



**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA  
DEPARTAMENTO DE ODONTOLÓGÍA CONSERVADORA  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS Y COMUNITARIAS**

**“INFLUENCIA DEL SUERO FISIOLÓGICO EN LA FORMACIÓN DE  
PARACLOROANILINA, ESTUDIO *IN VITRO*”**

**María Carolina P. Bilbao Bravo**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN  
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE  
CIRUJANO-DENTISTA**

**TUTOR PRINCIPAL**

**Prof. Dra. Silvana Maggiolo Villalobos**

**TUTORES ASOCIADOS**

**Prof. Ismael Yévenes López**

**Adscrito a Proyecto FIOUCH 2013 (En trámite)  
Santiago - Chile  
2013**





**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA  
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGÍA CONSERVADORA  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS Y COMUNITARIAS**

**“INFLUENCIA DEL SUERO FISIOLÓGICO EN LA FORMACIÓN DE  
PARACLOROANILINA, ESTUDIO *IN VITRO*”**

**María Carolina P. Bilbao Bravo**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN  
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE  
CIRUJANO-DENTISTA**

**TUTOR PRINCIPAL**

**Prof. Dra. Silvana Maggiolo Villalobos**

**TUTORES ASOCIADOS**

**Prof. Ismael Yévenes López**

**Adscrito a Proyecto FIOUCH 2013 (En trámite)  
Santiago - Chile  
2013**

A mis padres, que con tanto esfuerzo me ayudaron a llegar hasta aquí. Por su apoyo incondicional y su confianza en mí. Por entregarme los valores y herramientas que hacen de mí la persona que soy hoy.

A Mauricio, que ha sido pilar fundamental de mi vida este último año, por darme alegrías y sacarme sonrisas todos los días. Por su incentivo a reencantarme con la Odontología y sus aristas.

A la Dra. Maggiolo y al Prof. Yévenes, por su guía y paciencia durante todo el año, por todo lo enseñado que usaré como herramienta en el futuro.

A la Dra. Marcela Alcota, que inspiró mi amor por la Endodoncia y consecuentemente esta Tesis, por ser la mejor docente que conocí en mi paso por la Universidad.

A mis amigas inseparables de la Universidad, Daniela, Valentina, Francisca y Mónica. Por compartir conmigo todos los altos y bajos, y acompañarme en los momentos más memorables como estudiante.

A mis amigas de la vida, por ser las que más han confiado en mí todos estos años y siempre alentarme a perseverar y confiar en mí.

## ÍNDICE

<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
LISTA DE ABREVIACIONES.....	I
RESUMEN.....	II
INTRODUCCIÓN.....	1
MARCO TEÓRICO	
- Medicación Intracanal.....	3
- Irrigación.....	4
- Hipoclorito de Sodio.....	5
- Digluconato de Clorhexidina.....	7
- Otros Irrigantes.....	8
- Interacciones entre Irrigantes.....	9
- Paracloroanilina.....	11
- Espectrofotometría.....	13
HIPÓTESIS.....	18
OBJETIVO GENERAL.....	18
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
RESULTADOS.....	24
DISCUSIÓN .....	30
CONCLUSIONES.....	34
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35
ANEXOS	
- Protocolo Endodoncia en Diente con Lesión.....	44

## LISTA DE ABREVIACIONES

<b>Abreviación</b>	<b>Significado</b>
<b>AC</b> .....	Acido Cítrico
<b>CHX</b> .....	Clorhexidina Digluconato
<b>Ca(OH)<sub>2</sub></b> .....	Hidróxido de Calcio
<b>EDTA</b> .....	Acido etilendiaminotetraacético
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> .....	Peróxido de Hidrógeno
<b>NaCl</b> .....	Cloruro de Sodio
<b>NaCl 0,9%</b> .....	Suero Fisiológico
<b>NaClO</b> .....	Hipoclorito de Sodio
<b>PCA</b> .....	Paracloroanilina
<b>PCGH</b> .....	Paraclorofenilguanidil-1,6- diguandilhexano
<b>PCU</b> .....	Paraclorofenilurea
<b>PQM</b> .....	Preparación Quimiomecánica
<b>SEM</b> .....	Microscopía Electrónica de Barrido
<b>SCR</b> .....	Sistema de Canales Radiculares
<b>}<sub>máx</sub></b> .....	Lambda máximo

## RESUMEN

**Introducción:** En procedimientos endodónticos se usa suero fisiológico (NaCl 0,9%) posterior al uso de hipoclorito de sodio (NaClO) 5% y previo a clorhexidina gluconato (CHX) 2% como parte del protocolo de irrigación. Con CHX 2% el NaClO residual forma un precipitado de para-cloroanilina (PCA), sustancia tóxica para el organismo y que ocluye los túbulos dentinarios. El objetivo de este estudio es determinar *in vitro* la influencia de NaCl 0,9% en la formación de PCA al combinar los irrigantes usados según el protocolo de irrigación de la Clínica de Endodoncia de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

**Materiales y Métodos:** NaClO 5% y diluciones acuosas de NaClO al 0,5%, 0,005%, 0,0005% y 0,00005% en NaCl 0,9% se mezclaron con CHX 2% para ver formación de PCA. NaClO 0,05% y 0,005% se mezclaron con NaCl 0,9% y diluciones hasta NaCl 0,0009%, se agregó CHX 2% y se leyó en el espectrofotómetro a 375 nm para cuantificar PCA. CHX 2% se mezcló con NaCl 0,9% y diluciones para ver formación de precipitado. Las mezclas se realizaron en una relación de 1:1.

**Resultados:** NaClO 5% y sus diluciones forman con CHX 2% PCA. Diluciones NaClO 5% en NaCl 0,9% mezcladas con CHX 2% forman PCA hasta dilución NaClO 0,0005%, diluciones mayores forman precipitado blanco de cloruro de CHX. CHX 2% forma sólo con NaCl 0,9% precipitado blanco de cloruro de CHX. A mayor concentración de NaCl mayor concentración de PCA tanto para NaClO 0,05% y 0,005%.

**Conclusión:** A bajas concentraciones de NaClO el NaCl 0,9% produce formación de precipitado blanco de cloruro de CHX. Hubo formación de PCA a pesar de todas las diluciones de NaClO utilizadas.

## INTRODUCCIÓN

La invasión bacteriana en el sistema de canales radiculares (SCR) es crucial para el comienzo y mantenimiento de las enfermedades periapicales (Vianna y cols. 2007). Las patologías pulpares y periapicales de origen infeccioso son de etiología polimicrobiana y varían según las condiciones del hospedero, el tiempo de exposición y tipo de infección. Así, el éxito del tratamiento endodóntico depende en gran medida de una completa remoción del tejido pulpar inflamado, remanentes necróticos, microorganismos y otros detritus dentro del SCR.

Diversos estudios han demostrado que extensas áreas del canal principal no son tocadas por los instrumentos (Peters OA, 2001). Es por ello que la preparación mecánica se debe complementar con la preparación química del SCR. Ésta consiste en un conjunto de procedimientos en el que se utilizan sustancias químicas con acción antimicrobiana, las que además por acto mecánico consiguen un canal desinfectado. Entre los medios químicos se encuentran la medicación intracanal y las soluciones irrigantes usadas durante la preparación químico-mecánica (PQM).

Hay casos en los cuales la PQM no es suficiente por lo que se debe complementar con la medicación intracanal, que actúa como coadyuvante de la terapia endodóntica y consiste en la colocación de un fármaco al interior del canal entre las sesiones necesarias para la conclusión del tratamiento. Este coadyuvante toma cada día más importancia en endodoncia ya que se sabe que aún con una completa preparación quedan bacterias en el SCR (Soares y Golbert 2004).

La irrigación es un proceso que se define como el lavado y aspiración de todos los microorganismos, restos pulpares y detritus, ya sean preexistentes o creados por la instrumentación, que puedan estar contenidos en la cámara pulpar o SCR (Haapasalo 2010).

Hay una variedad de agentes antimicrobianos que se han investigado para establecer cuál es el mejor, sin embargo hasta ahora ninguno cumple con todas las propiedades deseables. Por ello es necesario implementar una combinación de ellos a fin de lograr el resultado esperado.

Generalmente los irrigantes usados en la terapia endodóntica no son eliminados completamente del SCR antes de usar el siguiente. En consecuencia éstos entran en contacto entre sí y pueden formar sub productos (Basrani y cols. 2007, Rasimick y cols. 2008), como es el caso de la para-cloroanilina (PCA), precipitado tóxico que se forma al interaccionar hipoclorito de sodio (NaClO) y clorhexidina (CHX), que además ocluye los túbulos dentinarios interfiriendo en la limpieza y sellado del SCR, por lo tanto es imprescindible el uso de un irrigante alternativo entre ellos para prevenir así la formación del precipitado (Gasic y cols. 2012, Mortenson y cols. 2012).

Por lo expuesto anteriormente, el propósito de este estudio es determinar *in vitro* la influencia de NaCl 0,9% en la formación de PCA al combinar los irrigantes usados según el protocolo de irrigación de la Clínica de Endodoncia de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

## **MARCO TEÓRICO**

Los microorganismos juegan un rol fundamental en la etiología de las patologías pulpares y periapicales. Su control y eliminación son importantes durante el tratamiento endodóntico. La limpieza y conformación del SCR por medio de instrumentación manual y rotatoria bajo irrigación constante reduce la población de microorganismos al interior de ellos, pero no los elimina completamente (Kriithikadatta y cols. 2007).

La compleja anatomía del SCR provee un medioambiente propicio para el crecimiento, multiplicación e interacción de microorganismos en infecciones pulpares y periapicales (Gomes y cols 2003).

Los microorganismos que sobreviven luego de la PQM tienen la capacidad de multiplicarse rápidamente cuando el canal se encuentra vacío (Paquette y cols. 2007); esta multiplicación puede alcanzar un número igual o superior al que existía al inicio de la infección (Lin y cols. 2003). La irrigación y medicación son parte importante de la terapia, que pueden determinar el éxito o fracaso de ésta.

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

### **Medicación Intracanal**

Se ha mostrado la importancia de la medicación entre sesiones para eliminar microorganismos que la instrumentación no pudo conseguir (Delgado y cols 2010). Entre las posibles causas de las infecciones persistentes se considera la retención de microorganismos al interior de los túbulos dentinarios. Por ello, el uso de una medicación intracanal es útil en la eliminación de microorganismos remanentes luego de la PQM, proveyendo

así un ambiente favorable para la reparación de los tejidos periapicales (Krithikadatta y cols. 2007).

Los agentes antimicrobianos más utilizados hoy en día como medicación intracanal son la CHX 2% y el hidróxido de calcio ( $\text{Ca(OH)}_2$ ) (Gomes y cols. 2003, Estrela y cols. 2007).

El  $\text{Ca(OH)}_2$  tiene acción antibacteriana moderada y actúa como una barrera física ante los microorganismos al interior del SCR además de prevenir la reinfección de éste e interrumpir el suministro de nutrientes y dióxido de carbono a los microorganismos remanentes alojados en ellos (Siqueira y Lopes 1999).

Sin embargo, una revisión sistemática publicada el año 2009 concluyó que la CHX 2% fue más efectiva que el  $\text{Ca(OH)}_2$  en eliminar a *Enterococcus faecalis*, bacteria más frecuentemente encontrada en dientes con fracasos endodónticos. Por ello, se justifica su uso como medicación intracanal en ciertos casos (Mohammadi y Abbott, 2009).

## **Irrigación**

La irrigación 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 SCR (Marchesan y cols. 2007).

Son objetivos de la irrigación: a) Acceder a la totalidad del SCR inaccesibles a los instrumentos endodónticos. b) Eliminar detritus del interior del canal, por remoción, disolución o ambas. c) Desinfectar el canal, removiendo la carga microbiana por acto mecánico y reduciéndola por acción antimicrobiana de la solución irrigadora. d) Hidratar y lubricar las paredes dentinarias, lo que permite mejorar la acción de la instrumentación mecánica.

Son propiedades deseables de una solución irrigadora (Haapasalo 2010):

- 1) Limpieza del canal (remover detritus)
- 2) Baja tensión superficial (facilitar flujo mecánico de la solución y la humectancia)
- 3) Reducir la fricción de los instrumentos (lubricación)
- 4) Disolver materia orgánica e inorgánica
- 5) Bactericida, amplio espectro, eficaz contra anaerobios, facultativos y biofilm
- 6) Efecto antimicrobiano prolongado
- 7) Biocompatible, no citotóxico
- 8) No irritar ni dañar tejido vital periapical
- 9) No debilitar la estructura dental
- 10) Inactivar endotoxinas
- 11) Eliminar el barro dentinario
- 12) No pigmentar la estructura dental
- 13) Bajo costo y accesible en el mercado

Los irrigantes que se describen con mayor frecuencia en la literatura y que están disponibles para su uso en endodoncia son el NaClO y la CHX.

### **Hipoclorito de Sodio**

El NaClO es el irrigante más comúnmente usado en endodoncia. Contiene cloro en estado de oxidación +1 adjudicándole un fuerte poder oxidante en sustancias orgánicas y microorganismos. El ácido hipocloroso es el responsable de la actividad antibacteriana.

El NaClO opera mediante tres mecanismos de acción:

- a) Saponificación: actúa como solvente orgánico al ser capaz de degradar grasas en sales de ácidos grasos (jabón) y glicerina.
- b) Oxidación: actúa oxidando aminoácidos formando principalmente aldehídos.
- 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. Ésta acción antibacteriana se debe a la inhibición de enzimas esenciales de las bacterias por medio de la oxidación.

El NaClO es usado frecuentemente en concentraciones que varían entre los 0,5% y 6% (Ohara P 1993, Leonardo MR 1999).

La concentración ideal de NaClO para su uso en endodoncia es un tema ampliamente debatido y tras numerosos estudios aún no existe un consenso. Se sabe que una menor concentración es menos dañina y disminuye las posibilidades de formar compuestos tóxicos al ser mezclado con CHX (Basrani y cols. 2007).

La actividad antimicrobiana del NaClO depende de su concentración, siendo 5,25% la más eficiente en la eliminación de microorganismos facultativos tales como *E. faecalis* (Gomes y cols. 2001, Radcliffe y cols. 2004, Vianna y cols. 2004), aeróbicos como *S. aureus* y *C. albicans* y anaeróbicos como *P. gingivalis*, *P. endodontalis* y *P. intermedia* (Vianna y cols. 2004).

El NaClO al 5,25% disminuye el módulo elástico y la flexibilidad de la dentina, no así cuando es empleado en una concentración de 0,5% (Sim y cols. 2001). Esto se debe en gran parte a la acción proteolítica del hipoclorito concentrado en la matriz dentinaria (Zehnder 2006). Cuando es usado al 6% es capaz de desorganizar el biofilm y eliminar las bacterias de éste (Clegg y cols. 2006).

El NaClO es el único irrigante endodóntico que disuelve tejido necrótico y materia orgánica. Disuelve efectivamente remanentes pulpares y colágeno, principal componente de la parte orgánica de la dentina (Haapasalo 2010).

La presencia de materia orgánica (exudado inflamatorio, tejido remanente y bacterias) debilita el efecto del NaClO, por lo tanto el tiempo y la irrigación constante son factores importantes en su efectividad (Haapasalo 2010).

Entre las debilidades del NaClO se describen sabor desagradable, fuerte irritación de los tejidos periapicales e inhabilidad de remover el barro dentinario por sí solo, pues sólo remueve materia orgánica (Spangberg y cols. 1973).

El NaClO es el principal irrigante en la terapia endodóntica y el único capaz de disolver materia orgánica, incluyendo biofilm (Clegg y cols. 2006) y la parte orgánica del barro dentinario (Haapasalo 2010), por lo tanto debe ser usado durante la instrumentación mecánica. Sin embargo, cuando se usa como irrigación final posterior al lavado con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) o ácido cítrico (AC) se produce erosión de las paredes dentinarias por lo que esto debe evitarse (Niu y cols. 2002).

### **Digluconato de Clorhexidina**

La CHX es un potente antiséptico usado ampliamente para el control químico de la placa bacteriana (Addy y Moran 1997) gracias a su excelente actividad antimicrobiana (Russel y Day 1993). Para este propósito es usado como solución acuosa en concentraciones que varían entre 0,1 y 0,2%, mientras que en endodoncia se usa al 2% como irrigante y como medicación intracanal (Zamany y cols. 2003).

Su mecanismo de acción consiste en permeabilizar la pared celular de la membrana externa y atacar así el citoplasma bacteriano.

En altas concentraciones la CHX produce coagulación de los componentes intracelulares (Mcdonnel y Russel 1999). Su mayor ventaja es su sustentividad, es decir, su capacidad de unirse a los tejidos y ser liberado gradualmente obteniendo así un prolongado efecto antibacteriano que puede durar hasta 12 semanas dentro del canal radicular (Rosenthal y cols. 2004). Sin embargo, se inactiva en presencia de materia orgánica.

La CHX, al contrario del NaClO, no erosiona la dentina al ser usada posterior al EDTA ni es citotóxico para los tejidos periapicales. Por esto y por

sus propiedades antimicrobianas es una buena opción para maximizar el efecto antibacteriano al final de la PQM (Zamany y cols. 2003). Sin embargo, la CHX no posee la capacidad de disolver tejido ni remover el biofilm bacteriano, lo que tendría un efecto negativo en la calidad del sellado (Haapasalo 2010).

Hoy en día se sabe, gracias a un gran número de estudios, que la concentración óptima para la CHX como medicación intracanal es al 2% (Basrani y cols. 2004, Zehnder 2006, Siqueira y cols. 2007), dado que es a esta concentración donde la CHX puede eliminar a *Candida Albicans* (Basrani y cols. 2004) y a *Enterococcus faecalis* (Krithikadatta y cols. 2007), algo que el  $\text{Ca(OH)}_2$  por sí solo no puede.

Se ha demostrado a través de numerosos estudios tanto *in vitro* como en humanos que la CHX 2% en gel como medicación intracanal resulta ser la alternativa más eficiente en la eliminación de *E. faecalis* al compararlo con su versión en forma líquida y con  $\text{Ca(OH)}_2$ . Debido a su sustantividad, la CHX retrasa la entrada de los microorganismos al interior a través de la porción coronal del SCR cuando es dejada al interior de ellos entre sesiones, retardando así su recontaminación.

La CHX no debe reemplazar al  $\text{NaClO}$  como irrigante de elección, pero es útil como agente coadyuvante en la etapa final de la irrigación. (Kuruvilla & Kamath 1998, Grawehr et al. 2003).

### **Otros Irrigantes**

Se describen otros irrigantes tales como agua estéril, suero fisiológico (NaCl 0,9%), peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), 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 y cols. 2010).

El yoduro de potasio al 2% y 4% es bactericida pero no disuelve tejidos (Molander y cols. 1999, Spratt y cols. 2001) y puede ser usado, al igual que la CHX, al final de la preparación quimiomecánica. Sin embargo, existe un alto riesgo de causar una reacción alérgica (Haapasalo y cols. 2010), además de provocar tinción de la corona, temas que deben ser considerados.

Zehnder propuso un protocolo de irrigación en el año 2006 que consiste en irrigar constantemente durante la instrumentación para disolver el componente orgánico, luego irrigar con EDTA para eliminar el barro dentinario, y por último una irrigación final con CHX para aprovechar su sustantividad (Zehnder 2006, Park YW 2012).

Poco se encuentra descrito en la literatura sobre el uso de suero fisiológico en endodoncia. Al parecer su uso es más común en América que en el resto del mundo. En México y Brasil éste es usado como irrigante posterior al uso de EDTA para lavarlo, en pos de la eliminación del barro dentinario. También se menciona en casos de medicación intracanal donde se mezcla polvo de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  con suero fisiológico (Flores 2004, Alves dos Santos 2004). Otros estudios en Brasil lo mencionan como parte de la irrigación final. (Vale y Garcia 2001, Pellissari 2002).

En Chile, se ha descrito también su uso como irrigante en especial como agente lubricante y de limpieza de detritus de la instrumentación en biopulpectomías, al no poseer capacidad desinfectante y tener compatibilidad biológica con los tejidos periapicales. Sumado a esto, es usado en control de hemorragia del SCR (Fuentes y Corsini, 2006).

### **Interacciones entre Irrigantes**

Generalmente los irrigantes usados en la terapia endodóntica no son eliminados completamente del SCR antes de usar el siguiente. En consecuencia éstos entran en contacto entre sí y pueden formar sub productos (Basrani y cols. 2007, Rasimick y cols. 2008), los cuales pueden ser

precipitados sólidos que son capaces de ocluir los túbulos dentinarios formando una barrera entre la gutapercha, el cemento sellador y la dentina, impidiendo un correcto sellado del SCR lo que aumenta el riesgo de microfiltración (Vivacqua-Gomes y cols. 2002, Akisue y cols. 2010). Además estos subproductos pueden ser tóxicos para los tejidos periapicales (Baumgartner y Ibay 1987).

El uso conjunto de EDTA y NaClO reduce la cantidad de hipoclorito provocando una disminución de la capacidad de disolver tejido y de la actividad antimicrobiana, por lo que estas soluciones no debieran ser mezcladas (Zehnder y cols. 2005, Rossi-Fedele y cols. 2012). Por el contrario, Soares y cols. utilizando microscopía electrónica de barrido (SEM) concluyeron que la eliminación de *E. faecalis* se lograba únicamente con el uso alternado de NaClO 5,25%, EDTA 17% y NaClO 5,25% nuevamente como irrigación final, no así con irrigación convencional de NaClO 5,25% y EDTA 17% (Soares y cols. 2010).

Al mezclar EDTA y CHX se produce un precipitado rosado que pareciera reducir el efecto del EDTA de eliminar el barro dentinario (Haapasalo 2010, Rossi-Fedele 2012).

Diversos estudios han concluido que al usar CHX con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pareciera aumentar la actividad antibacteriana (Heiling y Chandler 1998, Steinberg y cols. 1999).

Al combinar NaClO y CHX se ha visto que sus propiedades antimicrobianas se realzan (Kuruvilla y Kamath 1998). Kuruvilla sugirió que al combinar NaClO 0,5% y CHX 0,2% se potencian sus efectos antimicrobianos. Sin embargo, si hay presencia de NaClO en el canal al momento de irrigar con CHX se forma un precipitado de color café anaranjado que ha sido identificado como paracloroanilina (PCA) por algunos autores (Vivacqua-Gomes y cols. 2002, Zehnder 2006); no obstante otros autores han descartado la presencia de PCA en el precipitado usando espectroscopía de resonancia nuclear magnética (RNM) y lo han identificado como paraclorofenilurea (PCU) y

paraclorofenilguanidil-1,6-diguanidilhexano (PCGH) (Thomas y Sem 2010, Nowicky y Sem 2011).

En la interacción entre NaClO diluido en NaCl 0,9% y CHX ocurren dos reacciones simultáneas: una, es la formación de PCA entre la CHX y el NaClO. La segunda es la reacción entre el NaCl 0,9% y la CHX que provoca formación de una sal, que ocurre por transformación del gluconato de CHX en clorhidrato de CHX que sería la responsable de formar el precipitado blanco que obliterará los túbulos dentinarios e interferirá en un sellado adecuado (Riquelme MJ 2010).

### **Paracloroanilina**

La PCA es un compuesto que se forma de la interacción entre NaClO y CHX. Este precipitado insoluble es de color café anaranjado. Su color se asocia a la oxidación de la guanidina (Micklus y Stein 1973). Éste actúa como un barro dentinario químico que puede ocluir los túbulos dentinarios y comprometer la permeabilidad dentinaria, la microfiltración coronal, la difusión de los medicamentos intracanales y el sellado del SCR, además de provocar decoloración dentaria afectando así la estética (Vivacqua-Gomes y cols. 2002, Akisue y cols. 2010, Krishnamurthy y Sudhakaran 2011, Mortenson y cols. 2012). En un estudio realizado el 2012 por Gasic y cols. se analizó bajo microscopía electrónica de barrido (SEM) la ultraestructura de las paredes dentinarias luego de irrigar con NaClO 0,5% y CHX 0,2%. Los resultados mostraron obliteración de los túbulos en el tercio medio y cervical (Gasic y cols. 2012). Por esta razón se sugiere el uso de irrigantes alternativos entre NaClO y CHX para prevenir así la formación del precipitado (Gasic y cols. 2012, Mortenson y cols. 2012).

Una de las teorías que explica la formación de PCA es la Teoría de Ácidos y Bases de Lewis. Lo que ocurre es que la CHX, un ácido dicatiónico (pH 5.5-6.0), tiene la habilidad de donar protones, mientras que el NaClO es

alcalino y puede aceptar protones de la CHX dicatiónica. 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).

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 concluye que la formación y grosor del precipitado está en relación directa con la concentración de NaOCl, y además que al aumentar la temperatura de la CHX por sobre los 45° Celsius se produce PCA como subproducto, por lo tanto no debe combinarse el uso de CHX y ultrasonido (Basrani y cols. 2007).

La International Agency for Research on Cancer (IARC) categoriza la PCA en el Grupo 2B, lo que significa que este agente es potencialmente carcinogénico para los humanos (World Health Organization, 2006).

Estudios toxicológicos en animales han demostrado que PCA afecta el sistema hematopoyético, su principal toxicidad radica en la formación de metahemoglobina y desarrollo de anemia hemolítica (Chhabra y cols. 1991, Schoffstall y cols. 2004). Se ha demostrado que esto ocurre luego de 90 días de exposición a PCA (Chhabra y cols. 1991).

Considerando sólo los efectos no neoplásicos, como por ejemplo metahemoglobinemia, el nivel máximo tolerable de exposición humana a PCA está en el orden de 2µg/kg de peso/día (Boehncke y cols. 2003).

Mortenson y cols. realizaron recientemente un estudio *in vitro* en el cual se buscó un irrigante alternativo para prevenir la formación de PCA. Los

resultados arrojaron que ninguna de las soluciones usadas (suero fisiológico, AC50% y EDTA 14%) fueron capaces de impedir que se formara PCA, sin embargo el AC obtuvo la menor formación del compuesto. A pesar de que la diferencia de la cantidad de PCA encontrada entre el AC y el control negativo no fue estadísticamente significativa, se recomienda evitar el uso combinado de NaClO y CHX (Mortenson y cols. 2012).

Krishnamurthy y Sudhakaran examinaron bajo estereomicroscopía la formación de PCA posterior al lavado con distintos irrigantes usados entre NaClO 2,5% y CHX 2% previo lavado con EDTA 17%. Se confirmó formación inmediata del precipitado al usar agua destilada y NaCl 0,9% como irrigante intermedio, sin embargo no hubo formación de PCA luego de lavar con alcohol absoluto. Esto se debe probablemente a que el alcohol es un agente volátil (contribuye al secado del canal), tensoactivo, altamente electronegativo y puede penetrar profundamente en la remoción del NaClO residual presente en el SCR. Sin embargo no está bien establecido el uso de alcohol absoluto, por lo que se necesitan más estudios para su uso clínico. Además se midió el grosor del precipitado dentro del canal y se encontró que es mayor en el tercio coronal y menor en el tercio apical (Krishnamurthy y Sudhakaran 2011).

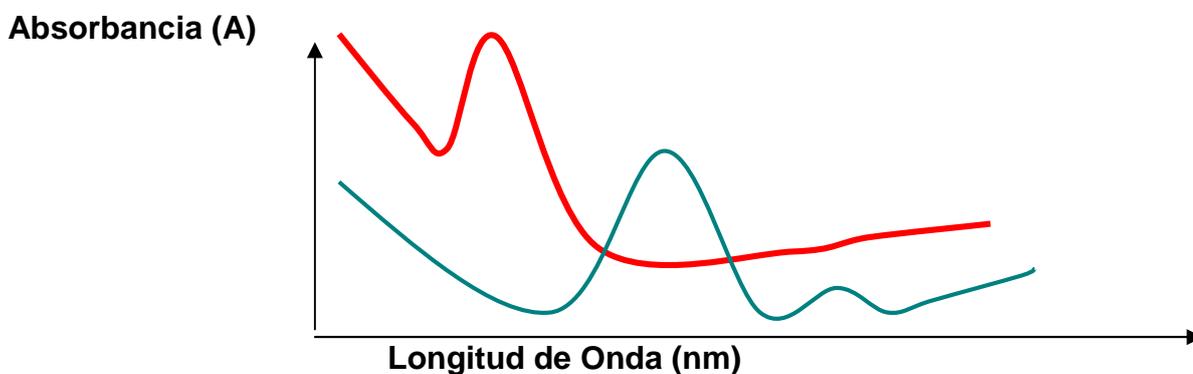
Se han utilizado variados métodos para cuantificar PCA en los distintos estudios mencionados, tales como cromatografía de gases (Mortenson y cols. 2012), espectroscopía por resonancia nuclear magnética (Thomas y Sem 2010) y espectrometría de masas (Prado y cols. 2013). Uno de los métodos más simples de utilizar para cuantificar compuestos químicos es la espectrofotometría, que se ha validado en términos de sensibilidad, robustez, exactitud y precisión para medir otros compuestos químicos (Pontarolo y cols. 2004), y se puede considerar como una buena alternativa para cuantificar PCA.

### **Espectrofotometría**

La espectrofotometría es uno de los métodos de análisis cuantitativo más usado, y se basa en la relación que existe entre la absorción de luz por

parte de un compuesto y su concentración. Cuando se hace incidir luz monocromática (de una sola longitud de onda) sobre un medio homogéneo, una parte de la luz incidente es absorbida por el medio y otra transmitida (Skoog y Leary 1994).

Cada sustancia tiene su propio espectro de absorción, el cual es una curva que muestra la cantidad de energía radiante absorbida por la sustancia, Absorbancia (A), en función de cada longitud de onda del espectro electromagnético, es decir, a una determinada longitud de onda de la energía radiante, cada sustancia absorbe una cantidad de radiación que es distinta a la que absorbe otro compuesto (Skoog y Leary 1994). Para hacer las determinaciones cuantitativas se elige, en general, la longitud de onda correspondiente a la máxima absorbancia, pues a esa longitud de onda el error de medición es mínimo y la sensibilidad máxima (Pontarolo y cols. 2004).

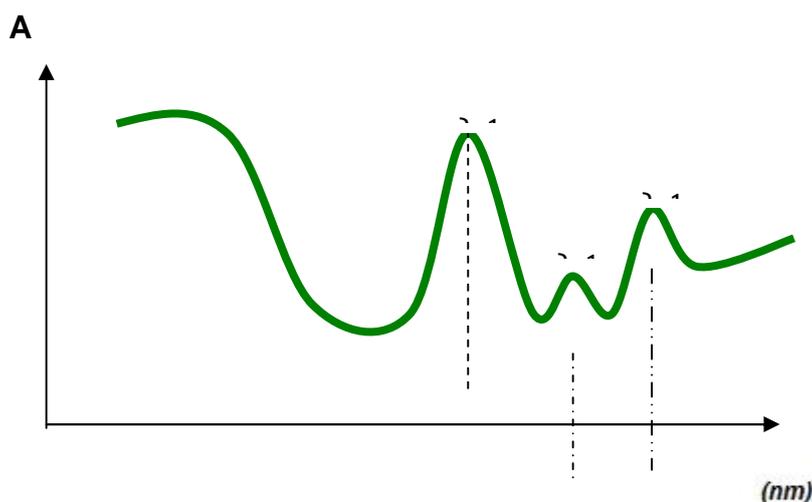


Espectro de absorción de dos compuestos diferentes (Skoog y Leary 1994).

Las mediciones se hacen por comparación entre la muestra problema y un estándar arbitrario o referencia. Ésta es llamada referencia de 100%, y se le asigna una A de cero (Skoog y Leary 1994).

La longitud de onda de trabajo corresponde, generalmente, a la longitud de onda en la cual la A del analito (sustancia a analizar) es máxima, y recibe la

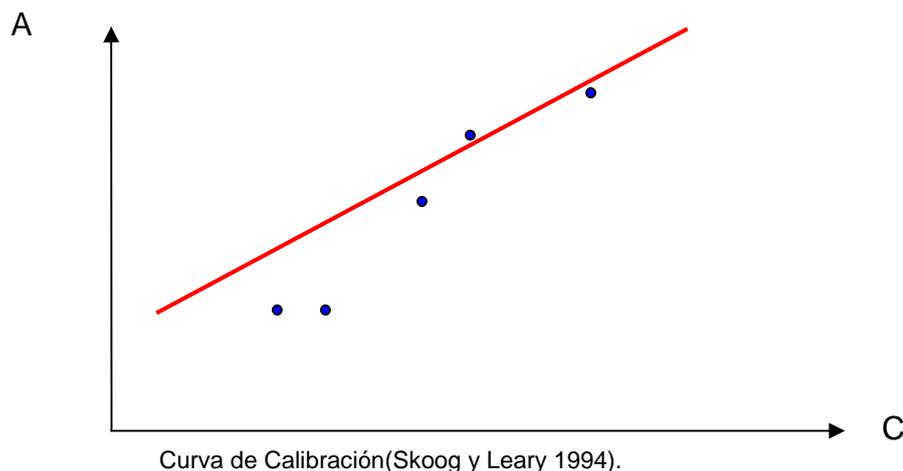
denominación de Lambda máximo ( $\lambda_{\text{máx.}}$ ). Para seleccionar el  $\lambda_{\text{máx.}}$  se hace un espectro de absorción o curva espectral, que consiste en una gráfica que informa la absorbancia de una solución (a una concentración adecuada), la que es medida a distintas longitudes de onda y en la longitud de onda de mayor absorbancia se determina el  $\lambda_{\text{máx}}$  (Skoog y Leary 1994).



Curva espectral (Skoog y Leary 1994).

Las mediciones de A se hacen en la zona de longitudes de onda donde se espera que absorba la sustancia problema. Si se trata de sustancias coloreadas, las mediciones se realizan en la zona visible del espectro electromagnético (380 a 800nm) (Skoog y Leary 1994).

La Curva de Calibración es uno de los métodos más utilizados para determinar la concentración de una muestra problema. Corresponde a una gráfica que relaciona la concentración de al menos cinco soluciones estándar de concentraciones conocidas, con la A de cada uno de ellos a la longitud de onda máxima ( $\lambda_{\text{máx.}}$ ) (Skoog y Leary 1994).



Al hacer la curva de calibración, se debe emplear la longitud de onda de máxima absorbancia ( $\lambda_{\text{máx.}}$ ), para obtener una recta con la máxima pendiente y así tener mayor sensibilidad y precisión al hacer las mediciones (Skoog y Leary 1994).

Así, se relaciona una variable medible (por ejemplo absorbancia) con una variable a determinar (concentración) por medio de una función lineal. Al reemplazar la variable independiente de dicha función se obtiene la concentración de la muestra.

El método espectrofotométrico se ha validado para ser utilizado en la cuantificación de sustancias químicas específicas (Pontarolo y cols. 2004). Dado que el PCA ha demostrado ser dañino para la salud y perjudicial para el éxito del tratamiento endodóntico se hace indispensable cuantificar su potencial formación producto de la interacción de los distintos irrigantes utilizados en la terapia endodóntica. Se ha propuesto que sustancias como EDTA, AC y alcohol absoluto son capaces de evitar o disminuir su formación, sin embargo se ha visto que en su interacción con CHX estos forman un precipitado blanquecino que podría ocluir los túbulos dentinarios impidiendo un buen sellado del SCR. Así, se ha propuesto investigar otras sustancias irrigantes, entre las cuales destaca el NaCl 0,9% por ser un irrigante de uso endodóntico que poco se ha investigado y que es utilizado en la clínica e impartido como parte del protocolo de irrigación en Facultades de odontología. Por ello el

estudio de su interacción con los otros irrigantes y su incidencia en la formación de PCA es un tema importante a considerar.

## **HIPÓTESIS**

La dilución de hipoclorito de sodio al 5% mediante la irrigación con suero fisiológico previo a la irrigación con digluconato de clorhexidina al 2% impide la formación de para-cloroanilina.

## **OBJETIVOS**

### Objetivo General

Determinar *in vitro* el efecto del suero fisiológico en la formación de para-cloroanilina, al ser usado después de hipoclorito de sodio al 5% y previo a digluconato de clohexidina 2%.

### Objetivos Específicos

1. Cuantificar la formación de PCA al realizar diluciones acuosas de NaClO 5% mezcladas con CHX 2%
2. Cuantificar la formación de PCA a partir de diluciones de NaClO 5% en NaCl 0,9%
3. Visualizar la formación de cloruro de CHX formado entre NaCl 0,9% y CHX 2%.
4. Cuantificar la formación de PCA al mezclar soluciones de NaClO 0,05% y 0,005% con NaCl 0,9% y sus diluciones, luego de agregar CHX 2%.

## MATERIALES Y MÉTODO

Estudio experimental descriptivo. No fue necesario determinar el tamaño muestral (n) dado que al tratarse de reacciones químicas reproducibles, darán siempre el mismo resultado.

### Materiales

- Hipoclorito de Sodio 5% Clorinda® CLOROX CHILE, Chile
- Clorhexidina 2% Oralgene® Maver, Chile
- Espectrofotómetro UNICAM®UV/VIS, Estados Unidos
- Cloruro de sodio 0,9%
- Agua destilada
- Tubos de ensayo
- PCA estándar en polvo ALDRICH, Alemania
- Micropipetas 100 y 1000
- Cubetas de cuarzo 5cc
- Tubos eppendorf
- Pipetas
- Vaso precipitado
- Gradilla

### Procedimientos de Laboratorio

Determinación de  $\lambda_{\text{máx}}$ : usando un estándar PCAALDRICH® 0,39 g/100ml se diluyó hasta concentraciones de  $10^{-4}$  a  $10^{-5}$  g/ml. Se corrieron en el espectrofotómetro los espectros de absorción en el rango UV y visible y en ellos se determinó el lambda máximo ( $\lambda_{\text{máx}}$ ). Para ello se tomó 2 ml de PCA 0,39% con una micropipeta de 1000 $\mu$ l y se colocaron en una cubeta de cuarzo la cual se llevó al espectrofotómetro utilizando agua destilada como blanco. Se leyó entre las longitudes de onda 200nm y 800nm y se obtuvo el peak de absorbancia en el espectro visible, determinando así la longitud de onda de trabajo.



Fig. N° 1 Espectrofotómetro de luz visible UNICAM UV/VIS.



Fig. N° 2 Cubetas de cuarzo

Para poder relacionar la absorbancia con la concentración de PCA en el espectrofotómetro, se construyó una curva de calibración. A partir de la solución de PCA al 0,39% se realizaron 5 diluciones con agua destilada: 0,00039%, 0,00078%, 0,000975%, 0,00195% y 0,039%, obteniendo así cinco soluciones medibles.

Se midió la absorbancia de estas cinco soluciones de concentración conocida a la longitud de onda de máxima absorción.

De tal manera que se construyó el gráfico de absorbancia versus concentración de PCA determinando la ecuación de la curva.

### Ensayo 1

Diluciones de NaClO5% en agua destilada más CHX 2%

Se realizaron en matraces rotulados las diluciones de NaClO en agua destilada. En tubos de ensayo rotulados del 1 al 5 se mezcló 1ml de cada dilución con 1ml de CHX 2%. Al cabo de 15 minutos se midió la A de cada

mezcla en el espectrofotómetro  $\lambda_{\text{máx}}$  y se cuantificó así la concentración de PCA formado.

**Tabla 1. NaClO 5% y diluciones en agua destilada mezcladas con CHX 2%.**

N° Tubo	CHX 2% (ml)	NaClO dilución agua destilada
1	1	1ml 5%
2	1	1ml 0,5 %
3	1	1ml 0,05 %
4	1	1ml 0,005 %
5	1	1ml 0,0005 %

### Ensayo 2

Diluciones de NaClO 5% en NaCl 0,9%, más CHX 2%

Se realizaron en matraces rotulados diluciones de NaClO en NaCl 0,9%. En tubos de ensayo rotulados del 1 al 5 se mezcló 1ml de cada dilución con 1ml de CHX 2%. Al cabo de 15 minutos se midió la A de cada mezcla en el espectrofotómetro a  $\lambda_{\text{máx}}$  y se cuantificó así la concentración de PCA formado.

**Tabla 2. NaClO y diluciones en NaCl 0,9% mezcladas con CHX 2%.**

N° Tubo	CHX 2% (ml)	NaClO dilución NaCl 0,9 %
1	1	1ml 5%
2	1	1ml 0,5 %
3	1	1ml 0,05 %
4	1	1ml 0,005 %
5	1	1ml 0,0005%

Ensayo 3

## Diluciones de NaCl 0,9% más CHX 2%

Se realizaron en matraces rotulados diluciones de NaCl 0,9%. En tubos de ensayo rotulados del 1 al 5 se mezcló 1ml de cada dilución con 1ml de CHX 2%.

**Tabla 3. NaCl 0.9% y diluciones mezcladas con CHX 2%.**

N° Tubo	CHX 2% (ml)	NaCl 0,9%
1	1	1ml 0,9%
2	1	1ml 0,09%
3	1	1ml 0,009 %
4	1	1ml 0,0009 %
5	1	1ml 0,00009 %

Ensayo 4

Reacción entre NaClO 0,05% y 0,005% con diluciones de NaCl 0,9%, más CHX 2%.

Se tomaron 1ml de cada una de las soluciones NaClO 0,05% y 0,005% y se hicieron reaccionar con 1ml de diluciones de NaCl 0,9%. Se mezclaron en tubos de ensayo rotulados del 1 al 4 con 2ml de CHX 2%. Al cabo de 15 minutos se midió la A de cada mezcla en el espectrofotómetro a  $\lambda_{\text{máx}}$  y se cuantificó así la concentración de PCA formado.

**Tabla 4. NaCl 0,9% y diluciones en agua destilada mezcladas con NaClO 0,05% y CHX 2%.**

N° Tubo	NaClO 0,05%	NaCl	CHX 2%(ml)
1	1 ml	1ml 0,9%	2
2	1 ml	1ml 0,09 %	2
3	1 ml	1ml 0,009 %	2
4	1 ml	1ml 0,0009 %	2

**Tabla 5. NaCl 0,9% y diluciones en agua destilada mezcladas con NaClO 0,005% y CHX 2%.**

N° Tubo	NaClO 0,005%	NaCl	CHX 2%(ml)
1	1 ml	1ml 0,9%	2
2	1 ml	1ml 0,09 %	2
3	1 ml	1ml 0,009 %	2
4	1 ml	1ml 0,0009 %	2

#### Determinación de PCA

En las mezclas realizadas se determinó la concentración de PCA utilizando las curvas de calibración elaboradas anteriormente. Se midieron las A por espectrofotometría UV y visible y sus valores se transformaron en concentración usando la ecuación que relaciona A con concentración de NaClO.

## RESULTADOS

En la fig. 3 se muestra el espectro completo de PCA. Se obtuvo el peak de absorbancia a los 375nm determinando así la longitud de onda de trabajo ( $\lambda_{\text{máx}}$ ).

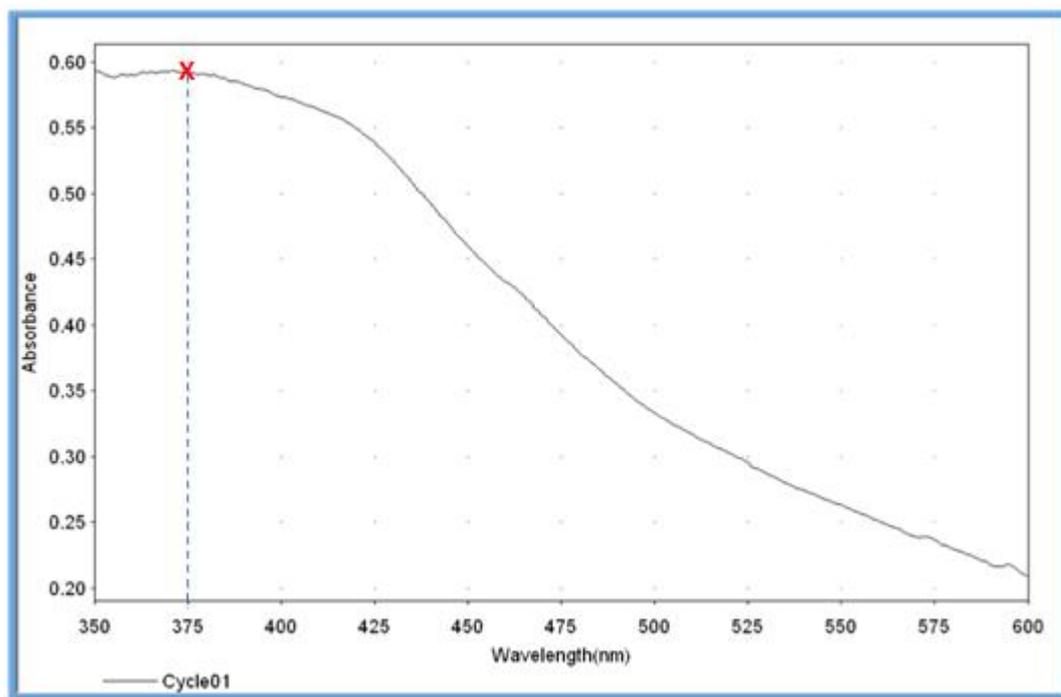


Fig. 3. Lambda máx. se obtuvo a los 375 nm

Tabla 6. Absorbancia en función de concentración de PCA.

Concentración (%)	Absorbancia
0,000390	0,449
0,000780	0,671
0,000975	0,849
0,001950	0,537
0,003900	2,700

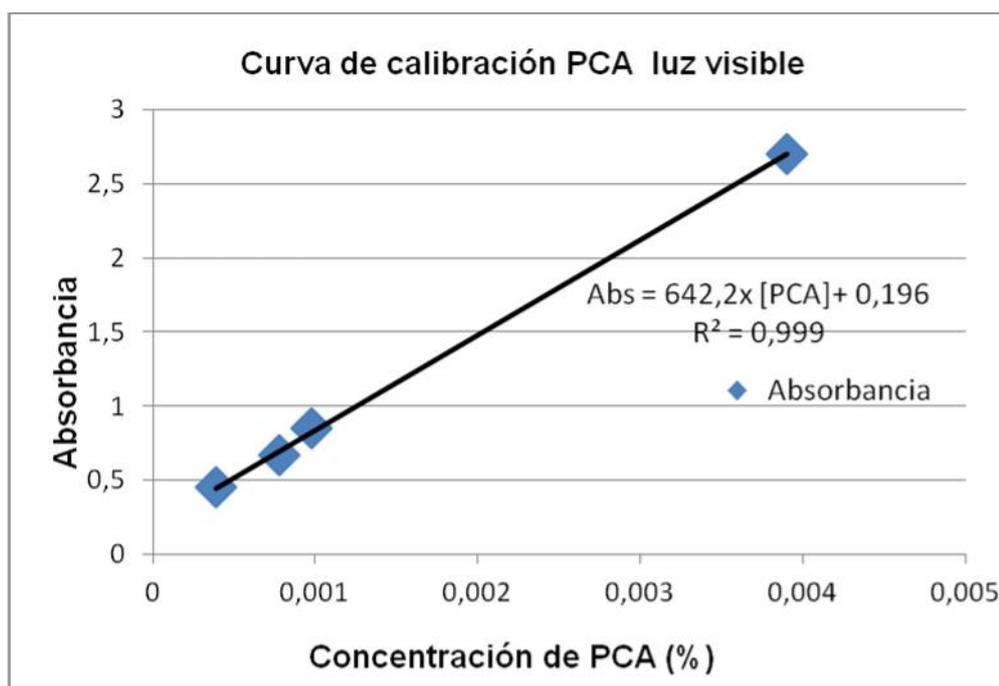


Fig. 4. Curva de calibración de PCA a partir de PCA estándar construida con la longitud de onda de trabajo (375 nm).

### Ensayo1

Como se ve en la Fig. 5, NaOCl 5% y sus diluciones forman precipitado coloreado caracterizado como PCA hasta NaClO 0,5%. NaClO 0,05%, 0,005% y 0,0005% no forman precipitado, pero sí solución coloreada de PCA.

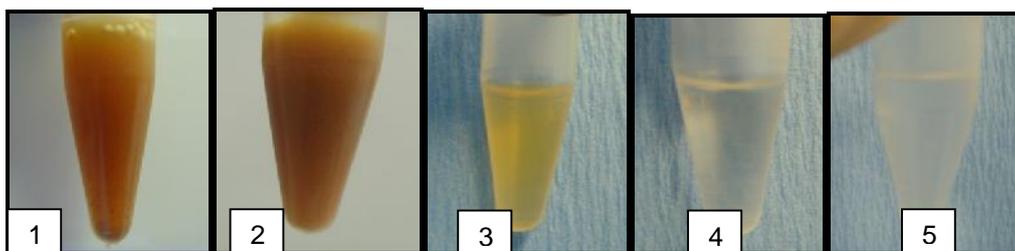


Fig. 5. Aspecto visual de las reacciones entre: **(1)** NaClO 5% y CHX 2%. **(2)** NaClO 0,5% y CHX 2%. **(3)** NaClO 0,05% y CHX 2%. **(4)** NaClO 0,005% y CHX 2%. **(5)** NaClO 0,0005% y CHX 2%.

Las concentraciones de NaClO 5% y 0,5% de los tubos (1) y (2) formaron precipitado que imposibilitó su lectura al espectrofotómetro. Para el resto de las diluciones se muestran sus absorbancias en la Tabla 7, que evidencian formación de PCA.

**Tabla 1. Absorbancia en función de la concentración de NaClO.**

<b>Concentración NaClO (%)</b>	<b>Absorbancia</b>
0,05	1,930
0,005	0,410
0,0005	0,279

### Ensayo2

En la fig. 6 se muestra que soluciones de NaClO 5% y NaClO 0,5% en NaCl 0,9% mezcladas con CHX 2% forman PCA, mientras que diluciones mayores forman precipitado blanco. Dada la presencia de precipitado en todas las reacciones, no fue posible realizar mediciones en el espectrofotómetro.

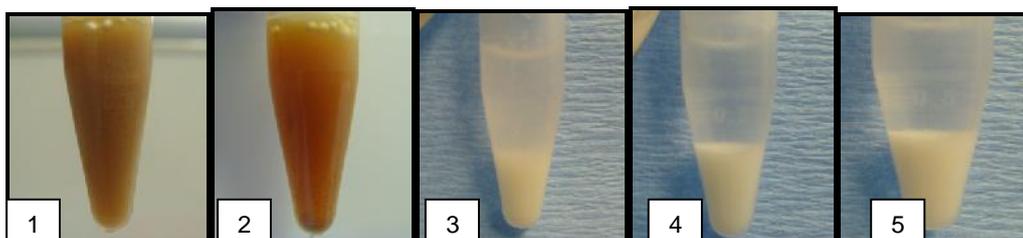


Fig. 6. Aspecto visual de las reacciones entre: **(1)**NaClO 5%, NaCl 0,9% y CHX 2%. **(2)** NaClO 0,5%, NaCl 0,9% y CHX 2%. **(3)** NaClO 0,05%, NaCl 0,9% y CHX 2%. **(4)** NaClO 0,005%, NaCl 0,9% y CHX 2%. **(5)** NaClO 0,0005%, NaCl 0,9% y CHX 2%

### Ensayo 3

En la tabla 8 se muestra el resultado observado en cada reacción. En la fig. 7 se observa precipitado blanco en la primera reacción, y ausencia de precipitado en el resto de las reacciones.

Tabla 2. Reacción entre CHX y NaCl.

N° Tubo	CHX 2% (ml)	NaCl	Resultado
1	1	1ml 0,9%	Precipitado blanco de cloruro de CHX
2	1	1ml 0,09 %	Sin reacción observable
3	1	1ml 0,009 %	Sin reacción observable
4	1	1ml 0,0009 %	Sin reacción observable
5	1	1ml 0,00009 %	Sin reacción observable

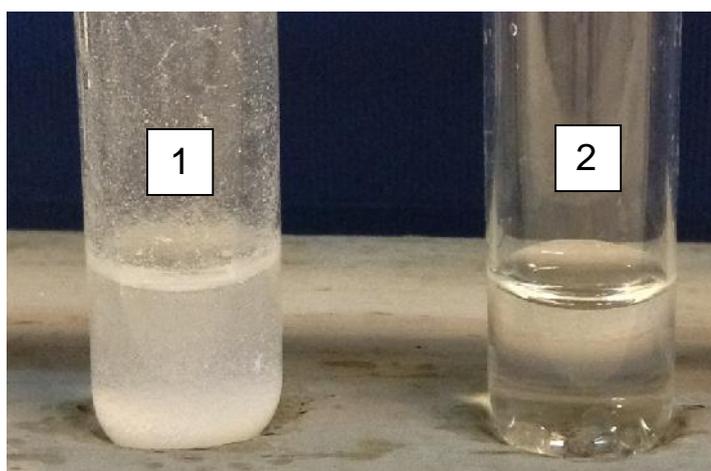


Fig. 7. Aspecto visual de las reacciones entre **(1)** NaCl 0,9% y CHX 2%. **(2)** NaCl 0,09% y CHX 2%.

#### Ensayo4

En la tabla 9 se muestran las A de NaClO 0,05% y 0,005% a diferentes concentraciones de NaCl en presencia de CHX 2%

**Tabla 3. Absorbancia NaClO 0,05% en función de concentración de NaCl.**

N° Tubo	NaClO 0,05%	NaCl (%)	CHX 2%(ml)	Absorbancia	Concentración PCA (%)
1	1 ml	1ml 0,9	2	0,909	0,001109142
2	1 ml	1ml 0,09	2	0,576	0,000590645
3	1 ml	1ml 0,009	2	0,533	0,000523691
4	1 ml	1ml 0,0009	2	0,529	0,000517463

**Tabla 4. Absorbancia NaClO 0,005% en función de concentración de NaCl.**

N° Tubo	NaClO 0,005%	NaCl (%)	CHX 2% (ml)	Absorbancia	Concentración PCA (%)
1	1 ml	1 ml 0,9	2	0,217	0,001109142
2	1 ml	1 ml 0,09	2	0,155	0,000590645
3	1 ml	1ml 0,009	2	0,147	0,000523691
4	1 ml	1ml 0,0009	2	0,134	0,000517463

En las fig. 8 y 9 muestran la relación lineal.

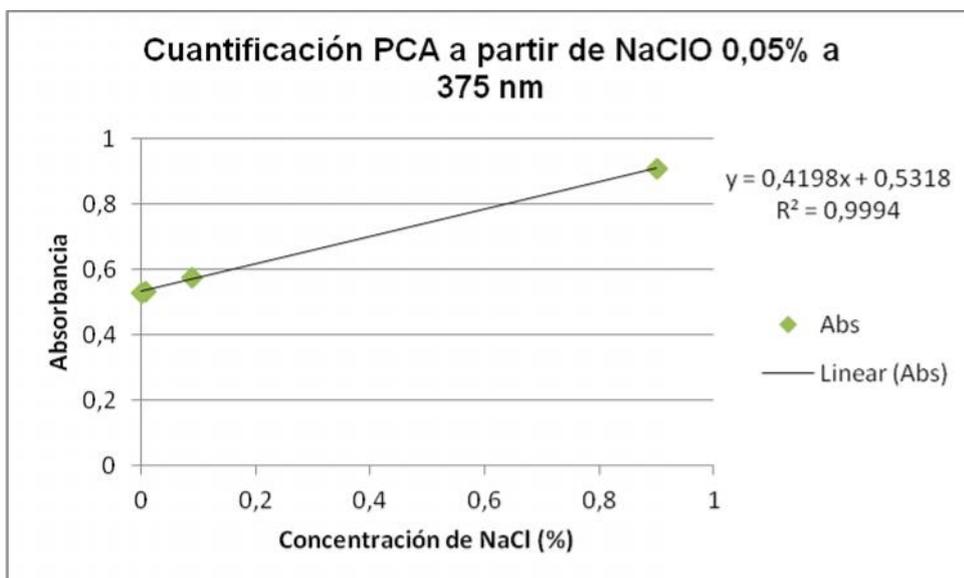


Fig. 8. PCA formado a partir de NaClO 0,05% a distintas concentraciones de NaCl.

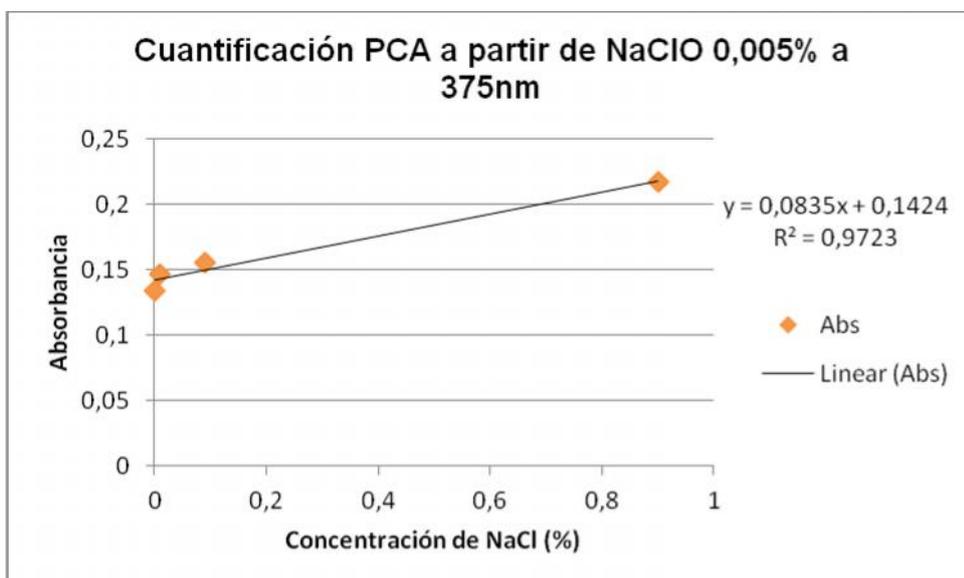


Fig. 9. PCA formado a partir de NaClO 0,005% a distintas concentraciones de NaCl.

## DISCUSIÓN

Cada terapia endodóntica es individual para cada caso clínico particular, pero todas tienen como objetivo lograr un canal radicular libre de microorganismos, favorecer la reparación del tejido dañado, dar un buen sustrato para su posterior rehabilitación y no dañar los tejidos circundantes.

Algunos autores han postulado que el uso combinado de NaClO y CHX como parte del protocolo de irrigación durante la terapia endodóntica disminuye significativamente la microbiota intracanal en comparación al uso de ambos antimicrobianos por separado (Kuruvilla y Kamath 1998, Vianna y cols. 2004, Zehnder 2006, Vianna y Gomes 2009). Sin embargo también se ha propuesto que esta disminución se debe a la presencia de un sub producto de color café anaranjado (Vianna y Gomes 2009), tóxico para el organismo (Chhabra y cols. 1991, Schoffstall y cols. 2004, World Health Organization, 2006) y capaz de obliterar los túbulos dentinarios (Bui y cols. 2008) denominado PCA que además ha demostrado ser potencialmente carcinogénico para los humanos (World Health Organization, 2006).

En el presente trabajo se estudió por primera vez el efecto del NaCl 0,9% en la formación de PCA, al ser usado tras NaClO 5% y previo a CHX 2%; y se determinó que la dilución de NaClO 5% con NaCl 0,9% no impide la formación de PCA, por lo tanto, no se confirma la hipótesis planteada.

En este estudio se evidenció que al mezclar CHX 2% con diluciones acuosas de NaClO que van del 5% al 0,0005% la solución cambia de color en relación directa a la concentración de NaClO, lo que se corresponde con los resultados obtenidos por Basrani y cols. (2007) y Gasic y cols. (2012). Se determinó presencia de PCA a todas las concentraciones y se corroboró también que a mayor concentración de NaClO en presencia de CHX 2% aumenta en relación directa la absorbancia, lo que traducido en la curva de calibración corresponde a una mayor concentración de PCA formado, en concordancia con los resultados obtenidos por Basrani y cols. (2007).

Estudios recientes han demostrado una obliteración significativa de los túbulos dentinarios en los tercios coronal y medio luego de irrigar con NaClO, secar con conos de papel estériles e irrigar finalmente con CHX (Bui y cols. 2008, Gasic y cols. 2012). Por otra parte, un estudio en Corea demostró la ausencia de precipitado al interior de todos los canales excepto en uno, utilizando cuatro métodos de irrigación distintos que incluían NaClO y CHX (Kim y cols. 2010).

La formación de precipitado se obtuvo a las concentraciones de 5% y 0,5%, pero no a 0,05%, 0,005% y 0,0005%, lo cual está en relación a lo descrito en la literatura que determina que la concentración mínima en producir precipitado es del orden de 0,19% (Basrani y cols. 2007). No obstante, las propiedades antimicrobianas óptimas del NaClO se logran a concentraciones mayores. (Carson y cols. 2005, Berber y cols. 2006).

Diversos estudios han estudiado las interacciones entre NaClO y CHX y se han encontrado resultados dispares; mientras algunos han confirmado la presencia de PCA (Basrani y cols. 2007, 2009, 2010, Krishnamurthy y Sudhakaran 2011, Mortenson y cols. 2012), otros la han descartado (Thomas y Sem 2010, Nowicky y Sem 2011, Prado y cols. 2013). Estas diferencias podrían deberse a los distintos métodos utilizados en los estudios.

Se investigó en este estudio la influencia de NaCl 0,9% y sus diluciones en la formación de PCA al mezclarlo con los dos irrigantes de mayor uso en endodoncia: la CHX y el NaClO. De la interacción entre NaClO diluido en NaCl 0,9% con CHX 2% ocurren dos reacciones simultáneas. Una, fue la formación de precipitado café anaranjado, imposible de medir por espectrofotometría, pero de igual aspecto que el encontrado en el primer experimento por lo que se especula que se trata de PCA. Esta reacción predomina hasta cuando la concentración de NaClO es de 0,5%. Para concentraciones menores, correspondientes en este estudio a 0,05%, 0,005% y 0,0005%, predomina una segunda reacción la cual se observó como un precipitado de color blanco en las 3 diluciones, formación de clorhidrato de CHX, el cual impidió su medición en el espectrofotómetro.

Estos resultados están en relación a estudios previos en modelos *ex vivo* que han encontrado resultados concordantes al utilizar NaCl 0,9% entre NaClO a distintas concentraciones y CHX 2%. Valera y cols. (2010) descubrió que había menos de un 45% de túbulos dentinarios abiertos luego de intercalar NaCl 0,9% entre NaClO 2,5% y CHX 2%. Krishnamurthy y Sudhakaran (2011) determinaron que al irrigar con NaCl 0,9% entre ambos irrigantes hay una disminución del grosor del precipitado de PCA, sin embargo éste no deja de formarse al interior del SCR. Si bien estos estudios concluyen que hay una disminución en la formación de PCA al utilizar NaCl 0,9% como irrigante intermedio, ninguno confirmó su eliminación absoluta y por lo tanto se deduce que el NaCl 0,9% no impide su formación.

Al mezclar NaCl 0,9% y sus diluciones con CHX 2% se observó la presencia del precipitado blanco únicamente en la mezcla más concentrada. En el resto de ellas no se observó reacción. Puesto que el NaClO es el responsable de la hidrólisis de CHX que conlleva a la formación de PCA, éste no se encuentra presente en la reacción.

El precipitado blanco formado entre NaCl 0,9% y la CHX se ha descrito anteriormente por otros autores (Rossi-Fedele y cols. 2012, Prado y cols. 2013 y su formación se explica por la precipitación de las sales de CHX al aumentar la concentración de sal en el medio dada por el cloruro de sodio al 0,9%, lo que no ocurre al diluirlo puesto que la concentración de sal no es la suficiente para hacer precipitar las sales de la molécula de CHX.

Un estudio *in vitro* en el año 2007 determinó por medio de espectrofotometría de absorción atómica la formación y precipitación de sales insolubles de color blanco al mezclar CHX con NaCl 0,9% (Marchesan y cols. 2007).

Sorpresivamente se obtuvo que para ambas diluciones acuosas de NaClO 0,05% y 0,005% a mayor concentración de NaCl la absorbancia fue mayor, lo que se traduce en una mayor concentración de PCA formado. Se esperaba que una mayor concentración de NaCl disminuyera la cantidad de

hipoclorito disponible e interfiriera en la reacción con la CHX disminuyendo la formación de PCA, sin embargo el resultado demostró lo contrario.

Las mezclas entre soluciones de NaClO 0,05% y 0,005% con NaCl 0,9% y sus diluciones más la CHX 2% forman soluciones coloreadas. Los valores de absorbancia medidos indicaron que mayor concentración de NaCl es mayor la formación de PCA. Esto se traduce en que el NaCl no impide la formación de PCA.

Se han estudiado varios irrigantes para ser combinados con NaClO a fin de realzar sus propiedades antimicrobianas y que tengan la capacidad de impedir la formación de precipitado que interfiera con el sellado. Puesto que hasta el momento no existe un consenso sobre cuál es la combinación más indicada y todos han demostrado generar formación de sub-productos, escasa o nulamente conocidos en cuanto a naturaleza y propiedades, se debe evitar al máximo realizar combinaciones innecesarias entre ellos. Algunos autores nombran al agua destilada y al alcohol isopropílico como los más inocuos para ser usados intermitentemente entre irrigantes a fin de arrastrar mecánicamente las trazas de irrigantes auxiliares usados previamente (Rossi-Fedele 2012), aunque la biocompatibilidad del alcohol absoluto con los tejidos periapicales no está bien establecida (Krishnamurthy y Sudhakaran 2011, Prado y cols. 2013). Consecuentemente se requieren aún más estudios para esclarecer tanto la naturaleza y propiedades de los sub-productos, como para determinar un régimen de irrigación apropiado y seguro para el éxito del tratamiento endodóntico.

Se recomienda realizar más estudios sobre el efecto del NaCl 0,9% en la formación de PCA durante el tratamiento endodóntico en modelos *ex vivo* y en humanos, dado que es un irrigante que ha sido escasamente estudiado en modelos *in vitro* y que es de uso común en clínica.

## CONCLUSIONES

1. Hubo formación de PCA en todas las diluciones de NaClO utilizadas.
2. La dilución de NaClO con NaCl 0,9% no impide la formación de PCA.
3. A concentraciones de NaClO 0,05% y 0,005% el NaCl 0,9% produce formación de precipitado blanco de cloruro de CHX.
4. Queda en duda la capacidad del precipitado de ocluir los túbulos dentinarios e interferir en el sellado del SCR.
5. El precipitado blanco se deja de formar al diluir el NaCl 0,9%.
6. La evidencia disponible es aún insuficiente y no existe consenso sobre el volumen, tiempo, secuencia y combinación ideal de irrigantes y medicamentos intracanales.
7. Se sugiere complementar el estudio midiendo las concentraciones de los irrigantes utilizando protocolos de irrigación en modelos *ex vivo* y en humanos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Addy y Moran 1997. Clinical indications for the use of chemical adjuncts to plaque control: chlorhexidine formulations. *Periodontol 2000*, 15:52– 54.

Akisue E, Tomita V, Gavini G, Poli de Figueiredo A, 2010. Effect of the combination of sodium hypochlorite and chlorhexidine on dentinal permeability and scanning electron microscopy precipitate observation. *J Endod* 36, 847–850.

Alves dos Santos KS, 2004. Preparo dos canais com instrumentos rotatórios. *Revista Gaucha de Odontologia*. 52 (1). 52-54.

Basrani B, Ghanem A, Tjaderhane L, 2004. Physical and Chemical Properties of Chlorhexidine and Calcium Hydroxide-Containing Medications. *J Endod*. 30 (6): 413-17

Basrani B, Manek S, Fillery E, 2009. Using diazotization to characterize the effect of heat or sodium hypochlorite on 2.0% chlorhexidine. *J Endod* 35(9): 1296-9.

Basrani B, Manek S, Mathers D, Fillery E, Sodhi R, 2010. Determination of 4-chloroaniline and its derivatives formed in the interaction of sodium hypochlorite and chlorhexidine by using gas chromatography. *J Endod* 36(2): 312-14.

Basrani BR, Manek S, Sodhi R, Fillery E, Manzur A, 2007. Interaction between sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate. *Journal of Endodontics* 33, 966-969.

Baumgartner y Ibay 1987. The chemical reactions of irrigants used for root canal debridement. *J Endod* 13, 47–51.

Berber VB, Gomes BPFA, Sena NT, Vianna ME, Ferraz CCR, Zaia AA, Souza-Filho FJ, 2006. Efficacy of various concentrations of NaOCl and instrumentation techniques in reducing *Enterococcus faecalis* within root canals and dentinal tubules. *Int Endod J* 39. 10-17.

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

Bui T, Baumgartner JC, Mitchell J, 2008. Evaluation of the interaction between sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate and its effect on root dentin. *J Endod* 34 (2): 181-85.

Carson K, Goodell G, Maclanaban S, 2005. Comparison of the antimicrobial activity of six irrigants on primary endodontic pathogens. *J Endod* 33 (6): 471-3.

Chhabra R, Huff J, Haseman JK, Elwell M, 1991. Carcinogenicity of p-chloroaniline in rats and mice. *Food Chem Toxicol* 29, 119–124.

Clegg y cols. 2006. The effect of exposure to irrigant solutions on apical dentin biofilms in vitro. *J Endod* 32:434–7.

Delgado RJ, Gasparoto TH, Sipert CR, Pinheiro CR, Moraes IG, Garcia RB, Bramante CM, Campanelli AP, Bernardineli N., 2010. Antimicrobial effects of Calcium hydroxide and Chlorhexidine on *Enterococcus faecalis*. *J Endod*. 36 (8):1389-1393.

Estrela C, Estrela CRA, Decurcio DA, Hollanda ACB, Silva JA, 2007. Antimicrobial efficacy of ozonated water, gaseous ozone, sodium hypochlorite and chlorhexidine in infected human root canals. *Int Endod J*. 40: 85-93.

Flores SH (2004). Manual de prácticas Endodoncia Clínica. 1ra ed. Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. Chihuahua, México. 30-32.

Fuentes J, Corsini G., 2006. Manual de Endodoncia para IV y V año de odontología. Universidad de La Frontera, Facultad de Medicina. Temuco, Chile. 38-39.

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

Gomes BP, Ferraz CC, Vianna ME, Berber VB, Teixeira FB, Souza-Filho FJ, 2001. In vitro antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J*;34:424–8.

Gomes BPF, Souza SFC, Ferraz CCR, Teixeira FB, Zaia AA, Valdrighi L, Souza-Filho FJ, 2003. Effectiveness of 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis* in bovine root dentin *in vitro*. *Int Endodontic Journal*, 36, 267-275.

Grawehr M, Sener B, Waltimo T, Zehnder M, 2003. Interactions of ethylenediamine tetraacetic acid with sodium hypochlorite in aqueous solutions. *International Endodontic Journal* 36, 411–417.

Haapasalo, Shen, Qian, Gao, 2010. Irrigation in endodontics. *Dental Clinics of North America* 54, 291-312.

Heling y Chandler 1998. Antimicrobial effect of irrigant combinations within dentinal tubules. *Int Endod J* 31, 8–14.

Kim JW, Choi MS, Park SH, Cho KM, 2010. The comparison of different canal irrigation methods to prevent reaction precipitate between sodium hypochlorite and chlorhexidine. *J Kor Acad Cons Dent* 35 (2) 80-87

Krishnamurthy y Sudhakaran 2011. Evaluation and prevention of the precipitate formed on interaction between Sodium Hypochlorite and Chlorhexidine. *J Endod* 36, 1154-1157.

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

Kuruville y Kamath 1998. Antimicrobial activity of 2.5% sodium hypochlorite and 0.2% chlorhexidine gluconate separately and combined, as endodontic irrigants. *Journal of Endodontics* 24, 472–6.

Leonardo MR, Tanomaru Filho M, Silva LA, Nelson Filho P, Bonifacio KC, Ito IY., 1999. In vivo antimicrobial activity of 2% clorhexidine used as a root canal irrigating solution. *Journal of Endodontics* 25, 167-171

Lin S, Zuckerman O, Weiss E, Mazor Y, Fuss Z, 2003. Antibacterial efficacy of a new chlorhexidine slow release device to disinfect dentinal tubules. *J Endod* 29 (6): 416-18.

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 Oral Radiol Endod*. 103:103–105.

Mcdonnell y Russell, 1999. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clin Microbiol Rev* 12:147–179.

Micklus y Stein 1973. The colorimetric determination of mono- and disubstituted guanidines. *Anal Biochem* 54, 545–553.

Mohammadi & Abbott, 2009. The properties and applications of chlorhexidine in endodontics. *Int Endod J*.42(4): 288-302.

Molander A, Reit C, Dahlén G, 1999. The antimicrobial effect of calcium hydroxide in root canals pre-treated with 5% iodine potassium iodide. *Endodontics and Dental Traumatology* 15,205–9

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

Niu 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.

Nowicky y Sem 2011. An in vitro spectroscopic analysis to determine the chemical composition of the precipitate formed by mixing Sodium Hypochlorite and Chlorhexidine. *J Endod* 37, 983-988.

Ohara P, Torabinejad M, Kettering JD.,1993. Antibacterial effects of various endodontic irrigants on selected anaerobic bacteria. *Endod Dent Traumatol* 9, 95–100.

Paquette L, Legner M, Fillery E, Friedman S, 2007. Antibacterial efficacy of chlorhexidine gluconate intracanal medication *in vivo*. *J Endod* 33 (7): 788-95.

Park YW, 2012. Precipitate from a combination of sodium hypochlorite and clorhexidine. *Restorative Dentistry and Endodontics*.37,185-186.

Pellissari CA, 2002. Substancias auxiliares do preparo do canal radicular. In: BERGER C.R. *Endodontia Clinica*. Sao Paulo: Pancast Editora, 2002. p. 311-321)

Peters OA, Schönenberger K., Laib A., 2001. Effects of four Ni-Ti preparation techniques on root canal geometry assessed by micro computed tomography. *International Endodontics Journal* 34, 221–30.

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

Prado M, Santos Junior H, Rezende C, Pinto AC, Faria R, Simao R, Gomes B, 2013. Interactions between irrigants commonly used in endodontic practice: a chemical analysis. *J Endod* 39 (4): 505-510.

Radcliffe CE, Potouridou L, Qureshi R, Hababbeh N, Qualtrough A, Worthington H, Drucker DB, 2004. Antimicrobial activity of varying concentrations of sodium hypochlorite on the endodontic microorganisms *Actinomyces israelii*, *A. naeslundii*, *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J* 37:438–46.

Rasimick B, Nekich M, Hladek MM, Musikant BL, Deutsch A, 2008. Interaction between chlorhexidine gluconate and EDTA. *J Endod* 34, 1521–1523.

Riquelme MJ, 2010. Dilución de hipoclorito de sodio 5% para la no formación de Paracloroanilina al contacto con CHX 2%. Trabajo de investigación, requisito para optar al grado de especialista en Endodoncia. Facultad de Odontología, Universidad Andrés Bello. Santiago.

Rosenthal S, Spångberg L, Safavi K, 2004. Chlorhexidine substantivity in root canal dentine. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 98, 4:488-492.

Rossi-Fedele G, Dogramaci E, Guastalli A, Steier L, Poli de Figueiredo JA, 2012. Antagonistic interactions between sodium hypochlorite chlorhexidine, EDTA and citric acid. *J Endod* 38(4):426-31.

Russell y Day 1993. Antibacterial activity of chlorhexidine. *J Hosp Infect*, 25:229–238.

Schoffstall 2004. Microscale and miniscale organic chemistry laboratory experiments. *2nd ed.* New York: McGraw Hill.

Sim TP, Knowles JC, Ng YL, 2001. Effect of sodium hypochlorite on mechanical properties of dentine and tooth surface strain. *Int Endod J* 34:120 –132.

Siqueira JF, Lopes HP, 1999. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. *Int Endod J.* 32 (5): 361-9.

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

Skoog AD, Leary JL, 1994. Análisis Instrumental, cuarta edición, McGraw-Hill.

Soares JI, Golbert S., 2004. Endodoncia Técnicas y Fundamentos. *Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires.* 18.

Soares J, Roque de Carvalho MA, Santos MC, Castro R, Ribeiro-Sobrinho A, Brito-Júnior M, Magalhaes P, Santos MH, Farias L, 2010. Effectiveness of Chemomechanical Preparation with Alternating Use of Sodium Hypochlorite and EDTA in Eliminating Intracanal *Enterococcus faecalis* Biofilm. *J Endod* 36, 894-898.

Spångberg L, Engström B, Langeland K, 1973. Biologic effects of dental materials. Toxicity and antimicrobial effect of endodontic antiseptics in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*;36:856–71.

Spratt DA, Pratten J, Wilson M, Gulabivala K, 2001. An in vitro evaluation of the antimicrobial efficacy of irrigants on biofilms of root canal isolates. *International Endodontic Journal*, 34; 300-307.

Steinberg D, Heling I, Daniel I, Ginsburg I, 1999. Antibacterial synergistic effect of chlorhexidine and hydrogen peroxide against *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus*. *J Oral Rehabil* 26, 51–56.

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

Vale MS, Garcia RB, 2001. Avaliacao em microscopia óptica e electrónica de varedura da adaptacao de tres cimentos endodonticos a dentina radicular submetida a acao previa do laser de Er: YAG, EDTA e solucao salina fisiológica. *Revista da Faculdade da Odontologia de Bauru*. V. 9, n1/2, 11-17.

Valera MC, Chung A, Menezes MM, Fernandes CEF, Carvalho CAT, Camargo SEA, & Camargo CHR, 2010. Scanning electron microscope evaluation of chlorhexidine gel and liquid associated with sodium hypochlorite cleaning on the root canal walls. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* ;110:82-87

Vianna ME, Gomes B, 2009. Efficacy of sodium hypochlorite combined with chlorhexidine against *Enterococcus faecalis* in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*107: 585-89.

Vianna ME, Gomes B, Berber VB, Zaia AA, Ferraz, de Souza-Filho FJ, 2004. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 97:79–84.

Vianna ME, Hartz H-P, Conrads G, Zaia AA, Souza-Filho FJ, Gomes BPFA, 2007. Effect of root canal procedures on endotoxins and endodontic pathogens. *Oral Microbiol Immunol* 22, 1–8.

Vivacqua-Gomes N, Ferraz C, Gomes B, Zaia A, Teixeira F, Souza-Filho FJ, 2002. Influence of irrigants on the coronal microleakage of laterally condensed gutta-percha root fillings. *Int Endod J* 35, 791–795.

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

Yeung S, Huang CS, Chan C, Lin CP, Lin HN, Lee P, y cols., 2007. Antioxidant and pro-oxidant properties of chlorhexidine and its interaction with calcium hydroxide solutions. *Int Endod J* 40, 837– 844.

Zamany A, Safavi K, Spångberg L, 2003. The effect of chlorhexidine as an endodontic disinfectant. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 96:578–581.

Zehnder, 2006. Root canal irrigants. *Journal of Endodontics* 32, 389-398.

Zehnder M, Schmidlin P, Sener B, Waltimo T, 2005. Chelation in root canal therapy reconsidered. *J Endod* 31, 817–820.

## 7. ANEXOS

### **Anexo 1: PROTOCOLO ENDODONCIA EN DIENTE CON LESIÓN**

#### Primera Sesión:

1) Cavidad de acceso:

Se realizará la cavidad de acceso endodóntico con piedras de diamante de alta velocidad en esmalte dentario refrigerando. En dentina se cortará con fresas de carburo-tungsteno redondas, una vez que se comunique se irriga con NaOCl al 5% con Jeringa irrigación Monoject 3ml+Aguja (27x1 1/4)

Se establece la permeabilidad del canal con limas K finas irrigando con NaOCl al 5%

2) Preparación 1/3 cervical y medio:

Se determinará la longitud aparente del canal en la Radiografía inicial. Luego se ensancha el tercio coronario del canal mediante fresas Gates Glidden en secuencia según calibre del canal irrigando con NaOCl al 5%.

3) Determinación LT:

Se realizará introduciendo la lima hasta que se visualice la punta de ésta por el ápice.

4) PQM 1/3 Apical irrigando con NaOCl al 5 % entre cada paso de lima

5) Retroceso desde LM ( lima maestra) hasta preparación de 1/3 Medio irrigando con NaOCl al 5 % entre cada paso de lima

6) Secado (con conos de papel)

7) IRR con suero 3 jeringas de 3ml c/u

8) Secado

9) IRR con EDTA 17%

10)Secado

11)IRR con suero 3 jeringas de 3ml c/u

12)Secado

13)IRR con CHX 2% 1 jeringa de 3ml

14)Doble sellado

#### Segunda Sesión

1) IRR con CHX 2% 1 jeringa de 3ml repasando con LM

2) Secado

- 3) OCR
- 4) Doble sellado