → **Recolección N° 12**
14. Doble sellado: Obturar la cavidad de acceso del diente con doble sellado, Fermín y Vidrio Ionómero de autocurado y sellar el ápice con cera rosada. Luego, colocar el diente en vial con suero fisiológico y estufa a 37° Celsius por una semana (tiempo habitual de medicación intracanal), simulando las condiciones del medio oral.

### **SEGUNDA SESIÓN:**

1. IRR con CHX 2%. Irrigar con 1 jeringa de 3 mL repasando con la LM.  
→ **Recolección N° 13**



## ANEXO 2

### FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

#### TOMA DE MUESTRAS DENTARIAS PARA PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

“Determinación de concentración de Hipoclorito de Sodio al 5% y formación de Paracloroanilina durante el tratamiento endodóntico en dientes extraídos”

El propósito de esta información es ayudarle a tomar la decisión de participar, o no, en una investigación médica.

Gabriela Quiroz Dickson, alumna de Odontología que realiza su Tesis de Pregrado en el Departamento de Odontología Conservadora de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, bajo la tutoría de la Dra. Alejandra Fuenzalida Muñoz, está realizando un estudio cuyo objetivo es medir los volúmenes de eluidos recogidos durante el tratamiento endodóntico en dientes extraídos para luego determinar el volumen y concentración del compuesto formado entre Hipoclorito de Sodio 5% y Clorhexidina 2%.

Todos los datos relacionados con su persona e información personal serán guardados de forma confidencial. Las muestras serán almacenadas indefinidamente, con un código, hasta su utilización en el laboratorio para el fin anteriormente explicado y se utilizarán únicamente para el propósito de esta investigación.

Su participación en esta investigación es completamente voluntaria, sin que su decisión afecte la calidad de la atención médica que le preste nuestra institución. Usted no se beneficiará económicamente por participar en esta investigación y el estudio no tendrá costos para usted.

Es posible que los resultados obtenidos sean presentados en revistas y conferencias médicas, sin embargo su identidad e información personal no será divulgada.

Si usted desea conocer los resultados de los análisis, deberá preguntarle al alumno responsable (Nombre: Gabriela Quiroz Dickson; Celular: 74888290)

He leído lo anteriormente descrito, se me ha explicado el propósito de esta investigación médica y mis dudas han sido aclaradas. Con mi firma voluntaria de este documento consiento a donar mis dientes extraídos para este estudio de investigación. Se me entregará una copia firmada de este documento y si solicito información, ella me será entregada por los investigadores.

---

Nombre del donante

---

Fecha

Firma del donante

---

Nombre del individuo que obtiene el consentimiento

Firma

### ANEXO 3

#### DISPOSITIVO PARA TOMA DE MUESTRAS

El dispositivo para toma de muestras fue creado, diseñado y construido por el Dr. Mauricio Ruiz Nolf. Los materiales de construcción usados fueron elementos roscados de bronce (niples, conos de expansión y tees), cañería de cobre recocido de 3/16" de diámetro, un frasco de vidrio con tapa roscable de 28 mL de capacidad, aproximadamente 10 cm de manguera de poliamida negra de 3 mm de diámetro, y una aguja de grado médico 23G.

En la Figura 3 se muestra el esquema del dispositivo. El vacío del eyector en a1 se transmite a través de la cañería a2 y de la tee a3 hasta el interior del contenedor de vidrio a4. El vacío dentro del contenedor a4 se aplica sobre la manguera de poliamida a5 hasta la aguja a6. Finalmente, el vacío se ejerce en la punta de la aguja en el canal radicular a7, lo que permite la succión de los fluidos contenidos dentro de la cavidad pulpar en dirección al frasco contenedor a4.

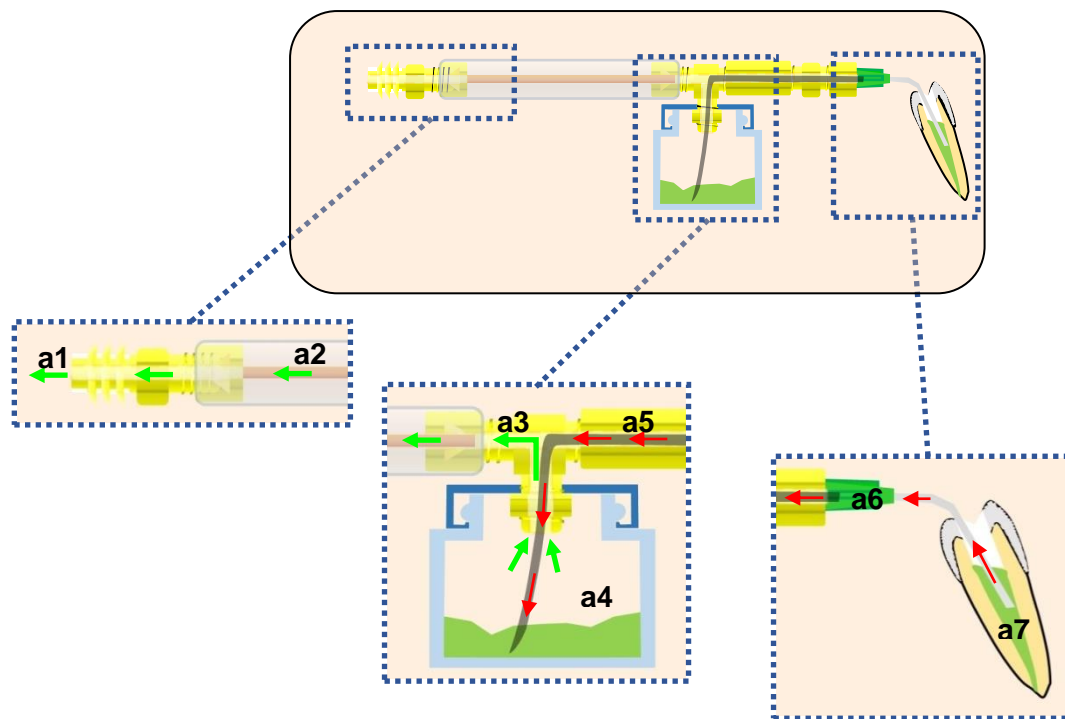


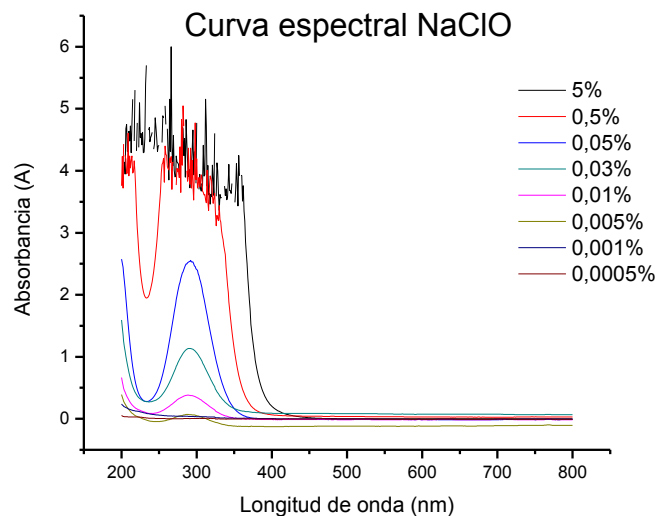
Fig. 3. Esquema del dispositivo para toma de muestras

## ANEXO 4

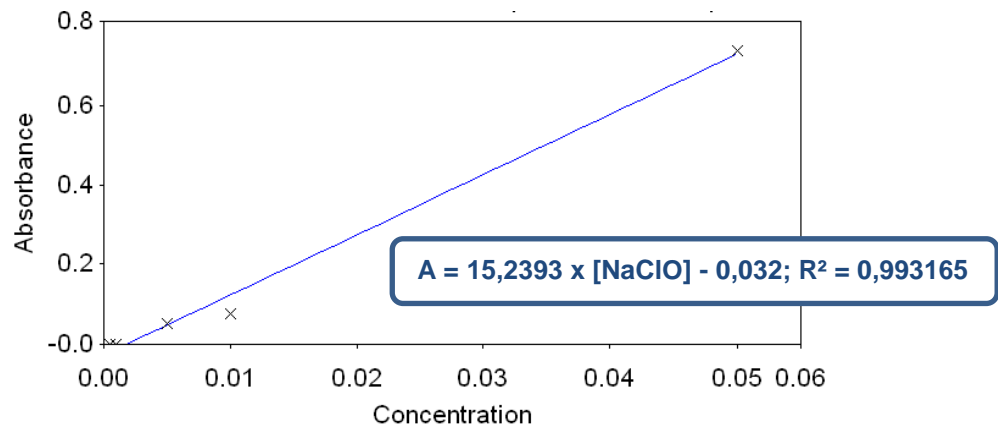
## PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO

a. Determinación del espectro de absorción y concentración de NaClO:

Se tomó 1 mL de solución de NaClO al 5%, se leyó su absorbancia (A) en el rango UV-visible (200-800 nm) y luego se graficaron los datos obtenidos para obtener su curva espectral. Los altos niveles de absorbancia no permitieron determinar el  $\lambda_{max}$ . Por lo tanto, a partir de la solución de NaClO al 5% se realizaron una serie de diluciones seriadas, obteniendo así soluciones de concentración conocida. En estas diluciones se determinó la longitud de onda a la cual el NaClO tiene máxima absorbancia, el  $\lambda_{max}$ , y se construyó la curva de calibración (Gráfico 2), entre 0,0005% y 0,05%, la cual se utilizó para determinar la concentración de NaClO en las muestras recolectadas.



**Gráfico 1: Espectros de Absorción de NaClO al 5% y diluciones a distintas concentraciones.  $\lambda_{max}$ : 292 nm.**

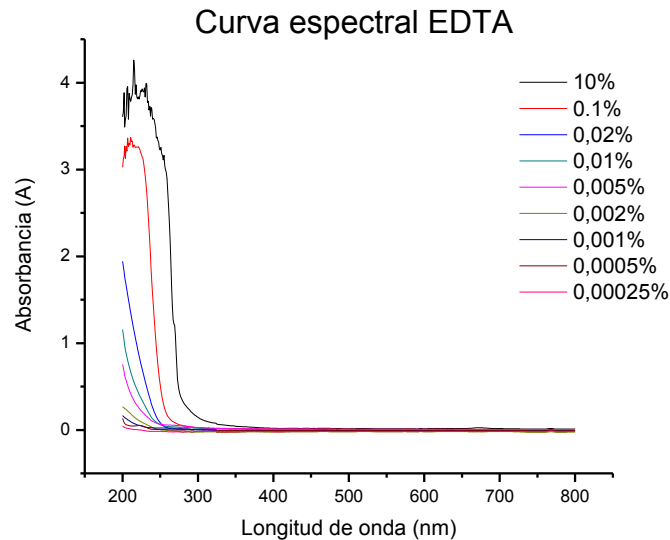


**Gráfico 2: Curva de Calibración del NaClO**

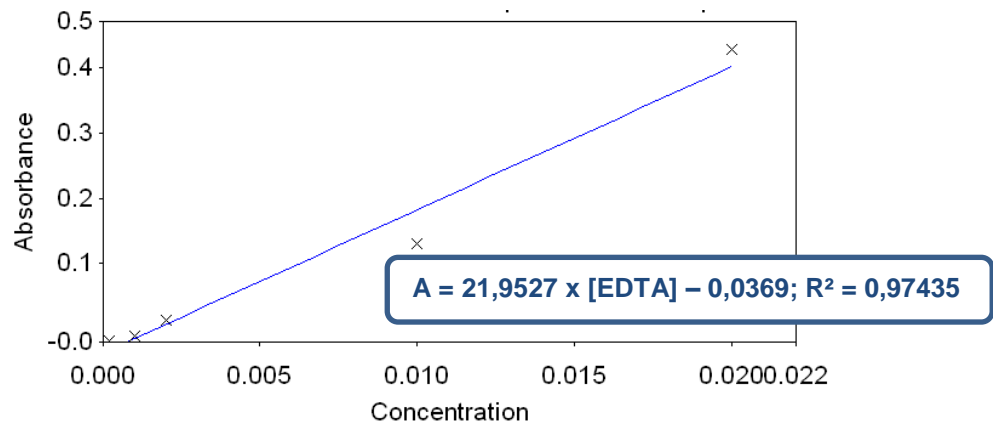
Debido a que los valores de absorbancia obtenidos en las muestras recolectadas de las fases del tratamiento 1, 2, 3 y 4 medidas a  $\lambda_{max}$  de 292 nm, fueron mayores a los comprendidos en la curva de calibración, éstas se diluyeron por un factor de 100 y nuevamente se les midió su absorbancia. Posteriormente, se interpolaron los valores de absorbancia en la ecuación obtenida de la curva de calibración ( $A = 15,2393 \times [\text{NaClO}] - 0,032$ ;  $R^2 = 0,993165$ ) y se multiplicó el resultado por el factor de dilución para conseguir la concentración final de NaClO. Finalmente para las muestras 5, 6, 7, 9, 10 y 11 se utilizó el valor de absorbancia directamente en la ecuación de la curva sin diluir la solución.

**b. Determinación del espectro de absorción y concentración de EDTA:**

Se tomó 1 mL de solución de EDTA al 10%, se leyó su absorbancia en el rango UV-visible (200-800 nm) y luego se graficaron los datos obtenidos para obtener su espectro de absorción. Se prepararon una serie de diluciones seriadas a partir de la inicial al 10%, obteniendo soluciones de concentración conocida de EDTA. En estas soluciones se determinó la longitud de onda a la cual EDTA tiene máxima absorbancia ( $\lambda_{max}$ ) y se construyó la curva de calibración (Gráfico 3) entre 0,00025% y 0,02%, la cual se utilizó para establecer la concentración de EDTA en las muestras recolectadas.



**Gráfico 7: Espectros de Absorción del EDTA al 10% y diluciones de distintas concentraciones.  $\lambda_{max}$ : 207 nm.**

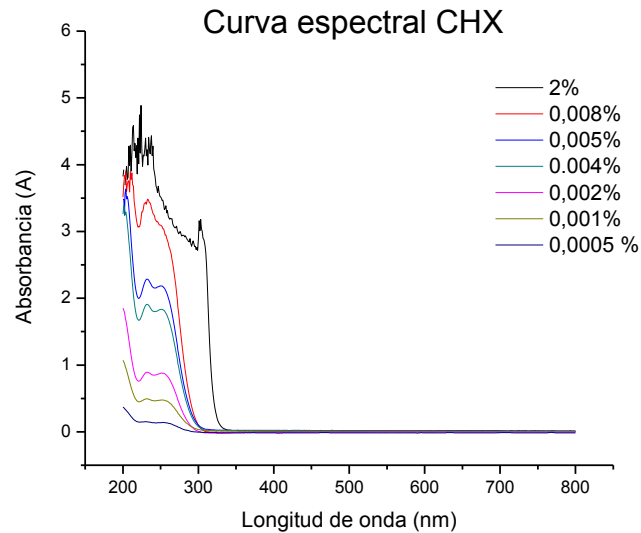


**Gráfico 3: Curva de Calibración del EDTA**

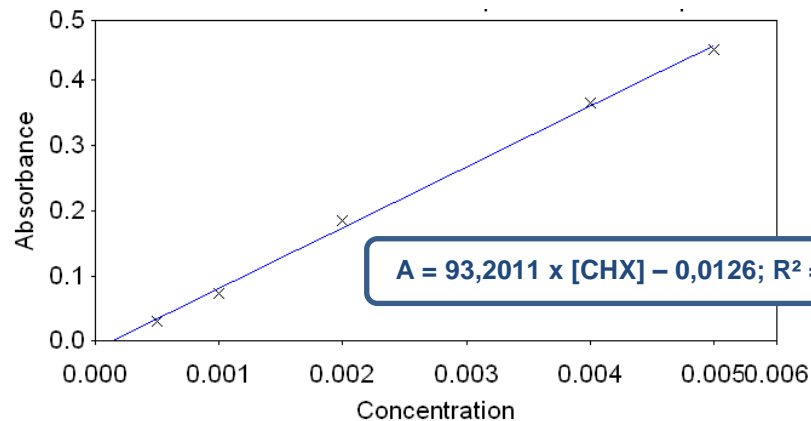
Debido a que los valores de absorbancia obtenidos de la muestra 8, medidas a  $\lambda_{max}$  207 nm, fueron mayores a los comprendidos en la curva de calibración, éstas se diluyeron en un factor de 1000 y nuevamente se les midió su absorbancia. Posteriormente, se interpolaron los valores en la ecuación obtenida de la curva de calibración ( $A = 21,9527 \times [\text{EDTA}] - 0,0369$ ;  $R^2 = 0,97435$ ) y se multiplicó el resultado por el factor de dilución para conseguir la concentración final de EDTA. Finalmente para las muestras 9, 10 y 11 se utilizó el valor de absorbancia directamente en la ecuación de la curva sin diluir la solución.

**c. Determinación del espectro de absorción y concentración de CHX:**

Se tomó 1 mL de solución de CHX al 2%, se leyó su absorbancia en el rango UV-visible (200-800 nm) y luego se graficaron los datos obtenidos para obtener su espectro de absorción. Se prepararon una serie de diluciones seriadas a partir de la inicial al 2%, obteniendo soluciones de concentración conocida de CHX. En estas soluciones se determinó la longitud de onda a la cual la CHX tiene máxima absorbancia ( $\lambda_{max}$ ) y se construyó la curva de calibración (Gráfico 4) entre 0,0005% y 0,005%, la cual se utilizó para establecer la concentración de CHX en las muestras recolectadas.



**Gráfico 8: Espectros de Absorción de CHX al 2% y diluciones a distintas concentraciones.  $\lambda_{max}$ : 254 nm.**



**Gráfico 4: Curva de Calibración de la CHX**

Debido a que los los valores de absorbancia obtenidos de las muestras 12 y 13, medidas a 254 nm ( $\lambda_{max}$ ) fueron mayores a los comprendidos en la curva de calibración, éstas se diluyeron en un factor de 1000 y nuevamente se les midió su absorbancia. Posteriormente se interpolaron los valores de absorbancia en la ecuación obtenida de la curva de calibración ( $A = 93,2011 \times [CHX] - 0,0126$ ;  $R^2 = 0,997919$ ) y se multiplicó el resultado por el factor de dilución para conseguir la concentración final de CHX.

**d. Determinación del espectro de absorción y concentración de PCA:**

Para determinar la concentración de PCA en las muestras se aplicó el protocolo para detección de Paracloroanilina en soluciones de digluconato de clorhexidina, descrito en la Farmacopea Europea (2005), ajustado a la cantidad de muestra que se obtuvo en esta fase del tratamiento.

El protocolo ajustado fue el siguiente:

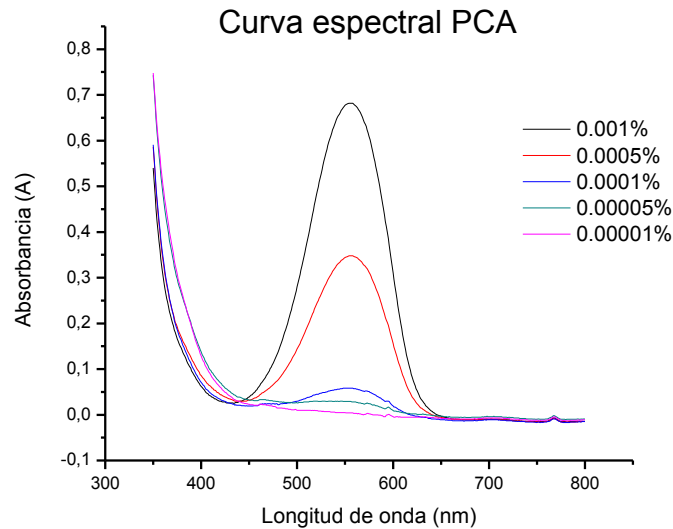
- A 1mL de muestra se agregó 250 $\mu$ L Ácido Clorhídrico diluido (73g/L) y se diluyó hasta 2mL con agua destilada.

Luego, se agregó una serie de soluciones y se agitó la mezcla después de la adición de cada ellas. Las soluciones agregadas fueron las siguientes:

- 36 $\mu$ L de Nitrito de Sodio (solución 100g/L)
- 200 $\mu$ L de Sulfamato de Amonio (solución 50g/L)
- 500 $\mu$ L Naftil etilndiamina dihidrocloruro (solución 1g/L)
- 100 $\mu$ L de Alcohol (solución Etanol 96%)
- Se diluyó hasta 5 mL con agua destilada y se dejó reposar por 30 minutos.



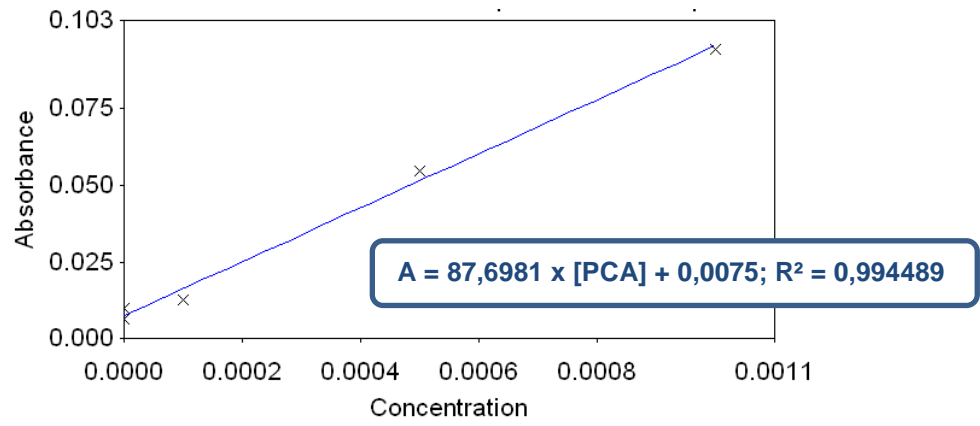
El protocolo fue aplicado a 5 estándares de soluciones de PCA Aldrich® de concentraciones conocidas y se observó un cambio de coloración (rojo- azul) de diferente intensidad según la concentración de PCA. Se leyó su absorbancia en el rango visible (350–800 nm) y con los datos obtenidos se construyó la curva espectral (Gráfico 5) para determinar su  $\lambda_{max}$ .



**Gráfico 5: Espectros de Absorción de soluciones de PCA a distintas concentraciones, luego de ser sometidos al protocolo de identificación de PCA.**

$\lambda_{max}$ : 552 nm.

Con las soluciones estándares y el  $\lambda_{max}$  se construyó la curva de calibración (Gráfico 6), la cual se utilizó para determinar la concentración de PCA en las muestras recolectadas, a través de la ecuación  $A = 87,6981 \times [PCA] + 0,0075$ ;  $R^2 = 0,994489$ .



**Gráfico 6: Curva de Calibración de PCA**