



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

**ROL DEL ALCOHOL 70% EN LA FORMACIÓN DE PARACLOROANILINA *EX VIVO* EN TRATAMIENTO ENDODÓNTICO TRAS SER UTILIZADO COMO IRRIGANTE INTERMEDIO ENTRE HIPOCLORITO DE SODIO 5% Y CLORHEXIDINA 2%.**

**María Angélica Reyes Roldán**

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

**ROL DEL ALCOHOL 70% EN LA FORMACIÓN DE PARACLOROANILINA *EX VIVO* EN TRATAMIENTO ENDODÓNTICO TRAS SER UTILIZADO COMO IRRIGANTE INTERMEDIO ENTRE HIPOCLORITO DE SODIO 5% Y CLORHEXIDINA 2%.**

**María Angélica Reyes Roldán**

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**

Quiero agradecer:

A mi familia, amigos y pololo por el amor, el apoyo y el cariño que me han entregado en toda esta etapa.

Al Profesor Ismael Yévenes, Dra. Alejandra Fuenzalida, Dr. Mauricio Ruiz por la preocupación, buena disposición y ayuda durante todo este año. A los docentes, funcionarios y a mis amigas de la universidad que me permitieron tener una vida universitaria increíble. Especial agradecimiento a Gabriela Quiroz D. por ser una excelente amiga, entregarme su compañía y amor durante el desarrollo de todo este proyecto.

A Carmen Gloria Castillo por haberme entregado increíbles herramientas para mi proceso.

Infinitas gracias.

# ÍNDICE

## Contenido

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>MARCO TEÓRICO</b> .....	3
1. <u>Hipoclorito de Sodio (NaClO)</u> .....	5
2. <u>Clorhexidina (CHX)</u> .....	7
3. <u>Acido etildiaminotetraacético (EDTA)</u> .....	8
4. <u>Interacción entre Irrigantes</u> .....	9
5. <u>Paracloroanilina (PCA)</u> .....	10
6. <u>Alcohol</u> .....	11
7. <u>Espectrofotometría</u> .....	13
<b>HIPÓTESIS</b> .....	14
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	14
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	14
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	15
1. <u>Tipo de estudio</u> .....	15
2. <u>Materiales</u> .....	15
3. <u>Selección de la muestra</u> .....	17
4. <u>Obtención y almacenamiento de muestras</u> .....	17
5. <u>Tratamiento endodóntico y obtención de las muestras</u> <u>de las fases del tratamiento</u> .....	18
6. <u>Procedimientos de Laboratorio</u> .....	21
a. Determinación del espectro de absorción y concentración de NaClO, EDTA y CHX : .....	22
b. Determinación del espectro de absorción y concentración de alcohol: ....	25

c. Determinación del espectro de absorción y concentración de NaCl:.....	27
d. Determinación del espectro de absorción y concentración de PCA: .....	29
7. <u>Análisis estadístico</u> .....	30
<b>RESULTADOS</b> .....	31
1. <u>Concentración NaClO</u> .....	31
2. <u>Concentración EDTA</u> .....	32
3. <u>Concentración CHX</u> .....	33
4. <u>Concentración PCA</u> .....	34
<b>DISCUSIÓN</b> .....	35
<b>CONCLUSIONES</b> .....	40
<b>REFERENCIAS</b> .....	41
<b>ANEXOS</b> .....	45
Anexo 1: Protocolo de Irrigación .....	45
Anexo 2: Formulario de consentimiento informado.....	48
Anexo 3: Dispositivo para toma de muestras.....	50
Anexo 4: Método para determinación del espectro de absorción y concentración del hipoclorito de sodio, EDTA, Clorhexidina y PCA.....	51

## LISTA DE ABREVIACIONES

<b>Abreviación</b>	<b>Significado</b>
<b>CHX</b> .....	Clorhexidina
<b>EDTA</b> .....	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>IRR</b> .....	Irrigación
<b>NaClO</b> .....	Hipoclorito de sodio
<b>NaCl 0,9%</b> .....	Suero fisiológico
<b>PCA</b> .....	Paracloroanilina
<b>PQM</b> .....	Preparación quimio-mecánica
<b>SCR</b> .....	Sistema de Canales Radiculares

## RESUMEN

**Introducción:** La desinfección del SCR no se logra con un sólo irrigante por lo que es necesario el uso combinado de sustancias en una secuencia específica para obtener el éxito terapéutico. Sin embargo, si un irrigante no es completamente eliminado antes de aplicar el siguiente, al entrar en contacto pueden formar subproductos como la paracloroanilina, compuesto tóxico resultado de la interacción de NaClO y CHX que interfiere en la desinfección y sellado de SCR.

**Objetivo:** Determinar *ex vivo* si el alcohol 70%, usado como irrigante intermedio entre NaClO 5 % y CHX 2%, evita la formación de PCA dentro del canal radicular.

**Metodología:** 30 dientes extraídos (*ex vivo*) fueron divididos en 2 grupos: experimental (20 dientes) y grupo control (10 dientes). A ambos se les realizó un tratamiento de endodoncia utilizando el protocolo de irrigación de la Facultad de Odontología de la U. de Chile. En el grupo experimental se usó alcohol al 70% como irrigante intermedio y en el grupo control, suero fisiológico. Se recolectaron 13 volúmenes correspondientes a las distintas fases del tratamiento y se determinó por medio de espectrofotometría la concentración de NaClO, EDTA, CHX y paracloroanilina de las muestras obtenidas.

**Resultados:** Al momento de la medicación se detectó una concentración de PCA de 0,00345% en el grupo control y de 0,00233% en el experimental, existiendo diferencia significativa entre ambos grupos. La concentración de NaClO durante la PQM llega a 4,737% en el grupo control y 4,853% en el grupo experimental. Sin embargo, antes de utilizar la CHX alcanza una concentración de 0,00308% en el grupo control y de 0,00229% en el experimental. Las concentraciones de CHX 2% en fases 12 y 13 fueron similares para ambos grupos.

**Conclusiones:** La utilización de alcohol al 70% como irrigante intermedio entre la irrigación con NaClO 5% y con CHX 2%, disminuye de manera significativa la formación de PCA al momento de la medicación intracanal, en comparación con el suero fisiológico.

## INTRODUCCIÓN

El éxito del tratamiento endodóntico se logra con un correcto sellado tridimensional, en conjunto con la eliminación completa de microorganismos, tejido pulpar inflamado y restos necróticos del sistema de canales radiculares (SCR) (Bystrom, 1981). Está demostrado que la colonización de bacterias en el SCR o la persistencia de ellas después del tratamiento, provocan la formación lesiones periapicales (Takehashi, 1965. Lin et al, 2006).

Debido a la compleja anatomía del SCR, la instrumentación mecánica no es capaz de remover todo el tejido orgánico y microorganismos alojados en el interior del canal, por lo que se hace necesario el uso de soluciones irrigantes para conseguir la correcta desinfección del canal (Prado, 2013).

Los irrigantes utilizados en endodoncia deberían tener características y propiedades que les permitan cumplir con los objetivos de la irrigación. Basrani y Haapasalo (2012) han establecido una serie de características deseables de una solución irrigadora:

- 1) Efectiva germicida y fungicida.
- 2) No irritante para los tejidos periapicales.
- 3) Estable en solución.
- 4) Prolongado efecto antimicrobiano y sostenido efecto antibacteriano después de su uso.
- 5) Activa en presencia de sangre, suero y proteínas derivadas de los tejidos.
- 6) Capaz de eliminar por completo el barro dentinario.
- 7) Baja tensión superficial.
- 8) Capaz de desinfectar la dentina/ túbulos dentinarios.
- 9) Que no interfiera con la reparación de los tejidos periapicales.
- 10) Que no tiña la estructura dentaria.
- 11) Inactiva en un medio de cultivo.
- 12) Que no induzca una respuesta inmune mediada por células. Que sea limpia, no tóxica y no carcinogénica para tejidos celulares que rodean el diente.

- 13) Que no tenga efectos adversos en las propiedades físicas de la dentina expuesta.
- 14) Que no tenga efecto adverso en la capacidad de sellado de los materiales de relleno.
- 15) Fácil uso.
- 16) Fácil acceso (bajo costo)

Lamentablemente, no existe un sólo irrigante que cumpla con todos los requisitos ideales, por ello la irrigación óptima se basa en el uso combinado de dos o más sustancias usadas en una secuencia específica para obtener el éxito terapéutico (Haapasalo, 2010).

Al usar una combinación de irrigantes, generalmente la solución irrigante que está siendo utilizada no es completamente eliminada del SCR antes de aplicar la siguiente, y como resultado ambas entran en contacto dentro del canal radicular pudiendo formar subproductos (Basrani y cols. 2007, Rasimick y cols. 2008) como por ejemplo la paracloroanilina (PCA), precipitado que puede ocluir los túbulos dentinarios, alterar el sellado de la obturación del canal o incluso ser tóxico para los tejidos periapicales (Krishnamurthy, 2010). Es indispensable el uso de un irrigante alternativo para prevenir la formación de este precipitado que se forma al entrar en contacto el hipoclorito de sodio con la clorhexidina (Mortenson y cols. 2012).

Por lo expuesto anteriormente, el propósito de este estudio es determinar *ex vivo* el efecto del alcohol al 70% en la formación de paracloroanilina, al ser usado como irrigante intermedio entre NaClO al 5% y CHX al 2%.

## MARCO TEORICO

La instrumentación mecánica es capaz de reducir el número de bacterias, pero no es suficiente para su total eliminación debido a la compleja anatomía del SCR (Bystrom, 1981). Por esto es necesario complementar la instrumentación con sustancias químicas con acción antimicrobiana que permitan una correcta desinfección. Entre los medios químicos para el control de la infección en el SCR, se encuentran la medicación intracanal y las soluciones irrigantes usadas durante la preparación químico-mecánica (PQM) del canal (Haapasalo, 2010).

### I. Medicación Intracanal

La medicación intracanal consiste en la colocación de un fármaco al interior del canal entre las sesiones necesarias para la conclusión del tratamiento (Soares y Goldberg, 2004).

En canales radiculares infectados, la medicación intracanal se ha defendido para muchos propósitos. Estos son:

- a) Eliminar bacterias que quedan después de la instrumentación del canal.
- b) Reducir la inflamación de los tejidos periapicales.
- c) Mantener asepsia conseguida con la PQM y neutralizar los restos de tejido orgánico.
- d) Actuar como una barrera contra la filtración de la obturación temporal.
- e) Ayudar a controlar exudado en canales persistentemente húmedos (Chong BS, 1992).

Sin embargo, numerosos estudios cuestionan el uso de medicación intracanal y se sugiere su uso sólo en la desinfección y mantención de la asepsia de canales radiculares infectados, teniendo un papel secundario a la limpieza y conformación del canal radicular. En aquellos casos donde el diente no responde al tratamiento, se recomienda un estudio bacteriológico para ayudar en la elección del medicamento intracanal (Chong, 1992).

Hasta hace un tiempo, el formocresol fue utilizado con frecuencia como medicamento intracanal, pero esta sustancia química bactericida podría inducir diversos efectos nocivos incluyendo alergias. Además, debido a que este medicamento es un potente agente cancerígeno, no hay ninguna indicación para esta sustancia química en el tratamiento de endodoncia moderna. Hoy en día, la biocompatibilidad y la estabilidad son requisitos esenciales para los medicamentos intracanal (Kawashima, 2009).

El hidróxido de calcio es utilizado como un medicamento intracanal, ya que es estable durante largos períodos de tiempo, inofensivo para el cuerpo y bactericida para algunos microorganismos. También induce la formación de tejido duro y es eficaz para controlar exudados inflamatorios (Kawashima Nagragar, 2009). Debido a su acción antibacteriana limitada sobre algunas cepas microbianas, se ha propuesto el uso de CHX 2% como medicación intracanal. Una revisión sistemática del año 2009 concluyó que la CHX 2%, usada como medicación intracanal, fue más efectiva que el  $\text{Ca(OH)}_2$  en eliminar a *Enterococcus faecalis*, bacteria más frecuentemente encontrada en dientes con fracasos endodónticos (Mohammadi, 2009). Una revisión sistemática y metaanálisis del año 2014 concluyó que el *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) es resistente a la medicación con hidróxido de calcio ( $\text{Ca(OH)}_2$ ) y que la mezcla de  $\text{Ca(OH)}_2$  con CHX 2% no mejora su propiedad antibacteriana frente a esta cepa (Saatchi, 2014).

## II. Irrigación en el SCR

La irrigación en endodoncia es un proceso que se define como el lavado y aspiración de todos los restos y sustancias, ya sean preexistentes o creados por la instrumentación, que puedan estar contenidos en la cámara pulpar o en el canal radicular (Marchesan y cols., 2007). Por una parte cumple con **objetivos biológicos** que se relacionan con el efecto antimicrobiano (disminución de microorganismos anaeróbicos y facultativos en su estado libre y en biofilm, inactivación de endotoxinas) en ausencia de reacciones alérgicas o dañinas al individuo. Asimismo, cubre **objetivos químicos y mecánicos** que se refieren a la capacidad de disolver tejido orgánico e

inorgánico, eliminar detritus, lubricar el canal, desinfectar y prevenir la formación de barro dentinario durante la instrumentación o disolverlo una vez que se ha formado (Basrani & Haapasalo, 2012). La irrigación tiene algunas desventajas relacionadas con los efectos potencialmente dañinos de las soluciones irrigantes, que dependerán del tipo de sustancia química, su concentración, el tiempo de exposición y de la secuencia de soluciones utilizadas dentro del canal (Haapasalo, 2012).

Se describirán a continuación las características de los irrigantes más utilizados durante el tratamiento endodóntico.

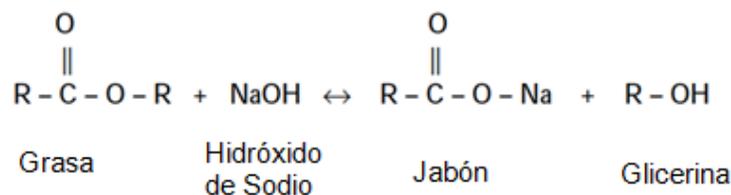
### **Hipoclorito de sodio (NaClO)**

Es el irrigante de elección durante el tratamiento endodóntico, eficaz contra los microorganismos patógenos y con la capacidad de degradación del tejido orgánico vital o necrótico (Basrani & Haapasalo, 2012).

El NaClO en contacto con las proteínas del tejido orgánico, forma nitrógeno, formaldehído y acetaldehído. El hidrógeno del grupo amino es remplazado por cloro formando cloramina, reacción importante en el efecto antimicrobiano de este irrigante (Haapasalo, 2010).

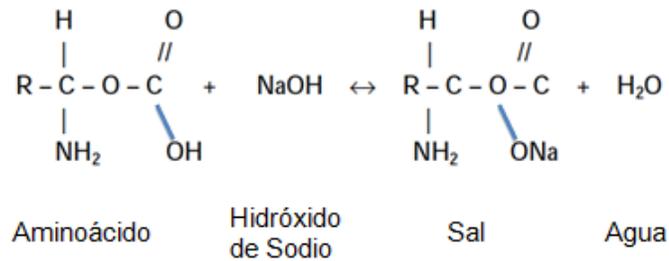
El NaClO opera mediante tres mecanismos de acción (Estrela y cols, 2002):

- a) Saponificación: Actúa como solvente orgánico al ser capaz de degradar grasas en sales de ácidos grasos (jabón) y glicerina (Fig. N°1).



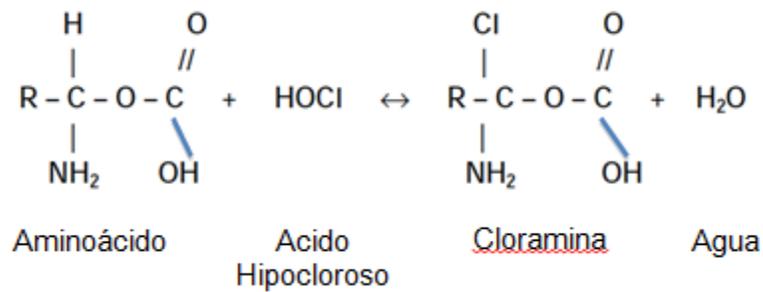
**Figura N° 1: Reacción de saponificación**

- b) Neutralización: Neutraliza aminoácidos formando agua y sales. Con la salida de iones hidroxilo del medio se reduce el pH (Fig. N° 2).



**Figura N°2: Reacción de neutralización**

- c) Cloraminación: Es la interacción del cloro y el grupo amino con la formación de cloraminas, las que interfieren en el metabolismo celular de las bacterias. Esta acción antibacteriana se debe a la inhibición de enzimas esenciales de las bacterias por medio de la oxidación (Fig. N° 3).



**Figura N° 3: Reacción de cloraminación**

El NaClO es usado comúnmente en concentraciones entre 0,5% y 6%, siendo un tema bastante controversial. Algunos estudios *in vitro* muestran que el NaClO en alta concentración, tiene mayor efectividad antimicrobiana sobre *E. faecalis* y *C. albicans* y mejor habilidad de disolver tejidos en comparación con una baja concentración. Sin embargo, se ha demostrado que puede ser más tóxico (Gomes, 2001, Hand, 1978).

El NaClO es capaz de eliminar también el componente orgánico del barro dentinario generado durante la instrumentación mecánica del canal radicular. El

contenido inorgánico del barro dentinario es posible de remover del interior del canal con una irrigación final con EDTA o Ácido Cítrico. Sin embargo, el uso de NaClO posterior al EDTA potencia la erosión en las paredes dentinarias, por lo que no se recomienda irrigar nuevamente con NaClO después de la irrigación final con EDTA (Niu, 2002).

La efectividad del NaClO se ve influenciada por la concentración, la temperatura, el volumen, el tiempo y el flujo de irrigación (Basrani, 2012). Además, se ha demostrado que en presencia de materia orgánica (exudado inflamatorio, tejido remanente y bacterias) se debilita su capacidad como antibacteriano (Haapasalo 2010). Por lo tanto, en estos casos, grandes volúmenes de irrigante, junto con el recambio constante de éste dentro del SCR mejora la efectividad del mismo.

Dentro de las desventajas de este irrigante se mencionan el sabor desagradable, la posibilidad de producir daños a nivel de la piel y ojos, la fuerte irritación que puede causar en los tejidos periapicales en caso de ser propulsado más allá del foramen y la incapacidad de remover el barro dentinario por sí solo, ya que como se mencionó, sólo remueve la parte orgánica de éste (Spangberg, 1973, Basrani, 2012). Adicionalmente, un estudio del año 2001 demostró que soluciones de NaClO en la superficie dentaria producen una disminución en el módulo de elasticidad y flexural de los tejidos en contacto con este irrigante, afectando las propiedades mecánicas de la dentina a través de la degradación de sus componentes orgánicos (Grigoratos, 2001).

### **Clorhexidina (CHX)**

La CHX es una molécula catiónica. Su mecanismo de acción consiste en permeabilizar la pared celular de la membrana externa de las bacterias y atacar así el citoplasma bacteriano.

Su estructura catiónica ofrece una propiedad única llamada sustantividad. Se une de forma reversible con las proteínas de la saliva y la hidroxiapatita del diente, actuando en dentina hasta 12 semanas posterior a su uso (Mohammadi, 2009). Dependiendo de su concentración, tiene efectos bacteriostáticos (baja concentración) y

bactericidas (alta concentración) (Basrani, 2005). La concentración que se utiliza en endodoncia es del 2% dado que presenta mejor eficacia antibacteriana tanto en irrigación como en medicación intracanal (Basrani & Haapasalo, 2012. Zaman, 2003). Posee un amplio espectro de actividad contra bacterias tanto Gram positivas y Gram negativas. Además, es un antifúngico efectivo especialmente con *C. Albicans* (Basrani & Haapasalo, 2012).

La CHX no posee las características indeseables del hipoclorito (mal sabor, fuerte irritación periapical, entre otras). Sin embargo, no posee la capacidad de disolver el tejido orgánico ni inorgánico ni tampoco actúa sobre el biofilm bacteriano, por lo que no es posible utilizarlo como un único irrigante en endodoncia y se utiliza sólo en determinadas etapas de la terapia (Haapasalo, 2010).

### **Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)**

El EDTA es un irrigante que actúa por quelación y elimina la parte mineralizada de barro dentinario cuando es usado posterior a la irrigación con NaClO por un período de 30 segundos a 2 minutos. Se describe un pequeño efecto antibacteriano, ya que extrae proteínas de la superficie bacteriana mediante la combinación con iones metálicos de la envoltura celular, lo que eventualmente podría conducir a la muerte celular (Basrani & Haapasalo, 2012).

Se utiliza normalmente a concentraciones que van desde el 10 al 17% (Basrani, 2012). La concentración al 17% es la más utilizada; sin embargo, algunos estudios indican que a una menor concentración (10%, 5% e incluso 1%) de igual forma es capaz de remover el barro dentinario cuando se utiliza posterior al NaClO (Sen BH y cols 2009).

La capacidad quelante del EDTA dentro del canal radicular depende del tiempo de contacto. Se sugiere que la exposición no sea mayor a 1 minuto, ya que en ese tiempo resulta efectivo en la remoción del barro dentinario (Calt y cols 2002). Por otra parte, se ha visto que el volumen de irrigación no es un factor que influye en la capacidad de remoción del barro dentinario. Un estudio *in vitro* demostró que el uso de 1ml de EDTA al 17% en contacto por 1 minuto con la pared del canal radicular fue tan efectivo como el uso de 10ml de este irrigante (Crumpton, 2005).

## **Interacción entre irrigantes**

Como ya se ha mencionado, la irrigación en endodoncia involucra la combinación de dos o más sustancias en una secuencia específica para lograr una desinfección óptima del SCR (Haapasalo, 2010).

Se ha demostrado que cuando un irrigante no es eliminado completamente del canal radicular antes de aplicar el siguiente irrigante, ambos entran en contacto y pueden interactuar y formar subproductos (Krishnamurthy S, 2010). Estos subproductos pudieran generar precipitados que al depositarse en las paredes del canal radicular formen una barrera que interfiera con los procesos de desinfección y posterior sellado del SCR. Al interferir con el sellado, pudieran convertirse en vías de filtración posterior del relleno endodóntico condicionando el fracaso del tratamiento. (Basrani, 2009). Además, los compuestos generados por la interacción de los irrigantes pueden llegar a ser tóxicos para los tejidos periapicales (Baumgartner, 1987).

En el protocolo clínico de irrigación sugerido por Zehnder, el tratamiento de la dentina antes del sellado canal radicular consta de irrigación con NaClO para disolver los componentes orgánicos, irrigación con EDTA para eliminar el componente inorgánico del barro dentinario y el uso de CHX para aprovechar el espectro de actividad antimicrobiana y la penetración de la CHX dentro de los túbulos considerando la propiedad de sustantividad que posee este irrigante (Zehnder, 1998 y 2006).

Al utilizar EDTA y NaClO combinados, se reduce la cantidad de hipoclorito de sodio al no quedar cloro libre, provocando una disminución de la capacidad de disolver tejido y de la actividad antimicrobiana de este irrigante, por lo que estas soluciones se deben utilizar por separado (Zehnder y cols. 2005, Rossi-Fedele y cols.,2012).

La combinación de EDTA con CHX forma un precipitado producto de la degradación química de CHX. Basándose en los resultados de su estudio, Rasimick (2008) concluyó que la CHX forma una sal al interactuar con el EDTA en lugar de experimentar una simple reacción química. Esta sal dentro del canal radicular puede obliterar los túbulos dentinarios, pudiendo interferir en los procesos de desinfección y posterior sellado del sistema de canales radiculares.

### Interacción entre NaClO y CHX

La combinación de NaClO y CHX que se ha propuesto como protocolo de irrigación en endodoncia, tiene como objetivo aprovechar el espectro antimicrobiano de ambos irrigantes, optimizando la desinfección del SCR. Sin embargo, al interaccionar NaClO y CHX se forma un precipitado insoluble de color naranja-marrón. Aunque no se ha logrado dilucidar exactamente la composición química del precipitado, se ha observado presencia de Ca, Fe y Mg (Marchesan, 2007), además de la presencia de PCA, por lo que a este compuesto se le ha llamado paracloroanilina (PCA). Su color se asocia a la oxidación de la guanidina de la CHX (Basrani y cols., 2007).

La CHX tiene la habilidad de donar protones al ser un ácido dicatiónico (pH 5.5-6.0), mientras que el NaClO al ser alcalino, tiene la capacidad de aceptar los protones de la CHX. Este intercambio de protones resulta en la formación de un compuesto químico neutro e insoluble que precipita. Se asume que este precipitado contiene PCA y que además podría contener otros sub-productos aún no estudiados (Basrani y cols. 2007).

Se ha observado además que la PCA se genera también por hidrólisis de la CHX producto del tiempo, ambiente alcalino y el calor (Basrani y cols. 2007, Yeung y cols. 2007). En un estudio realizado el 2007 por Basrani y cols., se describe que cuando las moléculas de CHX se mezclan con NaClO se hidrolizan en fragmentos más pequeños formando cada uno un sub producto. Esta disociación culmina en la formación de PCA y otros fragmentos. En este estudio se concluyó que la formación y grosor del precipitado está en relación directa con la concentración de NaClO y además 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 (Basrani y cols. 2007).

El precipitado, al ser insoluble, dificulta su remoción del canal y puede llegar a ocluir los túbulos dentinarios y comprometer la permeabilidad dentinaria, interfiriendo con la difusión de irrigantes y medicamentos intracanal. Así podría favorecerse la microfiltración del relleno endodóntico al interferir con la penetración

de los materiales de sellado del SCR. Además, su presencia imparte color a las paredes del canal causando tinción dentaria, afectando la estética del diente (Krishnamurthy y Sudhakaran, 2011).

Por otro lado, la PCA ha demostrado ser tóxica para los seres humanos. Se ha visto que la corta exposición de humano a PCA produce cianosis, que es una manifestación de la formación de metahemoglobina (Basrani, 2012).

### **Irrigantes intermedios.**

Se describen otros irrigantes tales como agua destilada estéril, suero fisiológico (NaCl 0,9%), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), peróxido de urea y compuestos yodados. Todos ellos, exceptuando los compuestos yodados, carecen de acción antibacteriana al ser usados por sí solos y tampoco tienen la capacidad de disolver tejido (Haapasalo, 2010). Sin embargo, se ha establecido el uso de algunas de estas sustancias para evitar la interacción entre los irrigantes usados durante en el protocolo de irrigación del canal radicular. Hay evidencia que respalda el uso de suero fisiológico y agua destilada para evitar la formación de PCA dentro del canal radicular. Algunos reportes han indicado que el uso de alcohol absoluto también podría disminuir la interacción entre irrigantes evitando la formación de este compuesto.

### Alcohol 70%

El alcohol se puede definir como un compuesto orgánico que contiene el grupo funcional hidroxilo (OH) unido a un radical alifático o a alguno de sus derivados (Chang, 2010).

Los alcoholes habitualmente utilizados en endodoncia son el alcohol etílico o etanol en concentraciones de 70% al 96% y el alcohol isopropílico en concentraciones entre el 70% al 100%. Aunque sus aplicaciones son idénticas, se suele usar más el primero debido a que es menos irritante. Además, el alcohol etílico es más potente contra los virus, mientras que el alcohol isopropílico se considera más eficaz contra las bacterias (Sanchez L, 2005).

Los alcoholes actúan destruyendo la membrana celular y desnaturalizando las proteínas. Su eficacia está basada en la presencia de agua, esto se debe a que estos compuestos acuosos penetran mejor en las células y bacterias. Su acción es rápida, incluso desde los 15 segundos y sus efectos biológicos de daño microbiano permanecen por varias horas (Sanchez L, 2005).

Estos compuestos se consideran como un desinfectante de nivel intermedio ya que no tienen acción sobre esporas ni micobacterias, pero sí son capaces de destruir algunos virus no capsulados, bacterias (gram positivas y gram negativas), hongos y virus lipídicos capsulados. Poseen una actividad bactericida rápida, como ya se dijo, favorecida por la presencia de agua y principalmente en concentraciones entre 60% a 90%. A pesar de las propiedades positivas de alcohol, presenta el inconveniente de dañar materiales como caucho o plástico (Keen, 2010).

El alcohol es conocido por deshidratar químicamente la dentina mediante la sustitución del agua unida al colágeno. Este comportamiento es de interés, porque monómeros polares adhesivos a base de disolventes se utilizan a menudo en la odontología clínica para ayudar a lograr la retención micromecánica de materiales compuestos de resina (Nakabayashi, 1998). Tal deshidratación provoca la contracción del tejido y también se ha reportado que aumenta los módulos de tracción y la fuerza de la dentina (Maciel et al, 1996; Pashley y cols, 2001, 2003). De hecho, estudios han demostrado que la resistencia a la fractura y la dureza de la dentina se incrementan por la presencia etanol (Nalla y cols, 2005). Esto sugiere que la deshidratación por el alcohol en realidad puede fortalecer la estructura dentaria. Se debe tener presente que tanto el incremento de la resistencia a la fractura de la dentina, como el efecto del endurecimiento es completamente reversible cuando la dentina se rehidrata con agua (Nalla, 2006).

En la práctica endodóntica, el alcohol es utilizado comúnmente durante el tratamiento para la desinfección y limpieza de la goma dique al realizar la aislación absoluta del diente. Es colocado, además, en recipientes pequeños en el área de trabajo clínico directo para depositar el instrumental rotatorio usado en la realización de la cavidad de acceso del diente. Esto permite mantener la asepsia de estos elementos rotatorios que han tomado contacto con tejido orgánico contaminado,

disminuyendo el riesgo de contaminación cruzada que pueda ser inoculada dentro del canal radicular. Finalmente, se utiliza para la desinfección de superficies en las áreas de trabajo clínico directo con el paciente antes y después de la atención.

Algunos reportes han mencionado otros usos del alcohol absoluto en endodoncia. Se ha visto que el uso de alcohol absoluto como un irrigante intermedio entre NaClO y CHX impide la formación de PCA. Esto se explicaría debido a que el alcohol es un agente volátil, tensioactivo, muy electronegativo que puede penetrar profundamente en los túbulos para eliminar el NaClO residual presente en los canales. Su capacidad volátil también ayudaría en el secado de los canales previo a la obturación del SCR (Short, 2003).

El uso del alcohol absoluto como un irrigante endodóntico aún no ha sido completamente establecido. Krishnamurthy en el año 2010 demostró que al usar alcohol como irrigante intermedio entre NaClO y CHX, no se produjo un precipitado evidente de PCA en comparación con el agua destilada y el suero. Se ha visto que un residuo de 0,05 ml de NaClO 5% necesitaría 50 ml de alcohol al 70 % para minimizar la formación de PCA (Yevenes, 2012).

En la literatura se han demostrado los efectos indeseados de la PCA en el tejido dentario, por lo que es de gran relevancia cuantificar su formación durante el tratamiento endodóntico. Aunque se ha tratado de evitar la formación de este compuesto a través del uso de irrigantes alternativos como el agua destilada, alcohol o suero fisiológico, aún no se ha podido establecer con certeza la forma de evitarlo. Debido a la escasa evidencia existente en relación al uso de alcohol al 70% y su influencia en la formación de PCA dentro del canal radicular, el objetivo de este estudio es determinar *ex vivo*, mediante técnicas espectrofotométricas, el efecto del alcohol al 70% en la formación de PCA al ser usado como irrigante intermedio entre NaClO al 5% y CHX al 2%.

## **HIPOTESIS**

La dilución de hipoclorito de sodio al 5% mediante la irrigación con alcohol al 70% previo al uso de digluconato de clorhexidina al 2% impide la formación de paracloroanilina.

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar *ex vivo* el efecto del alcohol al 70% en la formación de paracloroanilina, al ser usado como irrigante intermedio entre NaClO al 5% y CHX al 2%.

## **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

1. Determinar el  $\lambda$  máx para la medición de NaClO 5%, NaCl 0.9%, Alcohol absoluto, Alcohol 70%, EDTA 10%, CHX 2% y PCA en rango visible y UV.
2. Determinar la concentración de NaClO, EDTA, CHX y PCA formada durante el tratamiento endodóntico en el grupo control y el grupo experimental.
3. Comparar la concentración de PCA formada en tratamiento endodóntico usando suero fisiológico y alcohol 70% como irrigantes intermedios.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Tipo de estudio.

El presente estudio es prospectivo, experimental y explicativo *ex vivo*.

### 2. Materiales.

<b>Tabla N°1. Materiales y reactivos para Procedimientos Clínicos</b>
-Turbina convencional.
-Micromotor y contrángulo convencionales.
-Dispositivo para la toma de muestras (Anexo 3).
-Piedras de diamante redondas de alta velocidad N°12 y N°14, SS White. (SS White Burs, Inc. 1145 Towbin Avenue Lakewood, New Jersey 08701, USA)
-Fresas carbide redondas de baja velocidad N°12 y N°14, SS white. (SS White Burs, Inc. 1145 Towbin Avenue Lakewood, New Jersey 08701, USA)
-Fresas Endo Z de baja velocidad, Maillefer. (Dentsply-Maillefer, Chemin du Verger 3, 1338 Ballaigues, Suisse).
-Fresas Gates Glidden N° 1-2-3, Mani (MANI, INC. 743 Nakaakutsu, Takanezawa, Shioya, Tochigi 329-1234, Japan)
-Jeringas de Irrigación, Monoject. (Covidien lic, 15 Hampshire, Mansfield, MA 02048 USA).
-Hipoclorito de Sodio 5%. (NaOCl, Sigma-Aldrich 3050 Spruce St. St. Louis, MO 63103 USA)
-Limas tipo Kerr 1era y 2da Serie, Maillefer (Dentsply-Maillefer, Chemin du Verger 3, 1338 Ballaigues, Suisse)
-Clorhexidina Gluconato solución tópica 2%. (Chlorhexidine digluconate solution 20% in H <sub>2</sub> O, Sigma-Aldrich 3050 Spruce St. St. Louis, MO 63103 USA)
-EDTA 10%. (EDTA, Merck Millipore, Frankfurter Str. 250, 64293 Darmstadt, Germany)
-Cloruro de Sodio 0,9%. (J.T.Baker, Mallinckrodt Baker, S.A. de C.V. Xalostoc, 55320, Edo de Mex. Mexico, Made in USA printed in Mexico).
-Agua destilada. (Laboratorio de Química, Facultad de Odontología, U. de Chile)

-Fermin Detax. (DETAX GmbH & Co. KG, Carl-Zeiss-Str. 4 76275 Ettlingen, Germany)
-Vidrio Ionómero ChemFil. (Dentsply DeTrey GmbH 78467, Konstanz, Germany)

<b>Tabla N° 2. Materiales y reactivos para procedimientos de Laboratorio</b>
-Tubos Eppendorf 1,5 mL. (Biologix Group Limited, No.2766 Ying Xiu Road,High-Tech Industrial Development Zone Jinan, Shandong 250101 P.R. China)
-Micropipetas 100 y 1000 Labopette® (Hirschmann, Inc. Holloway Road, Suite 104 Bluegrass Industrial Park. Louisville, KY 40299, USA)
-Centrífuga Hermle z216 MK. (HERMLE Labortechnik GmbH, Siemensstr 25 D-78564, Wehingen Alemania)
-Ácido Clorhídrico. (J.T.Baker, Mallinckrodt Baker, S.A. de C.V. Xalostoc, 55320, Edo de Mex. Mexico, Made in USA printed in Mexico).
-Nitrito de Sodio (Merck Millipore, Frankfurter Str. 250, 64293 Darmstadt, Alemania).
-Sulfamato de Amonio. (Sigma-Aldrich Chemie GmbH Munich, Germany).
-Naftil etilindiamina dihidrocloruro. (Sigma-Aldrich 3050 Spruce St. St. Louis, MO 63103 USA).
-Ethanol (Merck Millipore, Frankfurter Str. 250, 64293 Darmstadt, Alemania).
-Espectrofotómetro UNICAM®UV/VIS. (Thermo Spectronic Unicam UV-530 UV-Visible, Rochester, NY, USA)
-Cubetas de cuarzo 1cc. (Scientech, Inc. 5649 Arapahoe Avenue Boulder, CO 80303-1399, USA).

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.

### 3. Selección de la muestra.

El tamaño mínimo de una muestra depende de cuánto se desvía la distribución de la población de una distribución normal. Tamaños de muestra de 15 a 30 son adecuados si la población parece tener una distribución que no es lejana a la normal, en caso contrario se necesitan tamaños de muestra de 50, 100 o más altos. (Triada M. 2004). Con un tamaño de muestra de  $N=30$ , la forma de la distribución de los coeficientes de correlación de la muestra es parecida a la de una distribución normal, donde solo el 0,25% de los valores de la muestra se desviará desde cero hasta en un  $\pm 0.50$  (Fig. 7).

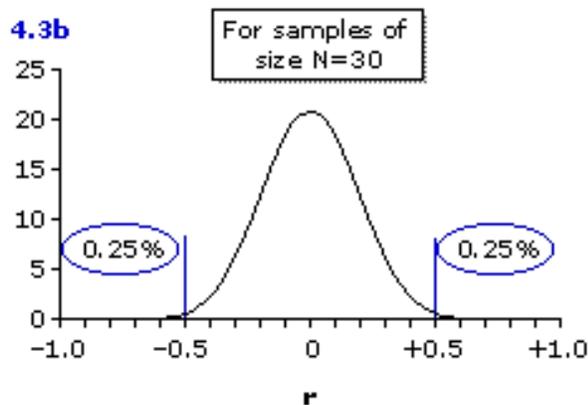


Figura N° 7: Gráfico de distribución de frecuencias

### 4. Obtención y almacenamiento de muestras.

Se montó un modelo *ex vivo* de 30 dientes unirradiculares 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. Los criterios de selección fueron dientes permanentes sanos unirradiculares, libres de caries u obturaciones, y con calibres de canal medianos o amplios en los tres tercios radiculares.

Estos dientes fueron limpiados, debridados con ultrasonido y curetas, radiografiados y almacenados en NaCl al 0,9%. Previamente se explicó el procedimiento a los pacientes. Se pidió su autorización mediante un consentimiento

informado; en caso de ser menores de edad, un apoderado firmó la autorización. (Anexo 2)

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

Los dientes fueron divididos aleatoriamente 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 diseñado *ad-hoc* (creado y elaborado por el Dr. Mauricio Ruiz Nolf) mostrado en la figura 8 y descrito en el anexo 3, se recolectaron las diferentes soluciones producidas durante las 13 fases del tratamiento.



**Figura N° 8: Dispositivo de toma de muestras endodónticas diseñado y creado por el Dr. Mauricio Ruiz Nolf**

Las muestras del grupo control se recolectaron durante 13 fases:

- Fase 1: Se realizó la cavidad de acceso endodóntico con piedra de diamante de alta velocidad (0.12, 0.14, 0.16) en esmalte, de acuerdo al tamaño de la cámara pulpar del diente, refrigerando hasta llegar a dentina. En dentina se cortó 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 comunicó se irrigó con NaClO al 5% con *Jeringa Irrigación Monoject* 3ml (recolectando parte de la primera muestra). Se realizó el destechamiento con la misma fresa con movimientos de tracción de adentro hacia afuera. Una vez finalizado el destechamiento, se realizó el cateterismo con una lima K fina N° 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%.

La siguiente etapa en el acceso fueron 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. Los desgastes fueron realizados con una fresa llama o *Endo-Z* de baja velocidad.

→ **Recolección N° 1** (Inmediatamente después de comunicar, luego de permeabilizar el canal y al finalizar los desgastes compensatorios).

Fase 2: Preparación del tercio cervical y medio (Crown Down) con fresas Gates-Glidden en una secuencia que se eligió de acuerdo al calibre del canal en los tercios cervical y medio. Las fresas fueron graduadas a los dos tercios de la longitud aparente del diente medido en la radiografía previa. La secuencia para canales amplios fue 3-2-1 y para canales medios fue 1-2-1 irrigando con NaClO al 5% entre cada gates.

→ **Recolección N° 2**: Luego de utilizar cada *Fresa Gates-Glidden*.

Luego se determinó la longitud de trabajo (LT) introduciendo la lima hasta que se visualizó la punta de ésta por el foramen apical. Se dejó al ras con el foramen y

esa longitud fue definida como la longitud real del diente LRD, definiéndose la LT a -1mm de la LRD.

- Fase 3: Durante la preparación del tercio apical hasta la Lima Maestra (LM) se irrigó con NaClO al 5 % entre cada paso de lima. Para canales medios se definió LM #35 y para canales amplios LM #45.

→ Recolección N° 3: Al finalizar con cada lima se fue recolectando parte de la muestra.

- Fase 4: Durante el 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 consiguió unir la instrumentación del tercio apical con la preparación de los tercios cervical y medio del canal (técnica corono-ápico-medial). Se Irrigó con NaClO al 5 % entre cada paso de lima.

→ Recolección N°4: Al finalizar con cada lima se fue recolectando parte de la muestra.

En estas primeras cuatro fases se utilizó NaClO 5% P/V. Luego se secó el canal con conos de papel estériles de acuerdo a su calibre.

- Fase 5, 6 y 7. Irrigación (IRR) con 3 jeringas de 3 ml cada una con suero fisiológico. → Recolección N° 5, 6 y 7

Luego se volvió a secar con conos de papel el SCR.

- Fase 8: IRR con 1ml de EDTA al 10% durante 1 minuto.

→ Recolección N° 8

Se volvió a secar con conos de papel el SCR.

- Fase 9, 10 y 11. IRR con 3 jeringas de 3 ml cada una con suero fisiológico.

→ Recolección N° 9, 10 y 11.

- Fase 12: IRR con CHX al 2% con 1 jeringa de 3 ml.

→ Recolección N° 12.

Se obturó la cavidad de acceso del diente con doble sellado (*Fermín* y Vidrio Ionómero de autocurado) y se selló el ápice con cera rosada. Luego, se puso el diente con suero fisiológico y estufa a 37° C

por una semana (tiempo habitual de medicación intracanal), simulando las condiciones del medio oral.

- Fase 13: Pasados los 7 días, se volvió a ingresar al canal, retirando el sellado temporal de la cavidad de acceso con piedras de alta velocidad, bajo refrigeración con agua. Se irrigó con 1 jeringa (3ml) de clorhexidina 2% repasando con la LM.

→ Recolección N° 13: Inmediatamente al tener contacto con el canal y luego de repasar con la LM.

Estos 13 volúmenes se guardaron en frascos de vidrios cerrados para ser llevados al laboratorio y realizar su análisis.

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 Alcohol 70%**. El alcohol 70% fue utilizado en el mismo volumen que el suero fisiológico, es decir, el equivalente a tres jeringas de irrigación de 3mL, cada vez que corresponda según el protocolo.

## 6. Procedimiento de laboratorio

Las muestras de las fases del tratamiento 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 específicas del tratamiento endodóntico en las que fueron medidas las concentraciones de NaClO, EDTA, CHX y PCA, se muestran en la Tabla N° 3

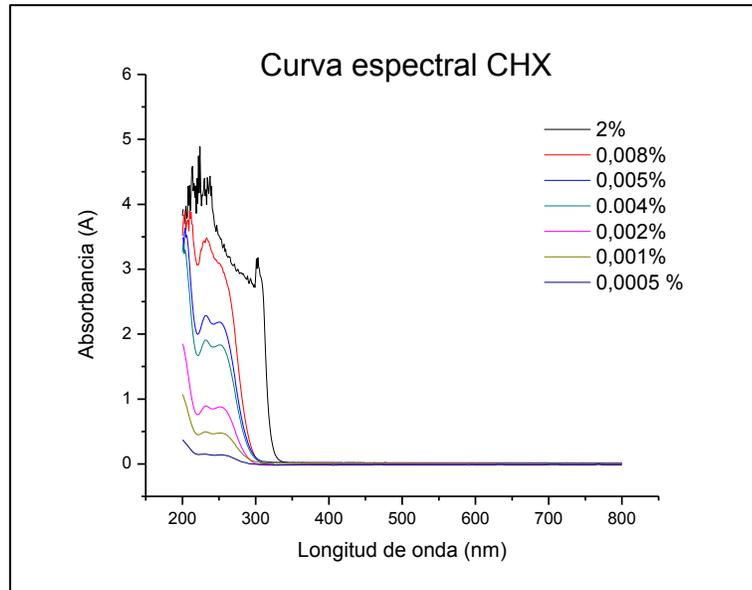
**Tabla N°3: Fases del tratamiento endodóntico donde se midieron las concentraciones de NaClO, EDTA, CHX y PCA.**

	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
PCA												X	X

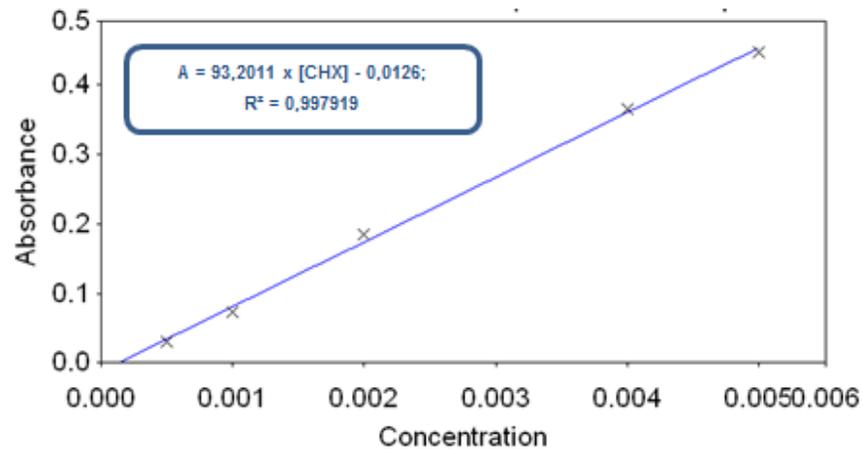
a. Determinación de la concentración de NaClO, EDTA y CHX:

Las concentraciones de NaClO, EDTA y CHX se determinaron espectrofotométricamente siguiendo un protocolo similar para todas estas sustancias. Para explicar este procedimiento se describirá detalladamente la cuantificación de la concentración de CHX 2% en las muestras obtenidas.

En primer lugar, se tomó 1 ml de solución de CHX al 2%, 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 la longitud de onda a la cual la CHX tiene máxima absorbancia, el *lambda* máximo ( $\lambda_{max}$ ). Por lo tanto, a partir de la solución de CHX al 2% se realizaron una serie de diluciones seriadas, obteniendo así soluciones de concentración conocida. En estas diluciones se determinó el  $\lambda_{max}$  (gráfico 1), y se construyó la curva de calibración (gráfico 2), la cual se utilizó para determinar la concentración de CHX en las muestras recolectadas.

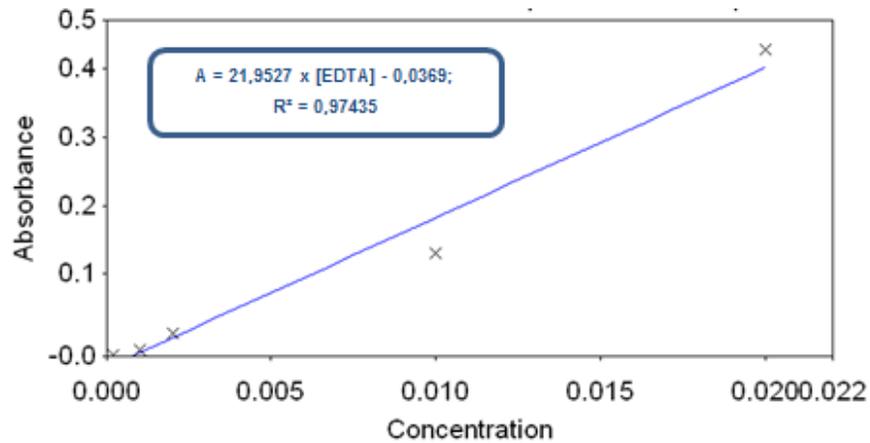


**Gráfico 1: Espectros de Absorción de CHX al 2% y diluciones a distintas concentraciones.  $\lambda_{max}$ : 254 nm**

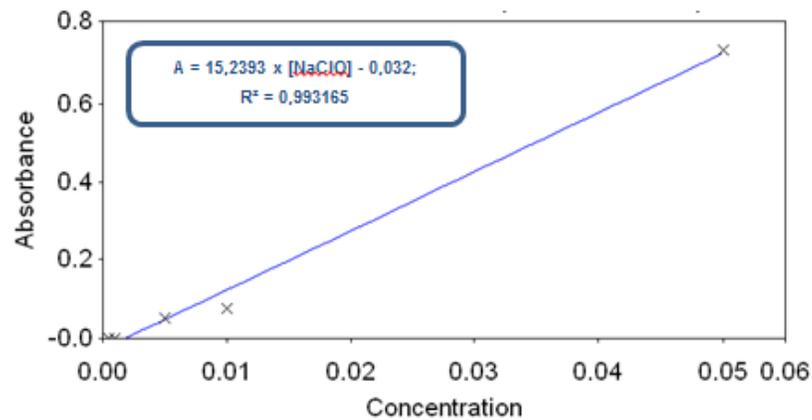


**Gráfico 2: Curva de Calibración de la CHX**

Para la determinación de las concentraciones de EDTA y NaClO en las muestras recolectadas, se construyeron sus curvas de calibración (gráficos 3 y 4 respectivamente), siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente.



**Gráfico 3: Curva de Calibración del EDTA, medida a 207 nm**



**Gráfico 4: Curva de Calibración de la NaClO medida a 292 nm**

Luego se midió la absorbancia de las muestras recolectadas a  $\lambda_{max}$  (el cual depende de la solución que se desea medir) 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.

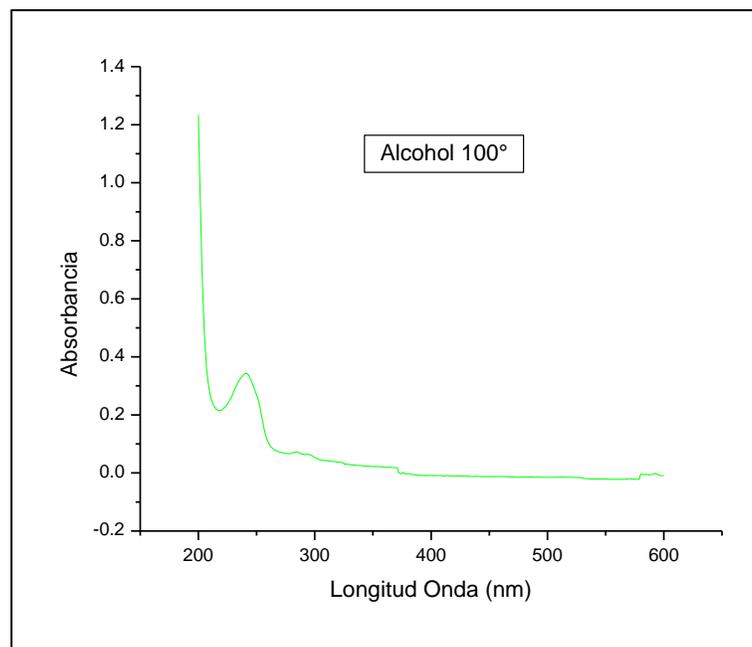
En aquellas muestras donde la concentración de la solución no estaba dentro del rango de concentración que comprende la curva de calibración, porque ésta resultó ser mayor que la concentración del estándar más concentrado, la muestra fue diluida. Posteriormente, se reemplazaron los valores de absorbancia en la ecuación de la curva de calibración y se multiplicó el resultado obtenido por el factor de dilución para conseguir la concentración final del irrigante en la muestra. En las muestras donde la concentración de la solución estaba dentro del rango de

concentración que comprende la curva de calibración, se utilizó el valor de absorbancia directamente en la ecuación de la curva sin diluir la solución.

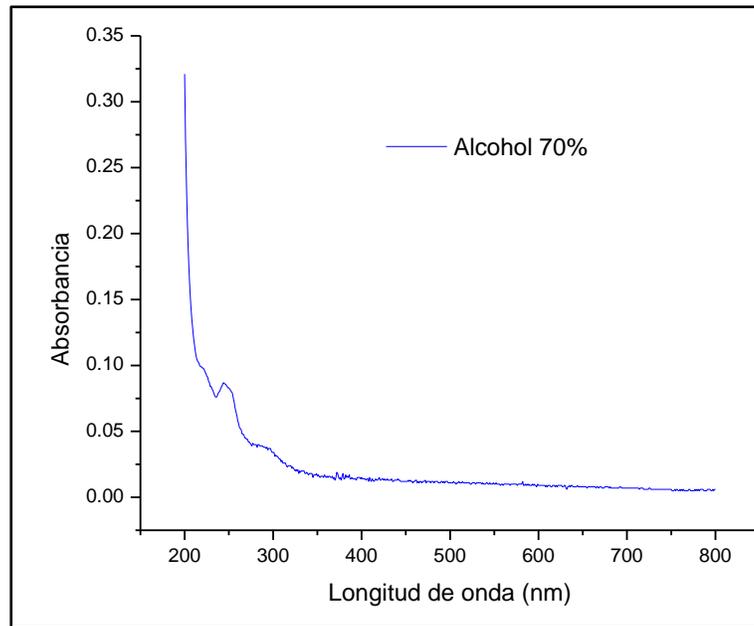
En el Anexo N°4 se describe de forma más detallada el método utilizado para determinar la concentración del NaClO, EDTA, CHX en las muestras recolectadas.

b. Determinación del espectro de absorción y concentración del Alcohol:

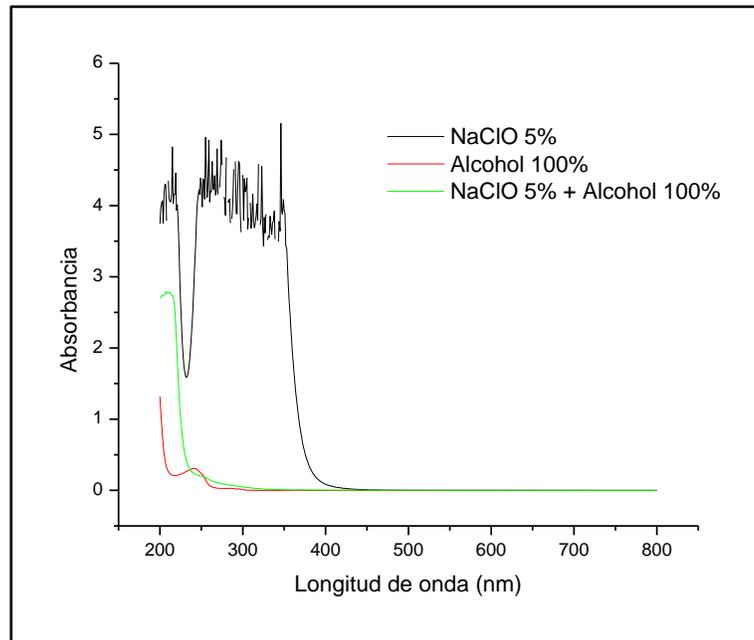
Se tomó 1 ml de alcohol absoluto, se leyó su absorbancia en el rango UV-visible (200-800 nm) y luego se graficaron los datos obtenidos para obtener su curva espectral (gráfico 5). Para el alcohol al 70% se repitió el procedimiento obteniendo su curva espectral (gráfico 6).



**Gráfico 5: Espectro de Absorción del Alcohol 100%**



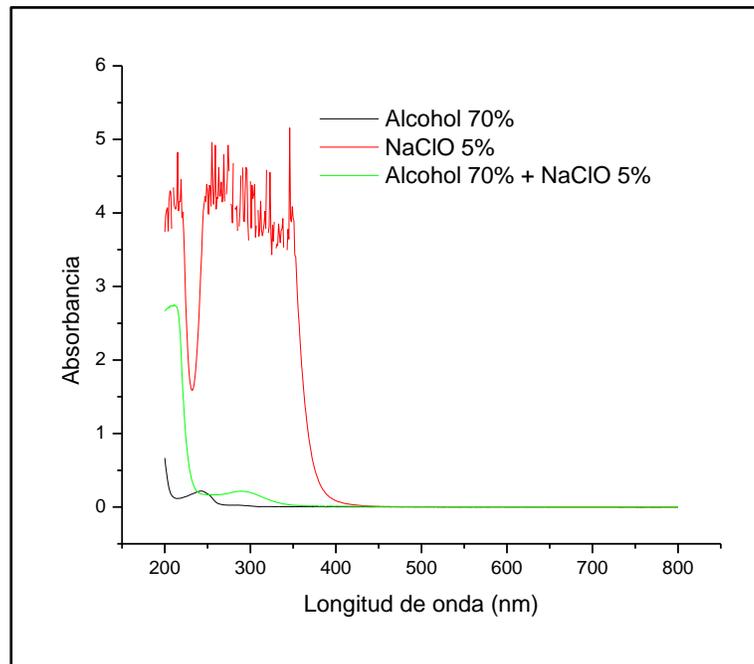
**Gráfico 6: Espectro de Absorción del Alcohol 70%**



**Gráfico 7: Espectro de Absorción del NaClO 5% con Alcohol Absoluto**

En el gráfico 7 se muestran los espectros de absorción del hipoclorito de sodio al 5% (negro), alcohol 100% (rojo) y la mezcla hipoclorito de sodio 5%-alcohol 100% (verde). Al mezclar alcohol absoluto con diluciones acuosas de NaClO, que van del 5% al 0,0005%, se anuló el espectro de absorción típico del NaClO

demostrando que ambos compuestos reaccionaban entre sí impidiendo su cuantificación por espectrofotometría.



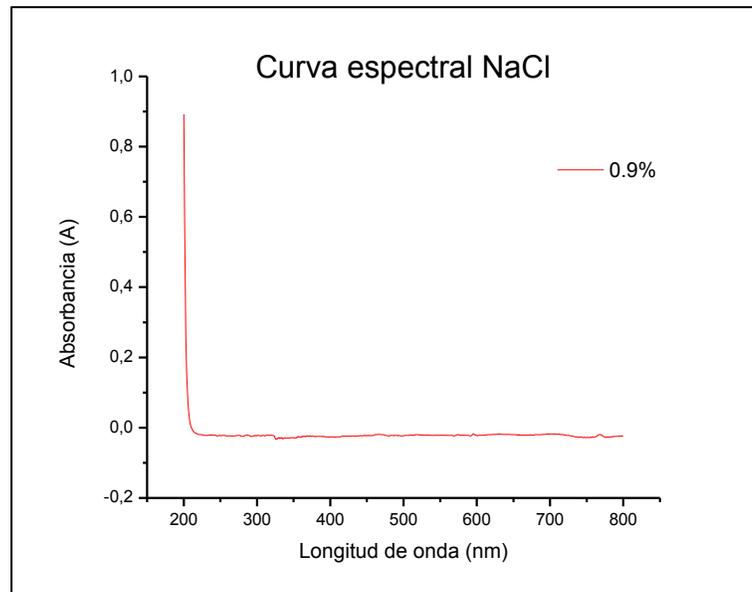
**Gráfico 8: Espectro de Absorción del NaClO 5% con Alcohol 70%**

En el gráfico 8 se muestran los espectros de absorción del hipoclorito de sodio al 5% (rojo), alcohol 70% (negro) y la mezcla hipoclorito de sodio 5%-alcohol 70% (verde). En este caso, la mezcla alcohol 70%-NaClO presentó un perfil espectrográfico característico, demostrando que ambos irrigantes no reaccionaban entre ellos.

Debido a lo anterior, se estableció que para efectos de este trabajo la concentración de alcohol que se utilizaría sería al 70%.

c. Determinación del espectro de absorción y concentración de NaCl:

Se tomó 1 ml de solución de suero fisiológico al 0,9%, se leyó su absorbancia en el rango UV- visible (200-800 nm) y luego se graficaron los datos obtenidos para obtener su curva espectral (gráfico 9).



**Gráfico 9: Espectro de Absorción de NaCl 0,9%**

Debido a los bajos niveles de absorbancia que presenta NaCl 0,9% y a la ausencia de una longitud de onda de máxima absorción que permita identificarlo, se estableció que para efectos de este trabajo la concentración de NaCl sería de 0,9%.

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:

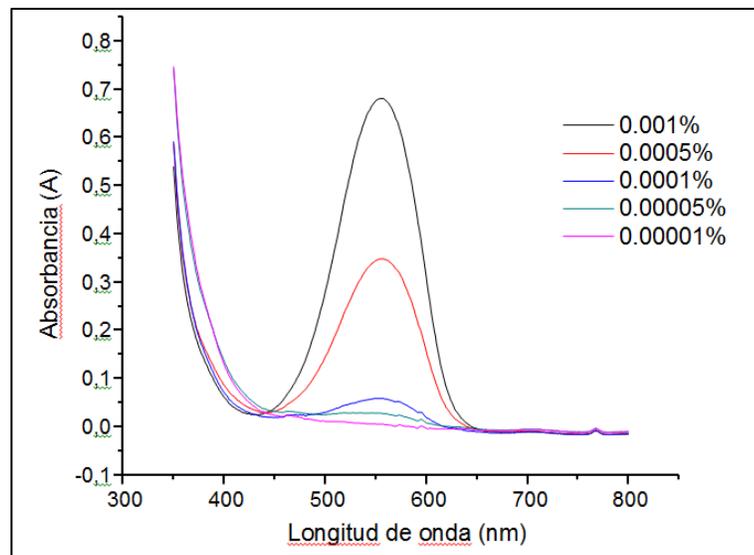
- A 1ml de muestra se agregó 250 $\mu$ L Ácido Clorhídrico diluido (73g/L) y se diluyó hasta 2mL.

Se agregó rápidamente y se agitó después de la adición de cada una de las siguientes soluciones:

- 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 y se dejó reposar por 30 minutos.

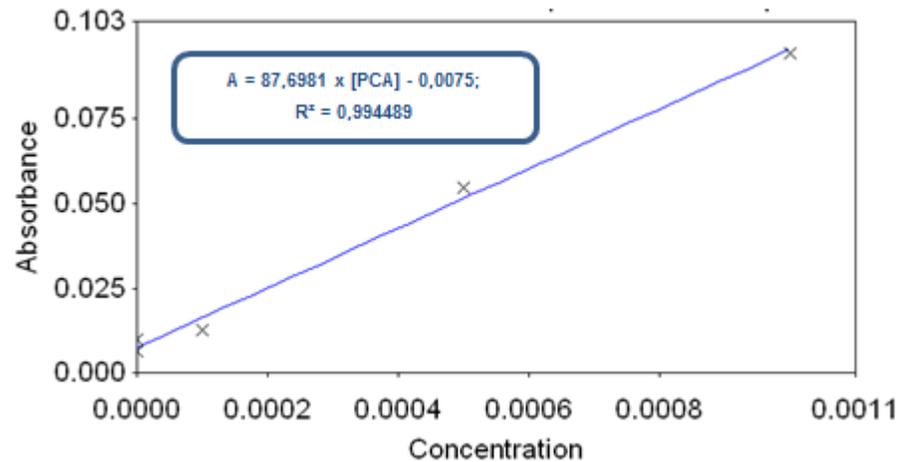
El protocolo fue aplicado a 5 estándares de soluciones de PCA Aldrich ® de concentraciones conocidas y se observó un cambio de coloración (rojo- azul) de diferente intensidad según la concentración de PCA. Se leyó su absorbancia en el rango visible (350–800 nm) y con los datos obtenidos se construyó la curva espectral para determinar su  $\lambda_{max}$  (gráfico 10).



**Gráfico 10: 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, 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 11)



**Gráfico 11: Curva de Calibración de PCA obtenida a 552 nm.**

## **7. Análisis estadístico**

Por medio del análisis de los resultados se buscó establecer diferencias entre las concentraciones de NaClO, EDTA, CHX y PCA en el grupo control (suero fisiológico) con los valores del grupo experimental (alcohol 70%). Los datos obtenidos fueron sometidos al test estadístico Shapiro-Wilk para determinar el tipo de distribución y luego 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

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

### Concentración NaClO

**Tabla N°4. Concentración de NaClO determinados durante la preparación químico-mecánica (PQM) del canal radicular (fases 1-4).**

	Hipoclorito de Sodio (NaClO)				Valor p
	SUERO (Grupo Control)		ALCOHOL 70% (Grupo Experimental)		
	Media	DS	Media	DS	
Fase 1	4,737 %	0,19885	4,853%	0,24896	>0,05
Fase 2	4,875%	0,12929	4,871%	0,25921	>0,05
Fase 3	4,887%	0,18132	4,896%	0,22390	>0,05
Fase 4	4,901%	0,13966	4,900%	0,21983	>0,05

F1: Cavidad de acceso. F2: Preparación 1/3 cervical y medio. F3: Preparación 1/3 apical. F4: Step-Back. DS: Desviación estándar. p: Significancia.

La concentración de hipoclorito encontrada posterior a la preparación químico-mecánica es menor a la inicial, donde la mayor diferencia se observa en la Fase 1, para ambos eluyentes.

**Tabla N°5. Concentración de NaClO en las fases 5, 6 y 7, durante la irrigación con NaCl 0,9% o alcohol 70%.**

	Hipoclorito de Sodio (NaClO)				Valor p
	SUERO (Grupo Control)		ALCOHOL 70% (Grupo Experimental)		
	MEDIA	DS	MEDIA	DS	
FASE 5	0,05960%	0,02424	0,02088%	0,00274	<0,05
FASE 6	0,00366%	0,00089	0,00300%	0,00179	>0,05
FASE 7	0,00297%	0,00038	0,00261%	0,00166	>0,05

F5: Primera irrigación con NaCl 0,9% o Alcohol 70%. F6: Segunda irrigación con NaCl 0,9% o Alcohol 70% F7: Tercera irrigación con NaCl 0,9% o Alcohol 70% 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. Sin embargo, en la fase 5 el NaClO eluido con alcohol 70% alcanza una concentración menor en comparación con el suero con diferencia significativa. En cambio, en la fase 6 y 7 las concentraciones de ambos grupos disminuyen sin diferencia significativa.

**Tabla N°6. Concentración de NaClO residual en las fases de tratamiento 9, 10 y 11, durante la irrigación con NaCl 0,9% o alcohol 70%.**

	Hipoclorito de Sodio (NaClO)				Valor p
	SUERO (Grupo Control)		ALCOHOL 70% (Grupo Experimental)		
	MEDIA	DS	MEDIA	DS	
FASE 9	0,00527%	0,00153	0,00322%	0,00166	<0,05
FASE 10	0,00357%	0,00079	0,00241%	0,00192	>0,05
FASE 11	0,00308%	0,00055	0,00229%	0,00167	>0,05

F5: Primera irrigación con NaCl 0,9% o Alcohol 70%. F6: Segunda irrigación con NaCl 0,9% o Alcohol 70% F7: Tercera irrigación con NaCl 0,9% o Alcohol 70% 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. Sin embargo, en la fase 9 el NaClO en alcohol 70% alcanza una concentración menor en comparación con el suero con diferencia significativa. En cambio, en la fase 10 y 11 las concentraciones de ambos grupos disminuyen sin diferencia significativa.

### **Concentración EDTA**

**Tabla N°7. Concentración de EDTA (fase 8).**

	EDTA				Valor p
	SUERO (Grupo Control)		ALCOHOL 70% (Grupo Experimental)		
	MEDIA	DS	MEDIA	DS	
FASE 8	7,480%	1,04849	8,580%	1,07680	>0,05

F8:Irrigación con EDTA 10%.DS: Desviación estándar.

La concentración promedio de EDTA en esta fase del tratamiento endodóntico disminuye a partir de su concentración inicial tanto para el suero como el alcohol al 70%. Además, no existe diferencia significativa entre ambos grupos.

**Tabla N°8. Concentración de EDTA en las fases de tratamiento 9, 10 y 11, durante la irrigación con NaCl 0,9% o alcohol 70%.**

	EDTA				Valor p
	SUERO (Grupo Control)		ALCOHOL 70% (Grupo Experimental)		
	MEDIA	DS	MEDIA	DS	
FASE 5	0,07989%	0,02026	0,08853%	0,00864	>0,05
FASE 6	0,00956%	0,00181	0,01020%	0,00048	>0,05
FASE 7	0,00668%	0,00089	0,00695%	0,00025	>0,05

F5: Primera irrigación con NaCl 0,9% o Alcohol 70%. F6: Segunda irrigación con NaCl 0,9% o Alcohol 70% F7: Tercera irrigación con NaCl 0,9% o Alcohol 70% DS: Desviación estándar.  
p: Significancia.

En estas etapas se utiliza el suero fisiológico (grupo control) o alcohol (grupo experimental) para eliminar el EDTA remanente en el interior del canal radicular.

La concentración promedio de EDTA disminuye durante la irrigación sucesiva de suero y alcohol 70% como irrigante intermedio sin diferencias significativas.

### **Concentración CHX**

**Tabla N°9. Concentración de CHX determinado en las fases 12 y 13.**

	CHX				Valor p
	SUERO (Grupo Control)		ALCOHOL 70% (Grupo Experimental)		
	MEDIA	DS	MEDIA	DS	
FASE 12	2,189%	0,15393	2,092%	0,14240	>0,05
FASE 13	2,159%	0,09384	2,148%	0,11142	>0,05

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

Estas etapas corresponden a la medicación del canal radicular con CHX 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 del tratamiento endodóntico posterior al uso de CHX al 2%.

**Tabla N°10. Concentración de PCA determinado en las fases 12 y 13.**

	PCA				Valor p
	SUERO (Grupo Control)		ALCOHOL 70% (Grupo Experimental)		
	MEDIA	DS	MEDIA	DS	
<b>FASE 12</b>	0,00345%	0,00109	0,00233%	0,00048	<0,05
<b>FASE 13</b>	0,00298%	0,00114	0,00241%	0,00078	>0,05

F12: Primera irrigación con CHX. F13: Segunda irrigación con CHX.DS: desviación estándar  
p: Significancia

En ambos grupos existe formación de PCA luego de utilizar el protocolo descrito. Sin embargo, al final de la fase 12 en el grupo experimental esta formación se ve disminuida de manera significativa en comparación al grupo control. En cambio, en la fase 13 (posterior a la medicación con clorhexidina durante una semana) no existe diferencia significativa entre ambos grupos.

## DISCUSIÓN

Si bien cada tratamiento endodóntico se realiza para solucionar un caso clínico distinto, todos tienen el objetivo de alcanzar el éxito terapéutico, logrado a partir de la eliminación de los factores etiológicos dentro de los que se consideran la correcta eliminación de los microorganismos del SCR, la remoción adecuada del tejido pulpar inflamado o necrótico y la prevención de una futura recontaminación.

Ninguna sustancia por sí sola satisface todas las funciones requeridas de un irrigante endodóntico, por lo que la irrigación óptima se basa en el uso combinado de dos o varias soluciones en una secuencia específica que permita cumplir con una irrigación segura y eficaz del SCR (Haapasalo, 2010). Zehnder en el año 2006 propone una irrigación de NaClO para disolver los componentes orgánicos, irrigación con EDTA para eliminar el componente inorgánico del barro dentinario y el uso de CHX para aprovechar el espectro de actividad antimicrobiana y la penetración de la CHX dentro de los túbulos, considerando la propiedad de sustantividad que posee este irrigante.

Se ha establecido que al usar NaClO en combinación con CHX, se logra una mejor efectividad antimicrobiana dentro del SCR que al usar ambos irrigantes por separado (Kuruvilla, 1998). Sin embargo, esta combinación genera un precipitado capaz de obliterar los túbulos dentinarios y ser potencialmente cancerígeno para los humanos (Chhabra y cols. 1991, Schoffstall y cols. 2004, World Health Organization, 2006). Por lo tanto, es necesario evaluar distintos irrigantes intermedios que eviten o prevengan la formación de esta sustancia dentro del canal radicular.

En el presente trabajo se estudió el rol del alcohol al 70% en la formación de paracloroanilina al ser utilizado como irrigante intermedio entre hipoclorito de sodio 5% y clorhexidina 2% y se determinó que la dilución de NaClO 5% con alcohol no impide la formación de PCA. Por lo tanto, no se confirma la hipótesis planteada.

Se ha mostrado que con el uso de alcohol absoluto como irrigante intermedio entre NaClO y CHX no se forma ningún precipitado, por lo que no existe formación de PCA (Krishnamurthy, 2010). Esto se explica porque el alcohol es un agente volátil,

tensoactivo, muy electronegativo y puede penetrar profundamente en los túbulos para eliminar el NaClO residual presente en los canales. Su capacidad volátil también ayudaría en el secado de los canales previo a la obturación del SCR (Short, 2003). Sin embargo, la evidencia es escasa y faltan estudios que corroboren su comportamiento. En este estudio se evidenció que al mezclar alcohol absoluto con diluciones acuosas de NaClO, que van del 5% al 0,0005%, se produjo una interacción entre ambos compuestos anulando el espectro de absorción típico del NaClO, que impedía su cuantificación por espectrofotometría (ver Gráficos 5-9). Esto nos llevó a plantear otra hipótesis, donde la no formación de PCA se debe a que ambos compuestos (alcohol absoluto y NaClO) reaccionan entre sí, formando otro producto diferente al NaClO y que no reacciona con la CHX 2% para formar PCA. Esta hipótesis sería interesante de abordar en futuros estudios. Por esta razón, se decidió diluir el alcohol a una concentración del 70% y evidenciar si tenía otro patrón de comportamiento. La mezcla de alcohol 70%-NaClO presentó un perfil espectrográfico característico, demostrando que ambos irrigantes no reaccionaban entre ellos, permitiendo cuantificar la formación de PCA al utilizarlo como un irrigante alternativo.

En este estudio además, se midió la concentración de NaClO durante la preparación químico-mecánica del canal radicular. Se determinó que existe una disminución en relación a la concentración inicial del 5% en ambos grupos, donde la menor disminución se observa en la fase 4 (Step-Back). No existieron diferencias significativas entre el grupo control y el grupo experimental en todas las fases. La disminución de la concentración de NaClO en ambos grupos se puede explicar por el mayor porcentaje de materia orgánica existente en las primeras etapas del proceso. Se ha demostrado que la presencia de materia orgánica tiene un gran efecto sobre la actividad antimicrobiana (Haapasalo, 2010), disminuyendo la concentración de NaClO y su actividad local (Stojicic y cols 2010). La inactivación se explica porque se producen las reacciones de saponificación, neutralización, además de la formación de cloramina (Estrela y cols 2002).

Las fases 5, 6 y 7 del protocolo muestran el efecto de los irrigantes intermedios sobre el hipoclorito residual, observándose bajos valores de

concentración de NaClO tanto para el alcohol 70% como para el suero fisiológico. Se encontraron diferencias significativas en la concentración de hipoclorito entre ambos eluyentes sólo en la fase 5. A pesar de la baja concentración promedio de NaClO encontrada, no existe una elución completa, pudiendo interactuar el hipoclorito residual con la CHX 2% y generar la formación de PCA en baja cantidad (Bilbao y cols 2013).

Se determinó disminución de la concentración del EDTA luego de actuar en las paredes del canal radicular, tanto en el grupo control como en el grupo experimental. La disminución de la concentración se explica por su capacidad quelante limitada, que provoca desmineralización de la dentina de las paredes del canal (Basrani, 2012).

En las fases 9, 10 y 11, se utilizaron irrigantes intermedios con el objetivo de eliminar el EDTA y NaClO residuales. Los valores medidos en estas fases mostraron bajas concentraciones de EDTA y de NaClO lo que indica que el uso de ambos irrigantes en abundante volumen, es eficaz para diluir NaClO y EDTA disminuyendo su concentración previo al uso de CHX 2%. Sólo se observaron diferencias significativas entre ambos eluyentes en la fase 9 para la concentración del hipoclorito de sodio.

La evidencia experimental señala que la concentración óptima para la CHX como medicación intracanal es al 2% (Basrani y cols. 2004, Zehnder 2006, Siqueira y cols. 2007), ya que a esta concentración tiene acción antimicrobiana sobre *Candida Albicans* (Basrani y cols. 2004) y *Enterococcus faecalis* (Krithikadatta y cols., 2007). Por este motivo, se decidió utilizar esta concentración de CHX en las fases 12 y 13 del estudio. Las concentraciones de CHX obtenidas en el grupo control fueron de 2,189% en la fase 12 y 2,159% en la fase 13; en el grupo experimental la concentración en la fase 12 fue de 2,092% y en la fase 13 de 2,148%. No existieron diferencias significativas entre ambos grupos. Esta constancia en la concentración de la CHX se debe a la ausencia de microorganismos o exudados dentro del canal que pudieran haber reaccionado con la clorhexidina y así bajar su concentración. La retención a estructuras solidas debido a la propiedad de sustantividad en este caso es poco significativa.

En esta investigación se determinó la concentración de PCA modificando el protocolo usado en la detección de Paracloroanilina en soluciones de digluconato de clorhexidina (método cualitativo) descrito en la Farmacopea Europea (2005), en un método cuantitativo. Para ello se obtuvo el  $\lambda_{max}$  de la reacción coloreada y con soluciones estándares de PCA se construyó la curva de calibración que presentó un coeficiente de correlación  $R^2=0,99$ . En este modelo *ex vivo*, luego de utilizar el protocolo de irrigación propuesto se estableció la presencia de PCA en ambos grupos. En la fase 12 el grupo control alcanzó una concentración promedio de PCA de 0,00345 %, en cambio, el grupo experimental obtuvo una concentración promedio de 0,00233%, existiendo una diferencia significativa entre ambos grupos, evidenciando una menor formación de PCA al utilizar alcohol 70%, en comparación al uso de suero. Esto tiene relevancia clínica, ya que al parecer el alcohol 70% puede limitar la formación de PCA en la etapa de la medicación intracanal, momento en que la CHX 2% interacciona por primera vez con el NaClO residual dentro del canal radicular. Sin embargo, en la fase 13 del protocolo el grupo control obtuvo una concentración promedio de PCA de 0,00298% y el grupo experimental una concentración promedio de 0,00241%. A pesar de que al utilizar alcohol se obtuvieron valores más bajos de PCA, no existió diferencia significativa entre ambos grupos en esta etapa.

Estos resultados concuerdan con estudios previos que muestran una disminución en la formación de PCA al utilizar NaCl 0,9% como irrigante intermedio aunque no hay eliminación absoluta de este precipitado, por lo que se deduce que el NaCl 0,9% no impide su formación (Valera, 2010. Krishnamurthy, 2010).

Si bien en la literatura se señala que con el uso de alcohol absoluto no hay formación de PCA (Krishnamurthy, 2010), en este estudio sí hubo formación de PCA al usar alcohol al 70%, pero en menor cantidad que el grupo control. Esto se explicaría por las propiedades físicas y químicas del alcohol al 70% que le permiten penetrar en los túbulos para eliminar el NaClO residual presente en los canales. Su capacidad volátil también ayudaría en el secado de los canales previo a la obturación del SCR (Short, 2003). Sin embargo, la biocompatibilidad del alcohol al 70% con los tejidos periapicales no ha sido totalmente estudiada.

Según lo establecido por la Organización Mundial de la Salud en relación a la exposición a PCA y considerando sólo 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 en el canal radicular correspondería a 0,1 ml (100ul), que es lo que podría ingresar al organismo, los niveles de exposición a PCA sería  $2\mu\text{g}$ , lo que se encuentra bajo el nivel máximo tolerable.

En conclusión, aunque en la literatura se indica que el uso de alcohol absoluto como irrigante intermedio impide la formación de PCA, en el presente trabajo el alcohol al 70% no impidió su formación pero sí disminuye de forma significativa la formación de este compuesto cuando se utiliza como irrigante intermedio entre el NaClO 5% y la CHX 2% al momento de la medicación. Sin embargo, la falta de estudios que aprueben el uso de alcohol en la terapia endodóntica y la escasa evidencia que existe en relación a sus reacciones con otros irrigantes y con los tejidos periapicales, lo sigue convirtiendo en un tema que es necesario investigar.

Se sugieren estudios *in vivo* para determinar la influencia de contaminación microbiana y exudado intracanal en la efectividad del alcohol al 70% en la prevención de la formación de PCA dentro del canal radicular cuando se utiliza como irrigante intermedio entre el NaClO 5% y la CHX 2%.

## CONCLUSIONES

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

1. El constante recambio de NaClO durante la preparación quimio mecánica del canal radicular, se justifica para mantener sus propiedades, debido a que su concentración va disminuyendo una vez en contacto con materia orgánica.
2. Al mezclar alcohol absoluto con diluciones acuosas de NaClO en distintas concentraciones, estos compuestos reaccionan y se anula el espectro de absorción típico del NaClO, lo que impide su cuantificación por espectrofotometría. Además, debido a esta reacción se crea otro tipo de compuesto que sería interesante investigar en futuros estudios.
3. Cuando el alcohol al 70% y el NaClO entran en contacto presentan un patrón espectrográfico característico, demostrando que ambos irrigantes no reaccionan entre ellos, lo que permite cuantificar la formación de PCA al utilizarlo como un irrigante intermedio.
4. La utilización de alcohol al 70% como irrigante intermedio entre la irrigación con NaClO 5% y con CHX 2%, disminuye de manera significativa la formación de PCA al momento de la medicación intracanal, en comparación con el suero fisiológico.

## 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alegre O, Yévenes I, Maggiolo S, Parada J. (2015) Determinación del contenido residual de paracloroanilina *ex vivo* producido en tratamiento endodóntico tras la utilización de hipoclorito de sodio al 5% y clorhexidina 2%. Trabajo de investigación, requisito para optar al título de cirujano dentista. Facultad de Odontología, Universidad de Chile, Santiago.
- Basrani & Haapasalo (2012). Update on endodontic irrigating solutions. *Endodontic 27*: 74–102.
- Basrani B, Lemonie C (2005). Chlorhexidine gluconate. *Aust Endod J* 31:48-52.
- Basrani B, Manek S (2009). Using diazotization to characterize the effect of heat or sodium hypochlorite on 2.0 % chlorhexidine. *J Endod* 35: 1296- 1299.
- Baumgartner JC, Ibay AC (1987). The chemical reactions of irrigants used for root canal debridement. *J Endod* 13: 47-51.
- Bilbao C, Maggiolo S, Yévenes I. (2014) Influencia del suero fisiológico en la formación de paracloroanilina, estudio *in vitro*. Trabajo de investigación, requisito para optar al título de cirujano dentista. Facultad de Odontología, Universidad de Chile, Santiago.
- Bystrom A, Sundqvist G (1981) Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. *Scand J Dent Res* 89:31-8.
- Chong BS, Pitt Ford TR (1992). The role of intracanal medication in root canal treatment. *Int Endod J* 25(2):97-106.

- Gomes B, Ferraz C, Vianna M, Berber V, Teixeira 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.
- Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ (1965). The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 20:340-9.
- Kawashima N, Wadachi R, Suda H, Yeng T, Parashos P (2009). Root canal medicaments. *Int Dent J* 59(1):5-11.
- Keen J, Austin M, Huang L, D Wyatt (2010). Efficacy of soaking in 70% isopropyl alcohol on Aerobic Bacterial Decontamination of surgical instruments and gloves for serial mouse laparotomies. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 49(6):832-837.
- Krishnamurthy S., Subhakaran S (2010). Evaluation and prevention of the precipitate formed on interaction between sodium hypochlorite and chlorhexidine. *J Endod* 36 (7): 1153-1157.
- Haapasalo, YaShen, Wei Qian, Yuan Gao (2010). Irrigation in Endodontics. *Dent Clin North Am* 54(2):291-312.
- Haapasalo M, Qian W, Shen Y (2012). Irrigation: Beyond the smear layer. *Endodontic* 27:35-53.
- Hand RE, Smith ML, Harrison JW (1978). Analysis of the effect off dilution on the necrotic tissue dissolution property of sodium hypochlorite. *J Endod* 4: 60-64.
- Maciel KT, Carvalho RM, Ringle RD, Preston CD, Russell CM, Pashley DH (1996). The effects of acetone, ethanol, HEMA, and air on the stiffness of human decalcified dentin matrix. *J Dent Res.* 75:1851–1858.

- Pashley DH, Agee KA, Nakajima M, Tay FR, Carvalho RM, Terada RS (2001). Solvent-induced dimensional changes in EDTA-demineralized dentin matrix. *J Biomed Mater Res.* 56:273–281.
- Pashley DH, Agee KA, Carvalho RM, Lee KW, Tay FR, Callison TE (2003). Effects of water and water-free polar solvents on the tensile properties of demineralized dentin. *Dent Mater.* 19:347–352.
- Marchesan MA, Pasternak Junior B, Afonso MM (2007). Chemical analysis of the flocculate formed by the association of sodium hypochlorite and chlorhexidine. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 103:e103-5.
- Mohammadi & Abbott (2009). The properties and applications of chlorhexidine in endodontics. *Int Endod J.* 42(4): 288-302.
- Nakabayashi N (1998). Hybridization of dental hard tissues. Tokyo: Quintessence Publishing Co. Ltd.
- Nalla RK, Balooch M, Ager JW, Kruzic JJ, Kinney JH, Ritchie RO (2005). Effects of polar solvents on the fracture resistance of dentin: role of water hydration. *Acta Biomater.* 1:31–43.
- Nalla R.K., Kinney J, Tomsia A (2006). Role of alcohol in the fracture resistance of teeth. *J Dent Res* 85(11): 1022-1026.
- Niu W, Yoshioka T, Kobayashi C, Suda H (2002). A scanning electron microscopic study of dentinal erosion by final irrigation with EDTA and NaOCl solutions. *Int Endod J* 35:934–939.
- Prado M, Hervecio M (2013). Interactions between irrigants commonly used in endodontic practice: A Chemical Analysis. *J Endod* 39: 505-510.

- Rasimick Bj, Nekich M, Hladek MM, Musikant BL, Deutscheh AS (2008). Interaction between chlorhexidine digluconate and EDTA. *J Endod* 34: 1521-1523.
- Saatchi M, Shokraneh A, Navaei H, Maracy MR, Shojaei H (2014). Antibacterial effect of calcium hydroxide combined with chlorhexidine on *Enterococcus faecalis*: a systematic review and meta-analysis. *J Appl Oral Sci.* 22(5):356-65.
- Short RD, Dorn SO, Kuttler S (2003). The crystallization of sodium hypochlorite on gutta-percha cones after the rapid sterilization technique: an SEM study. *J Endod* 29:670-3.
- Spangberg 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* 36:856-71.
- Yévenes I, Norambuena D, Casa M, Araya P. Efecto comparativo en la formación de PCA entre hipoclorito 5% diluido con agua o alcohol 70° y clorhexidina 2%. XVI Congreso de la Sociedad Argentina de Endodoncia, COSAE. Libro resúmenes 2012, pag. 17.
- Zamany A, Safavi K, Spangberg L (2003). The effect of chlorhexidine as an endodontic disinfectant. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 96:578-581.
- Zehnder RM, Moule AJ (1998). Sodium hypochlorite and its use as an endodontic irrigant. *Austral Dent J* 43: 250-256.
- Zehnder RM (2006). Root Canal Irrigants. *J Endod* 32(5):389-98.

## ANEXOS

### ANEXO 1

#### PROTOCOLO DE IRRIGACIÓN

##### PRIMERA SESIÓN:

1. Cavidad de acceso: Realizar la cavidad de acceso endodóntico con una piedra redonda de alta velocidad (0.12, 0,14, 0.16) de acuerdo al tamaño de la cámara pulpar del diente, en esmalte dentario 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% con *Jeringa 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 N° 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 cual corresponde a la longitud real del diente (LRD). La longitud de trabajo (LT) se define a -1mm de la LRD.
4. Preparación 1/3 Apical: Definir la lima maestra (LM) de acuerdo al calibre del canal radicular en apical. En canales medios instrumentar hasta alcanzar una LM #35 y en canales amplios una LM #45. Irrigar con NaClO al 5 % entre cada paso de lima. → **Recolección N° 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 N°4**
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 N° 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 N° 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

**Rol del Alcohol 70% en la Formación de paracloroanilina ex vivo en tratamiento endodóntico tras la Utilización de Hipoclorito de Sodio 5% y Clorhexidina 2%**

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

María Angélica Reyes, 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, está realizando un estudio cuyo objetivo es determinar el efecto del alcohol al 70% en la formación de PCA al ser usado después de la irrigación con NaClO 5 % y previo a la irrigación con CHX 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: María Angélica Reyes; celular: 56280565)

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

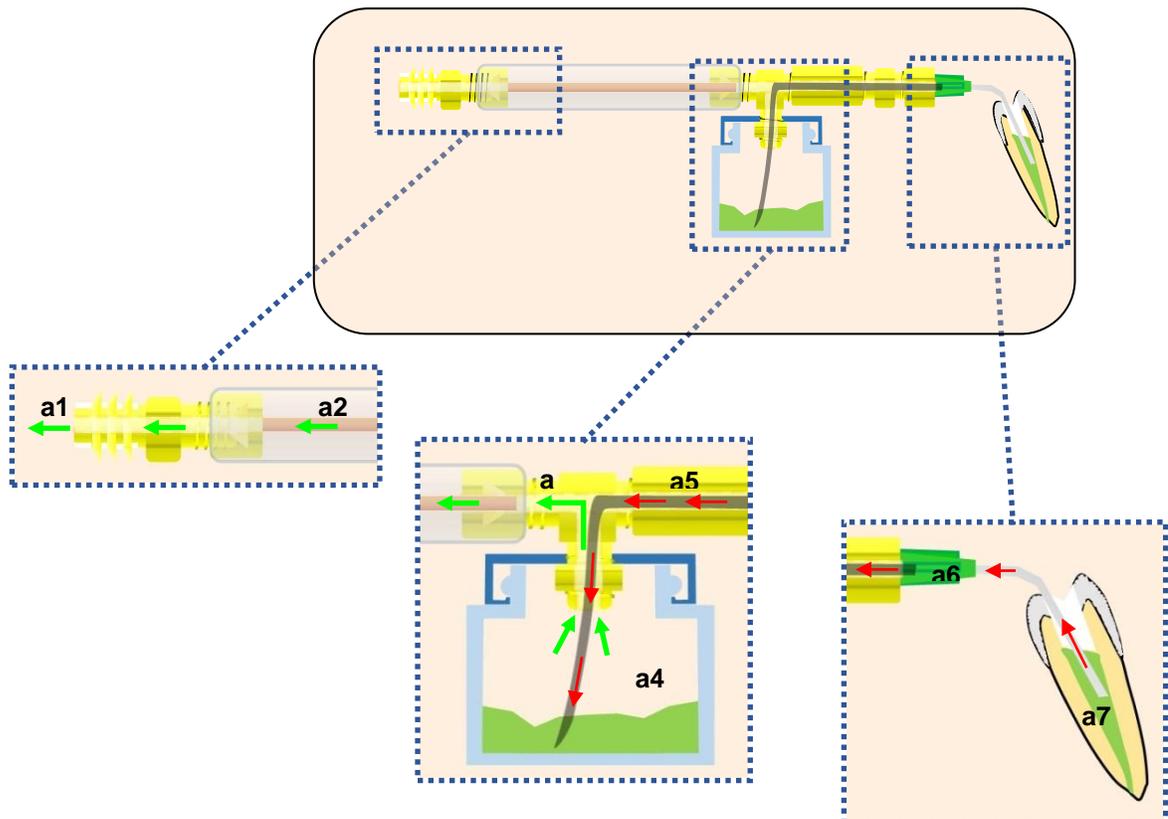
Firma

## ANEXO 3

### DISPOSITIVO PARA TOMA DE MUESTRAS

El dispositivo para toma de muestras fue creado y elaborado 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 medico 23G.

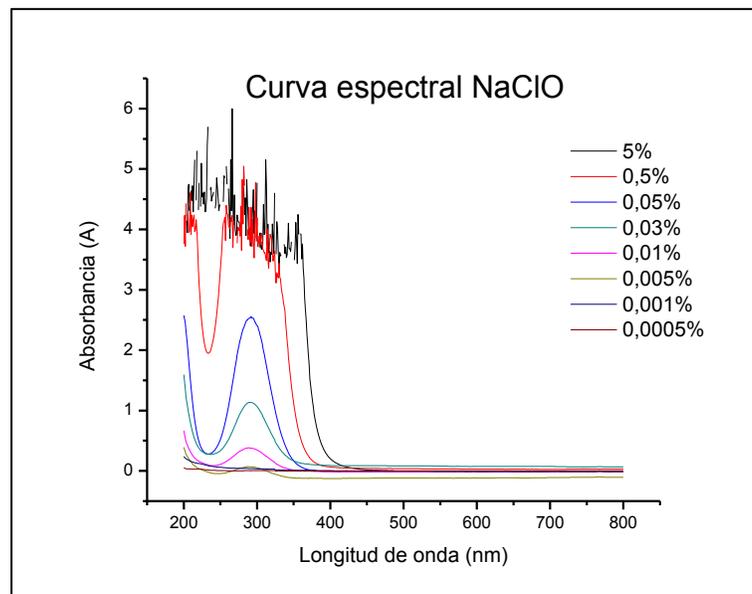
En la figura A se muestra el esquema del dispositivo. El vacío del eyector en a1 se transmite a través de la cañería a2 y de la tee a3 hasta el interior del contenedor de vidrio a4. El vacío dentro del contenedor a4 se aplica sobre la manguera de poliamida a5 hasta la aguja a6. Finalmente, el vacío se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



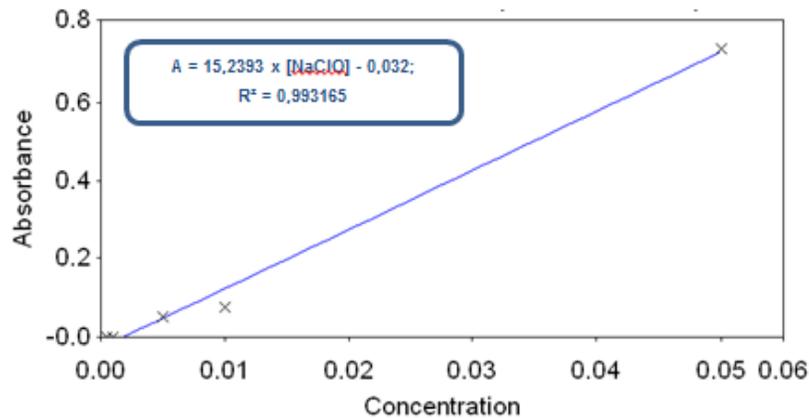
## ANEXO 4

**MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DEL ESPECTRO DE ABSORCIÓN Y CONCENTRACIÓN DEL HIPOCLORITO DE SODIO, EDTA, CLORHEXIDINA Y PCA.**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, entre 0,0005% y 0,05%, la cual se utilizó para determinar la concentración de NaClO en las muestras recolectadas.



**Gráfico 13: Espectros de Absorción de NaClO al 5% y diluciones a distintas concentraciones.  $\lambda_{max}$ : 292 nm.**

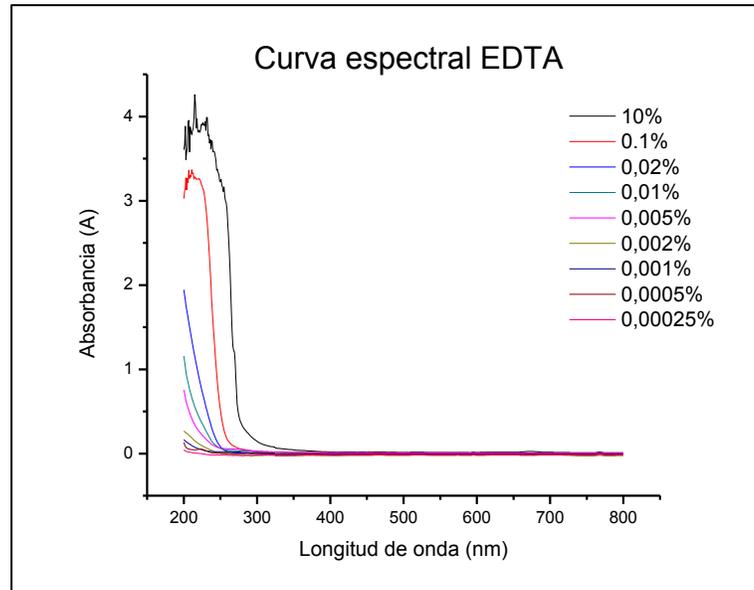


**Gráfico 14: Curva de Calibración de la NaClO**

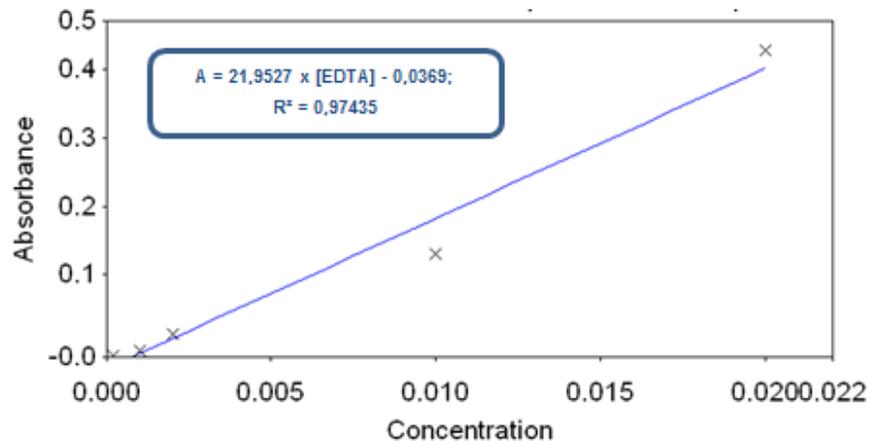
Debido a que los valores de absorbancia obtenidos en las muestras recolectadas de las fases del tratamiento 1, 2, 3 y 4 medidas a  $\lambda_{max}$  de 292 nm, fueron mayores a los comprendidos en la curva de calibración, éstas se diluyeron por un factor de 100 y nuevamente se les midió su absorbancia. 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, entre 0,00025% y 0,02%, la cual se utilizó para establecer la concentración de EDTA en las muestras recolectadas.



**Gráfico 15: Espectros de Absorción del EDTA al 10% y diluciones de distintas concentraciones.  $\lambda_{max}$ : 207 nm.**



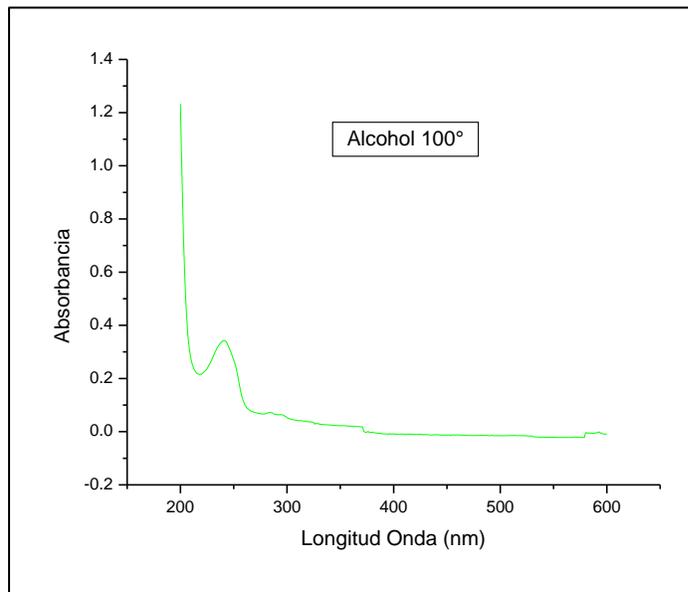
**Gráfico 16: Curva de Calibración del EDTA**

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.

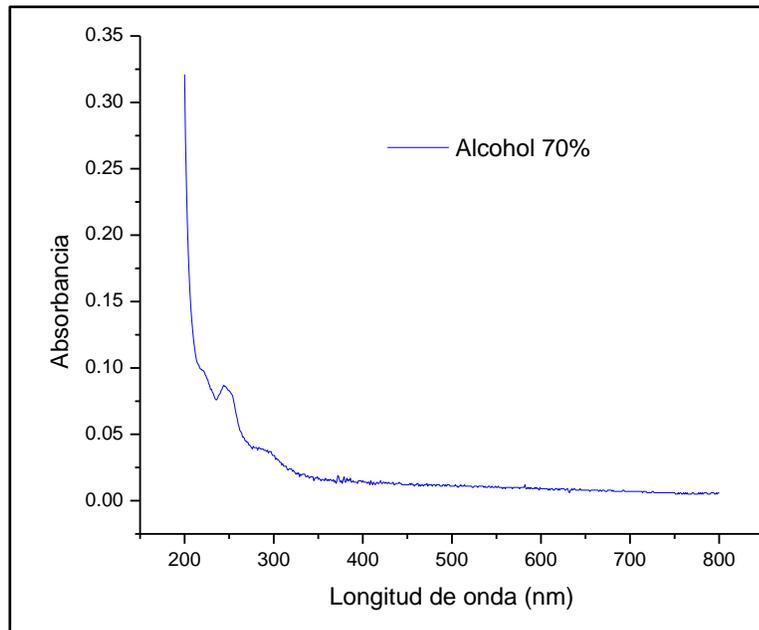
Finalmente para las muestras 9, 10 y 11 se utilizó el valor de absorbancia directamente en la ecuación de la curva sin diluir la solución.

c. Determinación del espectro de absorción de alcohol.

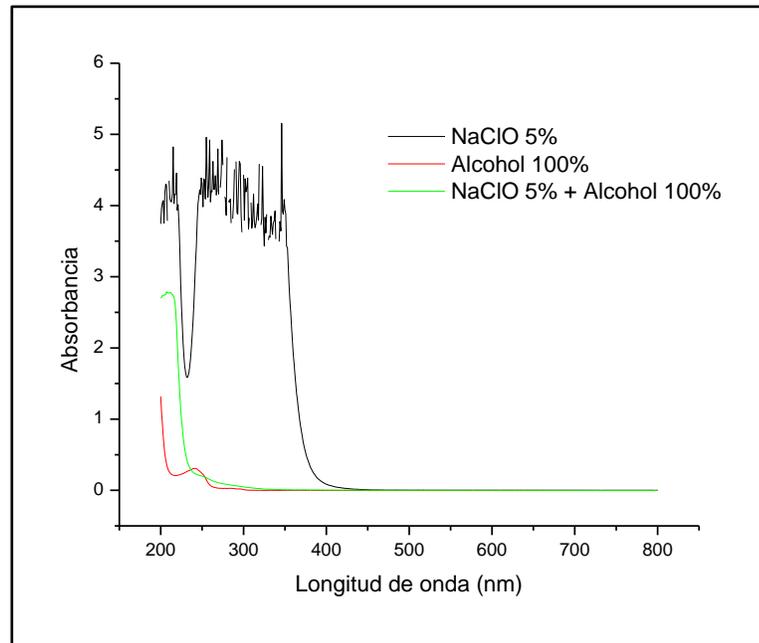
Se tomó 1 ml de Alcohol absoluto, se leyó su absorbancia en el rango UV- visible (200-800 nm) y luego se graficaron los datos obtenidos para obtener su curva espectral.



**Gráfico 17: Espectro de Absorción del Alcohol 100%**



**Gráfico 18: Espectro de Absorción del Alcohol 70%**



**Gráfico 19: Espectro de Absorción del NaClO 5% con Alcohol Absoluto**

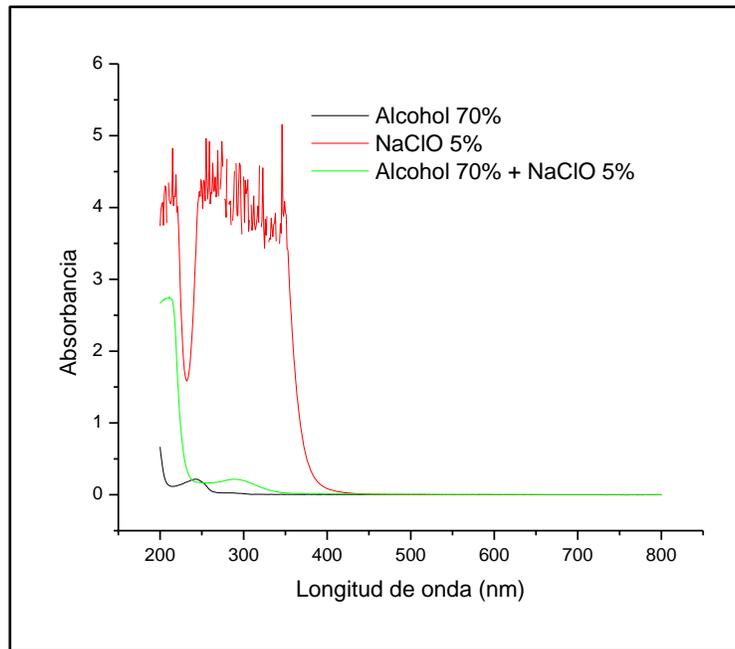


Gráfico 20: Espectro de Absorción del NaClO 5% con Alcohol 70%

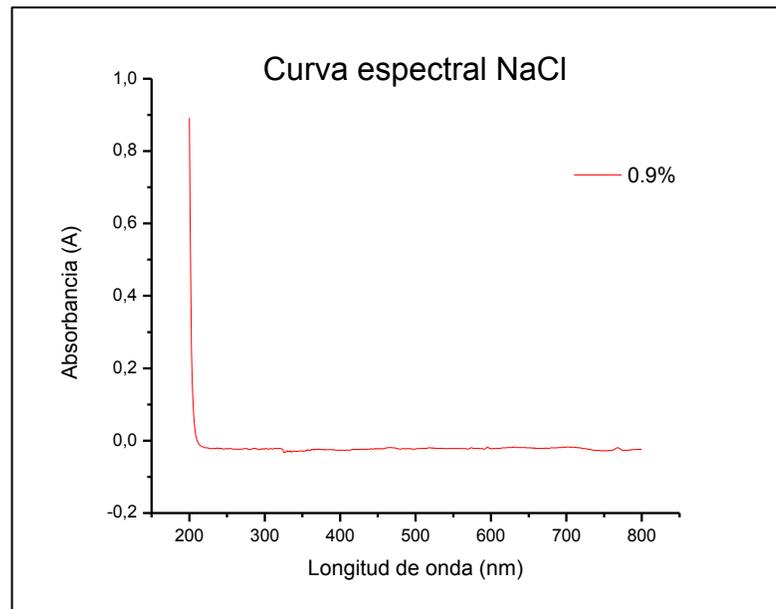
Al mezclar alcohol absoluto con diluciones acuosas de NaClO, que van del 5% al 0,0005%, se anuló el espectro de absorción típico del NaClO demostrando que ambos compuestos reaccionaban entre sí e impidiendo su cuantificación por espectrofotometría.

Por lo que se decidió diluir el alcohol a una concentración de 70% y evidenciar si presentaba un comportamiento distinto. En este caso, la mezcla alcohol 70%-NaClO presentó un perfil espectrográfico característico parecido al NaClO, demostrando que ambos irrigantes no reaccionaban entre ellos.

Debido a lo anterior, se estableció que para efecto de este trabajo la concentración que se utilizó fue del Alcohol al 70%.

d. Determinación del espectro de absorción y concentración de NaCl:

Se tomó 1 ml de solución de suero fisiológico al 0,9%, se leyó su absorbancia en el rango UV- visible (200-800 nm) y luego se graficaron los datos obtenidos para obtener su curva espectral.

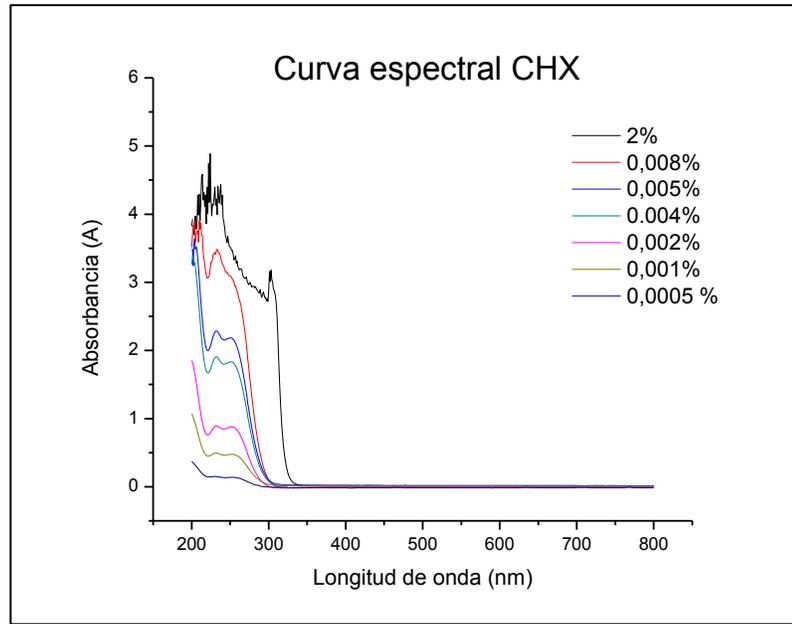


**Gráfico 21: Espectro de Absorción de NaCl 0,9%**

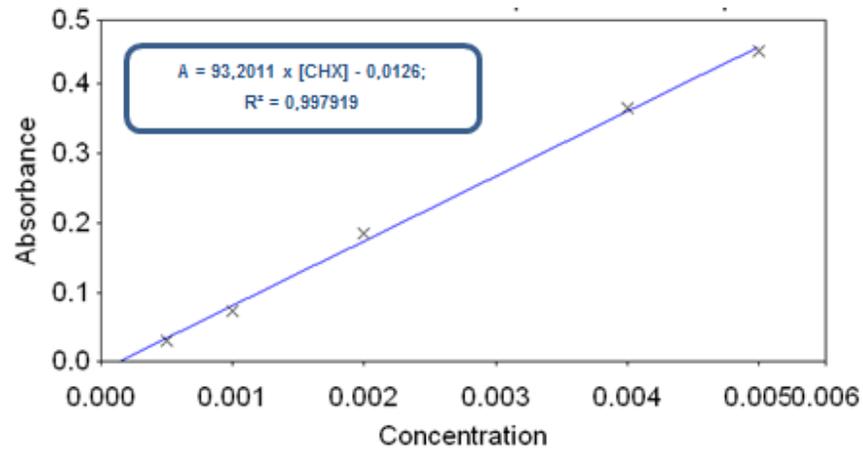
Debido a los bajos niveles de absorbancia que presenta NaCl 0,9% y a la ausencia de una longitud de onda de máxima absorción que permita identificarlo, se estableció que para efecto de este trabajo la concentración de NaCl será de 0,9%.

e. 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, entre 0,0005% y 0,005%, la cual se utilizó para establecer la concentración de CHX en las muestras recolectadas.



**Gráfico 22: Espectros de Absorción de CHX al 2% y diluciones a distintas concentraciones.  $\lambda_{max}$ : 254 nm.**



**Gráfico 23: Curva de Calibración de la CHX**

Debido a que 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.

f. 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.

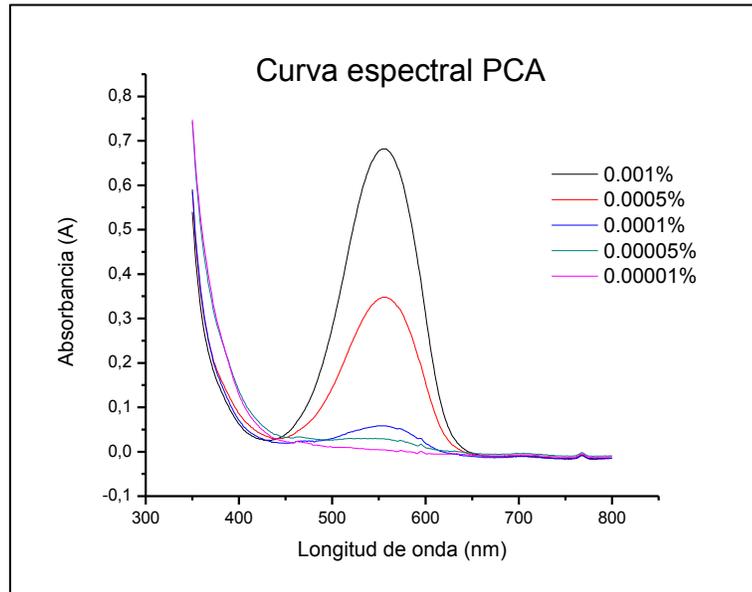
Se agregó rápidamente y se agitó después de la adición de cada una de las siguientes soluciones:

- 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 y se dejó reposar por 30 minutos.

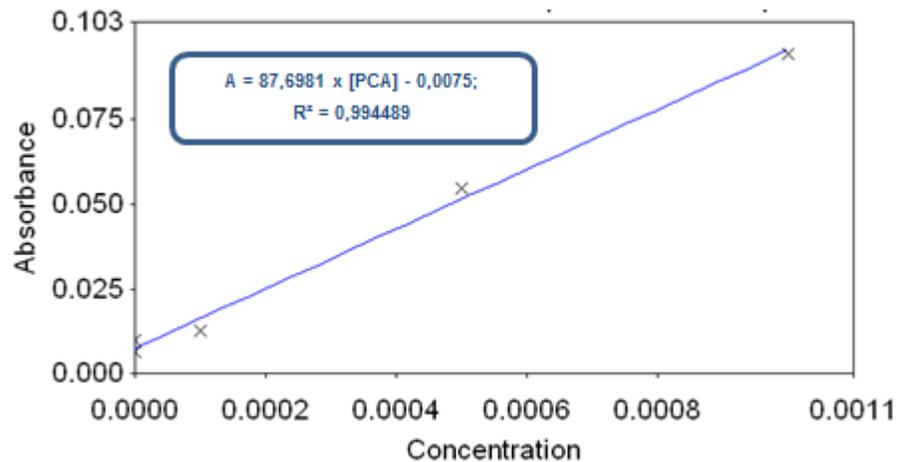
El protocolo fue aplicado a 5 estándares de soluciones de PCA Aldrich ® de concentraciones conocidas y se observó un cambio de coloración (rojo- azul) de diferente intensidad según la concentración de PCA. Se leyó su absorbancia en el rango visible (350–800 nm) y con los datos obtenidos se construyó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

Con las soluciones estándares y el  $\lambda_{max}$  se construyó la curva de calibración, entre 0,0005% y 0,001%, que se utilizó para establecer la concentración de PCA en

las muestras recolectadas, a través de la ecuación  $A = 87,6981 \times [\text{PCA}] + 0,0075$ ;  $R^2 = 0,994489$ .



**Gráfico 24: Espectros de Absorción de soluciones de PCA a distintas concentraciones, luego de ser sometidos al protocolo de identificación de PCA y determinación del  $\lambda_{\text{máx.}}$  (552 nm).**



**Gráfico 25: Curva de Calibración de PCA**

El protocolo será aplicado a 5 estándares de soluciones de PCA Aldrich ® de concentraciones conocidas. Se leerá su absorbancia y con los datos obtenidos se construirá la curva espectral para determinar su  $\lambda_{\text{máx.}}$  Con las soluciones estándares

y el  $\lambda_{max}$  se construirá la curva de calibración y se determinará la ecuación de la curva que permitirá el cálculo de la concentración de la solución estudiada.