



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

**DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO RESIDUAL DE PARACLOROANILINA  
*EX VIVO* PRODUCIDO EN TRATAMIENTO ENDODÓNTICO TRAS LA  
UTILIZACIÓN DE HIPOCLORITO DE SODIO 5% Y CLORHEXIDINA 2%**

**Oswaldo Alegre Godoy.**

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN  
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE  
CIRUJANO DENTISTA

**TUTOR PRINCIPAL**

**Prof. Ismael Yévenes López**

**TUTOR ASOCIADO**

**Dra. Silvana Maggiolo Villalobos**

**Dr. PhD José Parada Aliste**

Adscrito a Proyecto FIOUCH 13-015

Santiago – Chile

2014





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

**DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO RESIDUAL DE PARACLOROANILINA  
EX VIVO PRODUCIDO EN TRATAMIENTO ENDODÓNTICO TRAS LA  
UTILIZACIÓN DE HIPOCLORITO DE SODIO 5% Y CLORHEXIDINA 2%**

**Oswaldo Alegre Godoy.**

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN  
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE  
CIRUJANO DENTISTA

**TUTOR PRINCIPAL**

**Prof. Ismael Yévenes López**

**TUTOR ASOCIADO**

**Dra. Silvana Maggiolo Villalobos**

**Dr. PhD José Parada Aliste**

Adscrito a Proyecto FIOUCH 13-015

Santiago – Chile

2014

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi familia...

Claudia y Pedro, por ser los mejores padres que alguien puede tener, por todo el cariño que me entregan, por su apoyo incondicional durante toda mi vida y por todo su esfuerzo para darme siempre la posibilidad de cumplir mis sueños.  
Claudia, Pablo y Emilia por ser los mejores hermanos y sobrina, por siempre estar presentes, por su preocupación y cariño.

A mis amigos...

Ignacio y Alvaro, por toda su ayuda, por confiar en mi y entregarme su amistad cuando más lo necesitaba.  
M<sup>a</sup> Gabriela y Verónica, por su apoyo y siempre estar dispuestas a escuchar y entregarme sus consejos.  
Marcela, por su ayuda y por todos los buenos momentos que compartimos, que espero continúen.

Al Prof. Ismael Yévenes, Dra. Silvana Maggiolo y al Prof. José Parada por su ayuda, paciencia y buena disposición en la realización de esta tesis.

A todos, muchas gracias.

# ÍNDICE

## Contenido

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>MARCO TEÓRICO</b> .....	3
1. <u>Hipoclorito de Sodio (NaClO)</u> .....	3
2. <u>Acido etildiaminotetraacetico (EDTA)</u> .....	6
3. <u>Clorhexidina (CHX)</u> .....	7
4. <u>Interacción entre Irrigantes</u> .....	11
5. <u>Paracloroanilina (PCA)</u> .....	12
<b>HIPÓTESIS</b> .....	16
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	16
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	16
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	17
1. <u>Tipo de estudio</u> .....	17
2. <u>Materiales</u> .....	¡Error! Marcador no definido.
3. <u>Selección de la muestra</u> .....	17
4. <u>Obtención y almacenamiento de muestras</u> .....	18
5. <u>Tratamiento endodóntico y obtención de las muestras de las fases del tratamiento</u> .....	18
6. <u>Procedimientos de Laboratorio</u> .....	19
a. Determinación del espectro de absorción y concentración de NaClO: .....	20
b. Determinación del espectro de absorción y concentración de NaCl:.....	21
c. Determinación del espectro de absorción y concentración de EDTA : .....	22
d. Determinación del espectro de absorción y concentración de CHX: .....	23
e. Determinación del espectro de absorción y concentración de PCA: .....	24
7. <u>Análisis estadístico</u> .....	25

<b>RESULTADOS</b> .....	26
1. <u>Concentración NaClO, EDTA y CHX:</u> .....	26
Fase 1: Cavidad de acceso.....	26
Fase 2: Preparación de 1/3 cervical y medio .....	27
Fase 3: Preparación de 1/3 apical .....	27
Fase 4: Step-Back .....	28
Fase 5, 6 y 7: Irrigación con Suero fisiológico.....	29
Fase 8: Irrigación con EDTA 10%.....	30
Fase 9, 10 y 11: Irrigación con Suero fisiológico.....	31
Fase 12: Irrigación con CHX 2%.....	33
Fase 13: Irrigación con CHX 2% .....	34
2. <u>Concentración PCA</u> .....	35
Fase 12: Irrigación con CHX 2%.....	35
Fase 13: Irrigación con CHX 2%.....	36
<b>DISCUSIÓN</b> .....	39
<b>CONCLUSIONES</b> .....	44
<b>REFERENCIAS</b> .....	45
<b>ANEXOS</b> .....	51
Anexo 1: Protocolo de Irrigación .....	51
Anexo 2: Formulario de consentimiento informado.....	53

## LISTA DE ABREVIACIONES

<b>Abreviación</b>	<b>Significado</b>
<b>CHX</b> .....	Clorhexidina
<b>EDTA</b> .....	Ácido etildiaminotetraacético
<b>IRR</b> .....	Irrigación
<b>NaClO</b> .....	Hipoclorito de sodio
<b>NaCl</b> .....	Cloruro de Sodio
<b>NaCl 0,9%</b> .....	Suero Fisiológico
<b>OCR</b> .....	Obturación del canal radicular
<b>PCA</b> .....	Paracloroanilina
<b>PQM</b> .....	Preparación quimio-mecánica
<b>SCR</b> .....	Sistema de Canales Radiculares

## RESUMEN

**Introducción:** El objetivo del tratamiento endodóntico es eliminar o al menos reducir a niveles aceptables la cantidad de microorganismos, además de remover tejido pulpar inflamado o necrótico del canal radicular. Debido a la complejidad del SCR, la instrumentación mecánica no remueve completamente los tejidos infectados y bacterias. Por lo tanto se hace necesario el uso de soluciones irrigantes asociadas a la instrumentación, como NaClO, EDTA y CHX, los cuales pueden interactuar en el canal generando subproductos como por ejemplo PCA, formada por la interacción entre CHX y NaClO. PCA se trata de un compuesto tóxico, ya sea por inhalación, digestión o contacto con la piel, ojos o mucosas.

En la actualidad no existen estudios que muestren los efectos que tendría PCA en el canal radicular o en los tejidos periapicales, ni se ha determinado la cantidad de precipitado residual, que se produciría luego de realizar el tratamiento endodóntico.

**Objetivo:** Determinar el contenido residual de PCA *ex vivo* producido durante un tratamiento endodóntico tras la utilización de NaClO al 5% y CHX al 2%.

**Metodología:** En 20 dientes extraídos (*ex vivo*) se realizó procedimiento endodóntico recolectando 13 volúmenes correspondientes a las fases del tratamiento. En estas soluciones se determinó por espectrofotometría UV: NaClO, EDTA, CHX y por espectrometría VISIBLE p-cloroanilina. En ambas metodologías se determinó para cada irrigante: curvas espectrales y *lambda* máximo ( $\lambda_{max}$ ).

**Resultados:** NaClO 5% se utilizó en las cuatro primeras fases (F1 a F4) de la preparación químico-mecánica (PQM) del canal radicular. La concentración de NaClO en las fases disminuyó de 3,4% a 3,8%. En fases 5, 6 y 7, se irrigó con NaCl 0,9% determinando NaClO con concentraciones de 0,007%, 0,003% y 0,001%. En fase 8, el irrigante fue EDTA 10%, su concentración en el eluido fue menor con un 8,9%. En las fases 9, 10 y 11, se irriga nuevamente con NaCl 0,9%, determinando en las fases EDTA, con concentraciones de 0,013% a 0,002%.



Además se midió NaClO con concentraciones que van de 0,0011% a 0,0006%. Los volúmenes 12 y 13 corresponden a CHX 2% usada como medicación intracanal. Sus concentraciones encontradas fueron 1,85% y 1,8%. En esto mismos volúmenes se midió la formación de PCA encontrando concentraciones de 0,0007% y 0,0005%.

**Conclusiones:** La metodología UV-VISIBLE permite la medición de NaClO, EDTA, CHX y PCA resultantes de un protocolo endodóntico. La concentración de NaClO al 5% disminuye significativamente durante las cuatro primeras fases por su efecto en la preparación químico-mecánica (PQM) del canal radicular. Se detecta NaClO en las fases 5, 6, 7, 9,10 y 11 con concentraciones menores pero cuantificables. La concentración de EDTA 10% en la fase 8, disminuye por su acción desmineralizadora sobre compuestos inorgánicos del barro dentinario. Se encuentra medible además en las fases 9,10 y 11. La concentración de CHX 2% disminuye después de uso intracanal posiblemente por su sustantividad con la dentina de los canales radiculares. Se forma PCA en los canales por presencia de CHX 2% y NaClO residual detectado en las fases 9, 10 y 11

## INTRODUCCIÓN

El éxito de un tratamiento endodóntico está dado cuando se logra la desinfección y sellado tridimensional del sistema de canales radiculares (SCR) y así prevenir su reinfección. La anatomía del sistema de canales y su diversidad de formas impide que el tejido orgánico e inorgánico residual y los microorganismos que pudieran estar alojados en ellos puedan ser totalmente eliminados a través del solo uso de la instrumentación, por eso se hace necesario el uso de sustancias ayudantes como son los irrigantes (Zehnder 2006).

Los objetivos de la irrigación del SCR en endodoncia son mecánicos, químicos y biológicos. Los mecánicos y químicos son lavar los residuos, lubricar el canal, disolver tejido orgánico e inorgánico y prevenir la formación del barro dentinario durante la instrumentación o disolverlo una vez que se ha formado. Los objetivos biológicos de los irrigantes están relacionados con su función antimicrobiana y son principalmente la eliminación de microorganismos anaeróbicos y facultativos en su estado libre y en biofilm, inactivación de endotoxinas sin causar daños a los tejidos periapicales o reacciones anafilácticas en el individuo (Basrani. y Haapasalo M. 2012).

La medicación intracanal es un coayudante 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. Esto ha tomado relevancia en endodoncia, ya que diversos estudios han demostrado que es imposible lograr que el SCR esté libre de microorganismos sólo con instrumentación e irrigación. Las bacterias residuales se localizan frecuentemente en áreas inaccesibles como istmos, deltas, canales accesorios o laterales y si persisten al momento de la obturación existe un alto riesgo de fracaso del tratamiento, por lo que se hace necesario el uso de otras sustancias antibacterianas como medicación intracanal para reducir los niveles bacterianos al mínimo posible (Law y cols 2004).

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

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

No existe un irrigante que por sí solo cumpla todas las funciones ideales. Una óptima irrigación se basa en el uso combinado de dos o más soluciones, en una secuencia específica, a fin de lograr una irrigación segura y efectiva (Haapasalo 2010). En general, una solución irrigante no es completamente eliminada del SCR antes de aplicar la siguiente; y como resultado, entran en contacto dentro del canal radicular pudiendo formar subproductos, los cuales podrían ocluir los túbulos dentinarios, afectar el sellado de la OCR o incluso ser toxico para los tejidos periapicales.

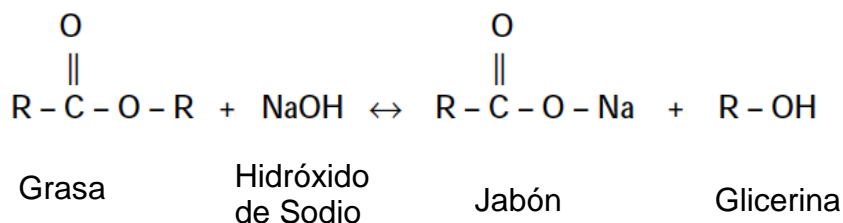
## MARCO TEÓRICO

### 1. Hipoclorito de Sodio (NaClO)

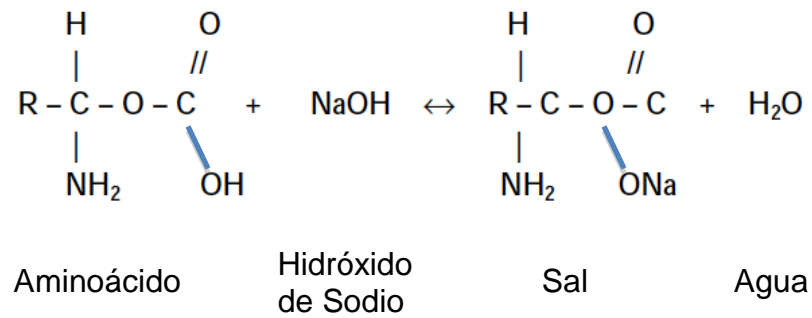
Se trata de la solución irrigante más usada en endodoncia, debido a su gran poder antimicrobiano y de disolución de tejidos (Beltz y cols 2003). En presencia de agua se ioniza en  $\text{Na}^+$  y el ion hipoclorito,  $\text{ClO}^-$ , estableciéndose un equilibrio con el ácido hipocloroso ( $\text{HClO}$ ) el cual es responsable de la actividad antibacteriana (Haapasalo y cols 2010). Es un potente agente antibacterial, usado comúnmente en concentraciones entre 0,5% y 6%, eliminando la mayoría de las bacterias de forma instantánea al contacto directo. También disuelve de manera efectiva tejidos orgánicos, colágeno y proteínas dentinarias, los componentes orgánicos más importantes de la dentina (Naenni y cols 2004).

El  $\text{NaClO}$  actúa como un solvente orgánico, degradando ácidos grasos y grasas transformándolos en sales de ácidos grasos y glicerol, que reducen la tensión superficial de la solución remanente (Saponificación)

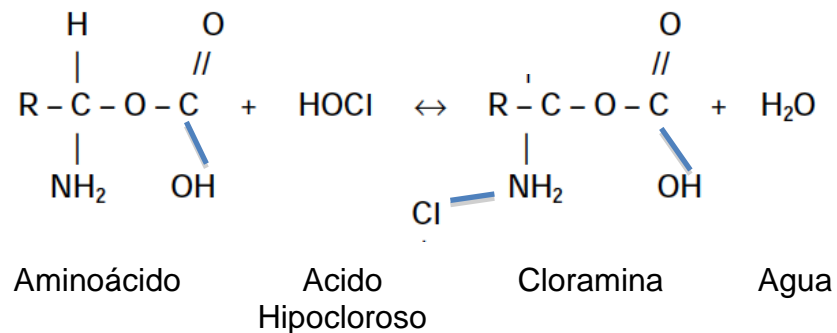
**Figura 2.** Reacción de Saponificación



También neutraliza aminoácidos formando agua y sal. Los aminoácidos, a través de su grupo Carboxilo entregan protones, por lo que al estar en contacto con la base ( $\text{NaOH}$ ) se forma la sal (Neutralización).

**Figura 3.** Reacción de Neutralización

El ácido hipocloroso, cuando está en contacto con tejidos orgánicos, actúa como solvente y libera cloro, el que se combina con grupos aminos ( $\text{NH}_2$ ) de las proteínas formando cloraminas que interfieren con el metabolismo celular (Cloraminación).

**Figura 4.** Reacción de Cloraminación

El cloro tiene acción antimicrobiana inhibiendo enzimas bacterianas, a través de una oxidación irreversible los grupos sulfhidrilos ( $\text{SH}$ ) de enzimas esenciales para las bacterias.

La efectividad antimicrobiana del  $\text{NaClO}$  se basa en la acción de iones  $\text{OCl}^-$ , producto de su Hidrólisis. Su capacidad de disolver tejidos se verifica en la reacción de saponificación, en que se degradan ácidos grasos y lípidos para formar sales y glicerol (Estrela y cols 2002)

Además, su capacidad de disolución de tejidos y actividad antimicrobiana es directamente proporcional a su concentración. Para obtener niveles aceptables de citotoxicidad ante bacterias, se recomienda una concentración de 0,5%, pero ésta necesita de al menos 30 minutos de acción para inhibir el crecimiento de microorganismos facultativos *in vitro*. En cambio, NaClO al 5,25 % elimina microorganismos *in vitro* en pocos segundos (Gomes y cols 2001; Vianna y cols. 2004). Además, se ha descrito un efecto dosis dependiente de NaClO en la capacidad de disgregar físicamente el biofilm bacteriano y eliminar bacterias *in vitro*, en comparación a soluciones con menores concentración de NaClO y CHX (Clegg y cols 2006).

*In vivo* la presencia de materia orgánica (exudado inflamatorio, remanente de tejidos, biomasa bacteriana, tejido pulpar y colágeno dentinario) consumen NaClO y debilitan su efecto. Por esto la continua irrigación y el tiempo son factores importantes para su efectividad (Haapalaso y cols 2000).

Un estudio reciente, sobre biofilm de *E.faecalis* en un modelo dentinario *in vivo*, muestra la superioridad antibacteriana que presenta la solución de NaClO al 6% por sobre otros desinfectantes endodónticos, entre ellos CHX y NaClO al 2% (Wang y cols 2012), se ha visto que la cantidad de células bacterianas muertas, y la profundidad a la que actúa en dentina, aumenta con el incremento en la concentración y tiempo de exposición, siendo la concentración al 6% la más efectiva (Ma y cols 2011).

El NaClO es el único irrigante usado en endodoncia que disuelve tejidos orgánicos vitales y necróticos. Aunque por sí solo no remueve el barro dentinario, si puede eliminar su parte orgánica, haciendo posible la eliminación completa de éste con la posterior irrigación con EDTA o Ácido Cítrico. Sin embargo, el uso de NaClO posterior a esto produce erosión severa en las paredes del canal dentinario, por lo que debe ser evitado (Quian y cols 2011;Niu y cols. 2002).

La capacidad disolvente de tejidos que presenta el NaClO depende de su concentración, temperatura y agitación, incrementos en temperatura y concentración aumentan la eficacia, así como también el recambio de la solución de NaClO, en el sitio de disolución por medio de la agitación, mejoran el efecto (Stojicic y cols 2010). Debido a esta capacidad de degradación de los componentes orgánicos de la dentina, como colágeno y glicosaminoglicanos (Oyarzun y cols 2002) se podrían ver alteradas las propiedades mecánicas de la dentina. Marending y cols (2007) mostraron un efecto concentración dependiente del NaClO en las propiedades mecánicas (módulo de elasticidad y resistencia a la flexión) como resultados de la desintegración de la matriz orgánica dentinaria.

Zou y cols (2010) concluyeron que la temperatura, tiempo y concentración son factores que influyen en el grado de penetración de NaClO en los túbulos dentinarios, todos tienen un impacto en la penetración, pero el efecto fue en general menor a lo anticipado. La mayor penetración se obtuvo cuando los 3 factores se presentaron simultáneamente, lo que sugiere un efecto aditivo.

Las desventajas del NaClO incluyen el sabor desagradable, toxicidad, irritación de los tejidos en casos de inyección a los tejidos periapicales y su inhabilidad para remover el barro dentinario por sí mismo, como si lo hace con la materia orgánica (Haapasalo y cols 2010). Debido a que el NaClO es degradado por la luz, el aire, los metales y los contaminantes orgánicos, la pérdida de estabilidad química es un factor que puede alterar sus propiedades (Frais y cols 2001); por lo tanto, se debe conservar en un recipiente oscuro, ambiente cerrado y alejado del calor.

## **2. Acido etildiaminotetraacetico (EDTA)**

Se trata del compuesto químico ácido etildiaminotetraacetico, un ácido diaminopolicarboxílico,  $[\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H})_2]_2$ , soluble en agua e incoloro, tiene la característica de unirse a iones de metales di o tri catiónicos como son  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{Fe}^{+3}$  (Basrani y Haapasalo 2012).

El barro dentinario se forma siempre cuando un instrumento endodóntico metálico toca la pared del canal radicular. Se trata de una capa delgada y amorfa entre 0,5 – 2  $\mu\text{m}$  de grosor que recubre la superficie de la dentina, ocluye la apertura de los canales dentinarios y contiene dentina mineralizada, remanente de tejido pulpar, bacterias y biofilm (Violich y Chandler 2010). Actualmente no existe un irrigante que por sí solo pueda eliminar el barro dentinario, por eso se requiere el uso secuencial de NaClO y un agente quelante que disuelva tejido inorgánico como EDTA, causando descalcificación de la dentina peri e intertubular. Por lo tanto, la irrigación final con EDTA luego del NaClO entre 1 y 3 minutos es suficiente para remover el barro dentinario (Teixeira y cols 2005).

EDTA se usa normalmente a una concentración de 17%, sin embargo algunos estudios indican que a menor concentración (15%, 10% e incluso 1%) de igual forma se remueve el barro dentinario luego de irrigar con NaClO (Sen BH y cols 2009).

El efecto quelante de EDTA dentro del canal radicular está en función del tiempo de contacto, por lo tanto se sugiere que la exposición no sea mayor a 1 minuto, tiempo que es efectivo en la remoción del barro dentinario (Calt y cols 2002). Crumpton y cols (2005) han demostrado que el volumen de irrigación no influye en la calidad de remoción del barro dentinario, en su estudio 1ml de EDTA al 17% en contacto durante 1 minuto en el canal radicular fue tan efectivo como 10ml.

### **3. Clorhexidina (CHX)**

Es un potente antiséptico, que es ampliamente usado para el control químico de la placa bacteriana en la cavidad oral. Soluciones acuosas de CHX entre 0,1% y 0,2% son recomendadas para este propósito, mientras que al 2% es la concentración utilizada como solución irrigante y medicación en endodoncia (Zehnder 2006).



La CHX es una base fuerte y es más estable cuando se presenta como sal. La forma más común de presentación es el digluconato de clorhexidina, que es soluble en agua y a pH fisiológico se disocia rápidamente y libera la CHX cargada positivamente. Dependiendo de su concentración, puede tener efecto bacteriostático o bactericida. A bajas concentraciones (0,2%), sustancias de bajo peso molecular, especialmente potasio y fosforo salen de la célula ejerciendo su efecto bacteriostático. Por otro lado a mayores concentraciones (2%) la CHX es bactericida, su efecto bactericida se debe a la unión de la molécula cargada positivamente con la carga negativa de la pared celular bacteriana, provocando una alteración en el equilibrio osmótico de la célula. Esto aumenta la permeabilidad de la pared celular, lo que permite la entrada de la CHX a la bacteria, provocando la precipitación de contenidos del citoplasma(Gomes y cols 2013).

Debido a la naturaleza catiónica que posee la molécula de CHX, puede unirse a sustratos aniónicos como la mucosa oral, proteínas como albumina, película salival del diente, dentina y otras glicoproteínas salivales. (Basrani y Haapasalo 2012). A esta propiedad reversible, se le denomina sustantividad y le permite poder seguir ejerciendo su efecto antibacteriano y prevenir la colonización por un tiempo más allá del de aplicación de la solución (Khademi y cols. 2006).El efecto depende de la concentración, a bajas concentraciones 0,005- 0,01% una monocapa estable se establece en la superficie del diente y puede prevenir o reducir la colonización bacteriana. A concentraciones más altas > 0,02% una multicapa de CHX se forma, creando un reservorio de CHX, la cual puede ser liberada si la concentración en el ambiente disminuye (Basrani y Haapasalo 2012). Rosenthal (2004) señaló que la CHX se mantendría en la dentina del SCR en una concentración del 0,001% aproximadamente por 12 semanas, al igual que Mohammadi y Abbott (2009); quienes mostraron que la CHX tendría una sustantividad antibacteriana por al menos 12 semanas en dentina.

La CHX posee un amplio espectro de acción sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas, aunque su mayor efectividad es contra microorganismos Gram

positivos. Además, no posee la capacidad de disolver tejidos orgánicos, por lo tanto no reemplaza al NaClO como irrigante de elección, pero es útil como agente coadyudante durante el tratamiento endodóntico, tal como sugiere el protocolo propuesto por Zehnder (2006) que consiste en: irrigar con NaClO durante la instrumentación, para disolver el componente orgánico, luego irrigar con EDTA para eliminar el barro dentinario, y por último una irrigación con CHX. Se plantea el uso de CHX como irrigación final, debido a su sustantividad y amplio espectro antibacteriano, para uso previo a la obturación del canal y en casos de retratamiento, donde se espera encontrar en el SCR altas proporciones de bacterias Gram positivas (Zehnder 2006).

Según un estudio sobre efectividad antibacteriana en biofilms de *E.faecalis* en un modelo de dentina *in vivo* la CHX al 2% tendría una efectividad antibacteriana equivalente al NaClO a bajas concentraciones, 1% o 2% (Ma y cols 2011; Wang y cols 2012). En un estudio *in vitro* CHX al 2% solo fue capaz de eliminar bacterias y no remover físicamente el biofilm bacteriano tal como lo hace el NaClO al 6%, lo que sugiere que en caso de usar CHX como irrigante, previamente se deben utilizar otros agentes para desorganizar el biofilm (Clegg y cols 2006).

Por otra parte, se ha sugerido la medicación con CHX tanto líquida como gel como alternativa al Hidróxido de Calcio ( $\text{Ca(OH)}_2$ ), debido a su efectividad ante *E. faecalis* (Delgado y cols 2010; Basrani y cols 2002; Gomes y cols 2003). por lo tanto ha sido foco de diversos estudios en las últimas dos décadas. Sin embargo, comparando el número de estudios *in vitro*, muy pocos estudios *in vivo* se han llevado a cabo para evaluar la efectividad de la CHX como medicación intracanal (Basrani 2004).

Basrani y cols (2002) en un estudio *in vitro* evaluaron la actividad antimicrobiana de diferentes medicamentos, concluyendo que la medicación intracanal durante 1 semana con CHX al 2% puede proveer actividad antimicrobiana residual contra *E.faecalis*. Barbosa y cols (1997) midieron *in vivo* la

eficacia de tres medicaciones intracanal: Paramonoclorofenol,  $\text{Ca(OH)}_2$  y CHX líquida al 0,12% aplicándolos por una semana en dientes uniradiculares de pacientes humanos y se reportó que la proporción de cultivos positivos no fue significativamente diferente entre los tres medicamentos evaluados, sin embargo los cultivos de dientes medicados con CHX fueron levemente menores. Por otra parte, Paquette y cols (2007) en un estudio *in vivo* evaluaron la efectividad antibacteriana de la CHX 2% líquida como medicación intracanal en dientes con Periodontitis Apical. Los resultados mostraron un moderado aumento en el conteo bacteriano durante un periodo de medicación de 7-14 días.

Estudios *in vitro* y en animales sugieren que la CHX tiene el potencial para reemplazar al  $\text{Ca(OH)}_2$  como medicación intracanal, sin embargo debido a las limitaciones de estos estudios, las conclusiones obtenidas de éstos no pueden ser extrapoladas a las situaciones clínicas, por lo que más estudios *in vivo* son necesarios para medir la eficacia de CHX como medicación intracanal (Basrani 2004).

El uso de CHX como medicación intracanal se recomienda por periodos cortos (3-5 días), en casos en que los canales hayan sido completamente instrumentados, pero no obturados por falta de tiempo clínico, específicamente en biopulpectomias (Gomes y cols 2013); o cuando la preparación quimio-mecánica no se ha llevado a cabo por completo. Se utiliza la CHX como medicación con el objetivo de evitar la proliferación bacteriana, debido a que los microorganismos sobrevivientes en el SCR, luego de la preparación quimio-mecánica, han mostrado la capacidad de multiplicarse rápidamente cuando los canales se dejan vacíos (Paquette y cols 2007). Además, la CHX puede retardar la contaminación del canal radicular por la entrada de bacterias a través de la interfase diente/restauración. (Gomes 2003; Mohammadi y Abbott 2009). También se recomienda la medicación en casos de exudado (Gomes y cols 2013), ya que la CHX mantiene por mayor tiempo su actividad antimicrobiana en presencia de sangre y otras materias orgánicas en comparación con otros medicamentos (Haapasalo y cols 2000).

#### 4. Interacción entre Irrigantes.

Debido a que no existe en la actualidad alguna solución que cumpla con todas las características ideales de una solución irrigante en endodoncia, es necesario el uso de diferentes soluciones en asociación con la instrumentación.

En general, una solución irrigante no es completamente eliminada o lavada del canal radicular antes de que se aplique la siguiente solución. Como resultado es común que irrigantes endodónticos entren en contacto dentro del canal radicular formando sub-productos (Basrani y cols. 2007; Rasimick y cols. 2008). Estos subproductos podrían ocluir los túbulos dentinarios creando una barrera entre el material de obturación y la superficie dentinaria y también ser tóxicos para los tejidos periapicales, por eso es importante identificarlos y caracterizarlos para evitar complicaciones durante el tratamiento endodóntico.

La combinación de CHX y EDTA genera una reacción ácido-base (Zehnder 2006) produciendo un precipitado blanco. Se describe que más del 90% de la masa de este precipitado era EDTA o CHX, el remanente estaría compuesto probablemente de agua, gluconato de clorhexidina y sodio. Paracloroanilina, compuesto potencialmente carcinogénico derivado de la CHX, no fue detectado en este precipitado. Finalmente, no existen mediciones acerca de cuál es la cantidad de precipitado que se forma, si se adhiere a las paredes del canal radicular y si interfiere con el sellado (Rasimick y cols. 2008).

La interacción de NaClO con agentes quelantes como EDTA o Ácido Cítrico provoca la pérdida de la capacidad del NaClO de disolver tejidos orgánicos, reduciéndose significativamente la cantidad de Cl<sup>-</sup> libre, disminuyendo su efectividad contra bacterias y tejido necrótico. Esto sugiere que clínicamente ambas soluciones deben usarse de manera separada y que grandes cantidades de NaClO se podrían usar para lavar remanentes de EDTA en el SCR y así garantizar la efectividad de NaClO (Grawehr y cols 2003; Zehnder 2006). Sin

embargo, el uso de NaClO posterior a EDTA produciría erosión en las paredes del canal dentinario, por lo que debe ser evitado (Quian y cols 2011; Niu y cols. 2002). Además, la degradación y consecuente desactivación de EDTA luego de interactuar con NaClO se trata de una reacción de oxidación extremadamente lenta, y por lo tanto no se compromete la acción quelante de EDTA dentro del periodo de uso clínico (Grawehr y cols 2003; Grande y cols 2006).

### 5. Paracloroanilina (PCA)

La solución de CHX al 2% no tiene la capacidad de disolver tejidos orgánicos, por lo que se han realizado esfuerzos para combinarla con NaClO, para obtener beneficios de ambas soluciones. Sin embargo, estas no son solubles entre sí, observándose cuando son mezclados, un precipitado color café-anaranjado. Las características de éste no han sido totalmente examinadas, pero su formación no permite el uso clínico de la mezcla de estas dos soluciones (Basrani y cols 2007; Marchesan y cols 2007; Prado y cols 2013).

La formación del precipitado se puede explicar por una reacción ácido-base entre NaClO y CHX. La CHX es un ácido di catiónico que tiene la habilidad de donar protones. El NaClO es alcalino y puede recibir protones de la CHX. Este intercambio de protones produce la formación de una sustancia neutra e insoluble que precipita (Mohammadi y Abbott 2009). En el precipitado formado por la interacción entre CHX y NaClO, diversos autores han demostrado la presencia de la llamada Paracloroanilina, 1-amina-4-clorobenceno, p-cloroanilina o PCA (Basrani y cols 2007; Bui y cols. 2008).

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

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

Este precipitado viscoso y de aspecto café oscuro que contiene PCA podría causar decoloración del diente, se adhiere a las paredes del canal y no puede ser removido completamente, dejando una capa remanente que podría ocluir los túbulos dentinarios y con esto comprometer la correcta medicación intracanal y el sellado de la obturación del canal radicular. Especialmente en casos de usar cementos selladores en base a resina, además de su posible difusión a los tejidos periapicales (Vivacqua-Gomes y cols 2002; Bui y cols. 2008).

La presencia de NaClO en el canal radicular antes de irrigar con CHX no deja una cantidad estadísticamente significativa de precipitado en las paredes. Sin embargo, la reacción al combinar ambos irrigantes forma una capa en la superficie del canal que ocluye significativamente los túbulos dentinarios en el tercio medio y cervical del canal (Bui y cols 2008). Por lo tanto, durante el tratamiento endodóntico se debe evitar o minimizar la formación de PCA.

Se recomienda lavar el remanente de NaClO con alcohol o EDTA antes de usar CHX. Sin embargo, el uso de EDTA también podría tener inconvenientes debido a que también se produce un precipitado en presencia de CHX (Basrani y cols 2007). También se recomienda para reducir la formación de precipitado el uso de irrigación intermedia de solución salina o agua destilada en grandes volúmenes para provocar un efecto de dilución en el NaClO o eliminar la formación a través del lavado del canal con alcohol antes de usar CHX como

irrigación final. Sin embargo, la biocompatibilidad del alcohol con los tejidos peripicales aún no está totalmente aclarada (Krishnamurthy y Sudhakaran 2010). Además, se ha intentado el uso de concentraciones más bajas de NaClO, que si bien produciría proporcionalmente menos precipitado, también reduce la efectividad terapéutica de este compuesto (Bui y cols 2008).

Otros autores han utilizado ácido cítrico como irrigante alternativo entre NaClO y CHX para prevenir la formación de PCA en el canal radicular, demostrando que si bien con esta solución se forma la menor cantidad de precipitado en comparación con suero fisiológico y EDTA al 14%, la PCA sigue estando presente en el canal radicular, por lo que se recomienda evitar la combinación de NaClO y CHX durante la terapia endodóntica (Mortenson y cols. 2012).

La PCA es fabricada exclusivamente por el hombre, no se encuentra en la naturaleza sino como resultado de la acción del ser humano, ya sea de manera directa o indirecta. Se utiliza como intermediario principalmente en la manufactura de colorantes y pigmentos, así como también en la producción de algunos compuestos químicos utilizados en la industria farmacéutica y agricultura como son los pesticidas.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) y la International Agency for Research on Cancer (IACR) y categoriza la paracloroanilina en el Grupo 2B, que significa que este agente es potencialmente carcinogénico para los humanos, esto basado en la escasa evidencia en humanos y en la suficiente que existe en animales experimentales sobre su efecto carcinogénico (Boehncke y cols. 2003).

Estudios toxicológicos en animales han demostrado que la exposición repetida a PCA produce cianosis y metahemoglobinemia, seguidas de efectos en el hígado, bazo y riñón, que se manifiestan como cambios en los parámetros hematológicos, esplenomegalia y hemosiderosis de moderada a grave en el bazo, el hígado y el riñón, parcialmente acompañada de hematopoyesis

extramedular. Estos efectos se producen tras una hemólisis excesiva inducida por el compuesto y son coherentes con una anemia hemolítica (Boehncke y cols. 2003).

Se trata de un compuesto tóxico, ya sea por inhalación, digestión o contacto con la piel, ojos o mucosas. La cuantificación de la exposición del humano a PCA por una serie de vías posibles, suponiendo la penetración a través de la ropa de solo un 1%, da como resultado una exposición total de 0,1 - 0,3µg/kg de peso/día. Considerando solo los efectos no neoplásicos, como por ejemplo metahemoglobinemia, el nivel máximo tolerable de exposición humana a PCA está en el orden de 2µg/kg de peso/día. La exposición accidental aguda a concentraciones altas de PCA puede ser mortal (Boehncke y cols. 2003).

En la actualidad no existen estudios que muestren los efectos que tendría el precipitado (PCA) en la superficie del canal radicular o en tejidos periapicales del diente y la cantidad de precipitado residual, que se produciría luego de realizar el tratamiento endodóntico, no ha sido determinada.



## **HIPÓTESIS.**

La concentración de Paracloroanilina (PCA) residual producto del uso de Hipoclorito de Sodio (NaClO) al 5% y Clorhexidina (CHX) al 2% en un tratamiento endodóntico bajo el protocolo de irrigación propuesto es del orden de los  $10^{-3}$  a  $10^{-2}$  g/100ml, menor al nivel máximo tolerable de exposición humana.

## **OBJETIVO GENERAL.**

Determinar el contenido residual de PCA *ex vivo* producido durante un tratamiento endodóntico tras la utilización de NaClO al 5% y CHX al 2%.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

Determinar el espectro de absorción y la concentración de NaClO en cada etapa del tratamiento endodóntico.

Determinar el espectro de absorción y la concentración de NaCl al 0,9% en cada etapa del tratamiento endodóntico.

Determinar el espectro de absorción y la concentración de EDTA en cada etapa del tratamiento endodóntico.

Determinar el espectro de absorción y la concentración de la CHX en cada etapa del tratamiento endodóntico.

Determinar el  $\lambda$  *máx* para la medición de PCA, NaClO, NaCl, EDTA y CHX en rango visible y UV.

Determinar la concentración de PCA formada al interaccionar NaClO con CHX al 2%, durante el tratamiento endodóntico

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Tipo de estudio

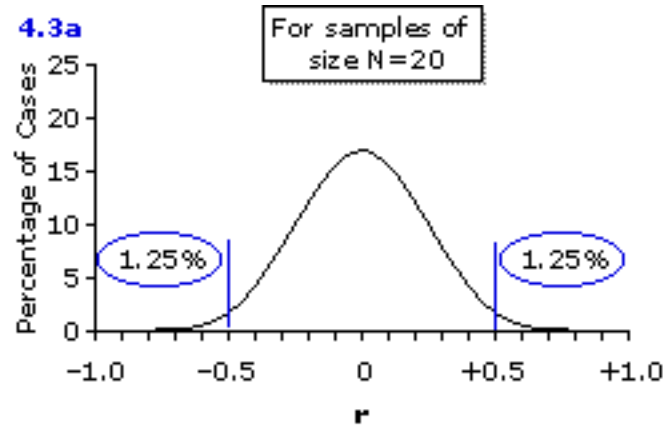
El presente trabajo corresponde a un estudio prospectivo, experimental y explicativo *ex vivo*. El tamaño muestral (n) es de 20.

### 2. Reactivos

- Hipoclorito de Sodio 5% Salcobrand, Chile
- Clorhexidina 2% Oralgene® Maver, Chile
- Cloruro de Sodio 0,9%, Apiroflex, Chile
- Agua destilada
- PCA estándar en polvo ALDRICH, Alemania
- Nitrito de Sodio estándar en polvo MERCK, Alemania.
- Sulfamato de Amonio estándar en polvo ALDRICH, Alemania.
- Naftil etilindiamina dihidrocloruro estándar en polvo ALDRICH, Alemania.
- Ácido Clorhídrico J.T.Baker, México.

### 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  $n=20$ , la forma de la distribución de los coeficientes de correlación de la muestra es parecida a la de una distribución normal, donde solo el 2,5% de los valores de la muestra se desviará desde cero hasta en un  $\pm 0.50$



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

Se montó un modelo *ex vivo* de 20 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.

Estos dientes fueron limpiados, debridados 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.**

A cada uno de los 20 dientes de la muestra se les realizó tratamiento endodóntico de acuerdo al protocolo clínico de irrigación (Anexo 1).

Mediante la aspiración con jeringa de irrigación Monoject (3mL) se recolectaron las diferentes soluciones producidas durante las 13 fases del tratamiento. Luego de permeabilizar el canal inmediatamente después de comunicar, durante la preparación del tercio cervical y medio (Gates Glidden), preparación del tercio apical y Step Back, se irrigó con NaClO al 5%. Luego se secó el canal con conos de papel estériles y se recolectaron los líquidos

producidos al lavar con las 3 jeringas (3mL c/u) de irrigación con suero fisiológico (NaCl 0,9%). Se lavó con EDTA 10% y se recolectó lo obtenido. Luego se repitió la irrigación y recolección con 3 jeringas (3mL c/u) de suero fisiológico. En este momento se irrigó con 3mL de CHX 2%, se recolectó y se obturó el diente con doble sellado, Fermín y vidrio ionomero de autocurado. Se selló el ápice con cera y se depositó el diente en vial con suero fisiológico en estufa a 37°C por una semana (tiempo habitual de medicación intracanal).

Se volvió a ingresar al canal, retirando el sellado temporal de la cavidad de acceso con fresas de alta velocidad, bajo refrigeración con agua. Se lavó con 3mL de CHX 2% y se realizó la última recolección.

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

## **6. Procedimientos 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.

A los 13 volúmenes recolectados se les obtuvo su espectro de absorción (absorbancia vs longitud de onda) en el rango UV- visible (200-800 nm), en un espectrofotómetro UNICAM®UV/VIS, utilizando una cubeta (1cc) de cuarzo contra agua destilada como blanco.

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 permiten determinar el  $\lambda_{max}$ . Por lo tanto se prepararon una serie de diluciones seriadas a partir de la inicial al 5%, obteniendo soluciones de concentración conocida y en estas diluciones se determinó la longitud de onda a la cual NaClO tiene máxima absorbancia, el  $\lambda_{max}$ , y se construyó la curva de calibración, entre 0,0005% y 0,05%, que se utilizó para establecer la concentración de NaClO en las muestras recolectadas.

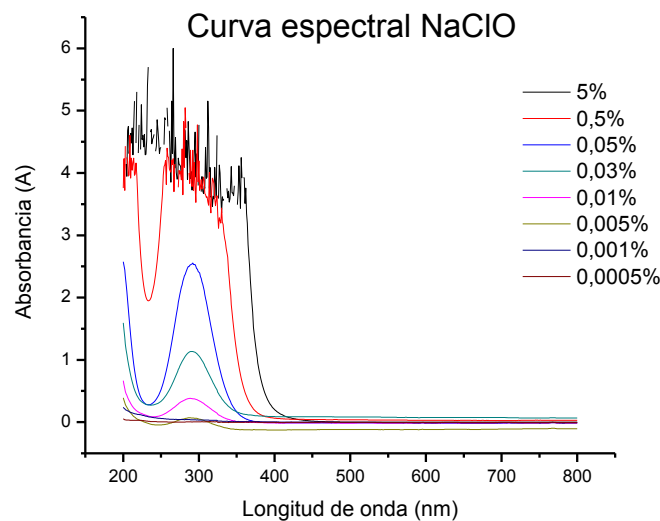


Gráfico 1: Espectros de Absorción de NaClO al 5% y diluciones a distintas concentraciones.  $\lambda_{max}$ : 290 nm

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 290 nm, fueron mayores a los comprendidos en la curva de calibración, estas 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 ( $A = 51,67 \times [\text{NaClO}] - 0,0789$  ;  $R^2 = 0,99493$ ), 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 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.

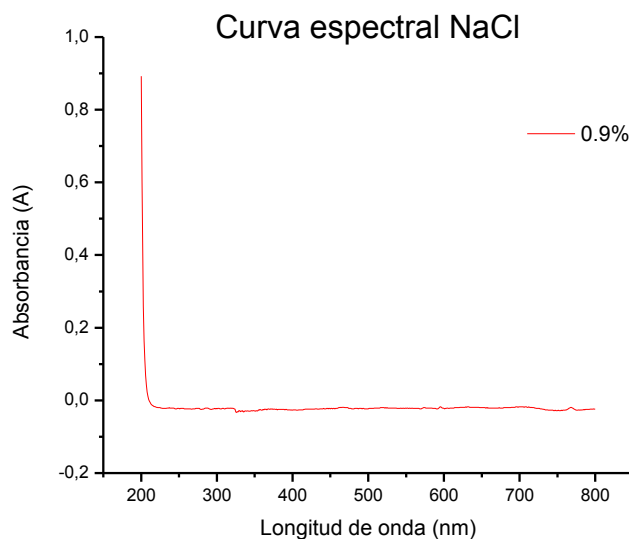


Gráfico 2: Espectro de Absorción de NaCl 0,9%

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%.

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

Se tomó 1 ml de solución de EDTA al 10%, se leyó 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% que se utilizó para establecer la concentración de EDTA en las muestras recolectadas.

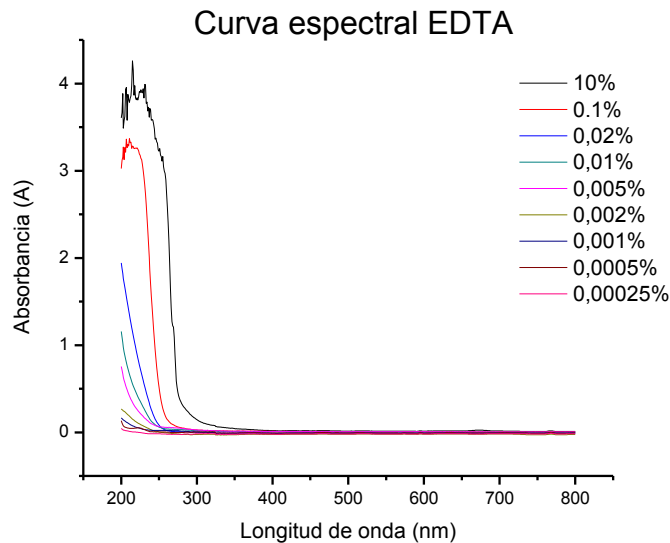


Gráfico 3: Espectros de Absorción del EDTA al 10% y diluciones de distintas concentraciones.  $\lambda_{max}$ : 207 nm.

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, estas 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 ( $A = 79,525 \times [\text{EDTA}]$ ;  $R^2 = 0,99118$ ) 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.

d. 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. Con estas soluciones se determinó el  $\lambda_{max}$  y se construyó la curva de calibración, entre 0,0005% y 0,005%, que se utilizó para establecer la concentración de CHX en las muestras recolectadas.

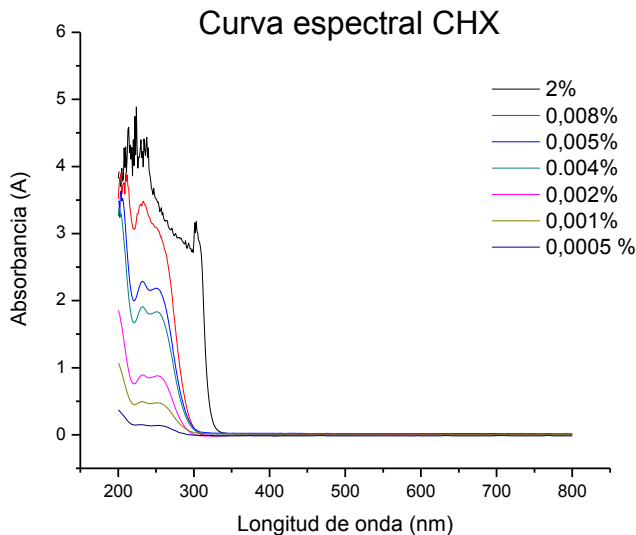


Gráfico 4: Espectros de Absorción de CHX al 2% y diluciones a distintas concentraciones.  $\lambda_{max}$ : 255 nm



Debido a que los valores de absorbancia obtenidos de las muestras 12 y 13, medidas a 255 nm ( $\lambda_{\max}$ ) fueron mayores a los comprendidos en la curva de calibración, estas 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 ( $A = 0,0023 \times [\text{CHX}] - 6\text{E}-05$  ;  $R^2 = 0,99584$ ) y se multiplicó el resultado por el factor de dilución para conseguir la concentración final de CHX.

e. 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 $\mu\text{L}$  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 $\mu\text{L}$  de Nitrito de Sodio (solución 100g/L)
- 200 $\mu\text{L}$  de Sulfamato de Amonio (solución 50g/L)
- 500 $\mu\text{L}$  Naftil etilindiamina dihidrocloruro (solución 1g/L)
- 100 $\mu\text{L}$  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  $A = 687,47 \times [PCA] - 0,0046$ ;  $R^2 = 0,9997$

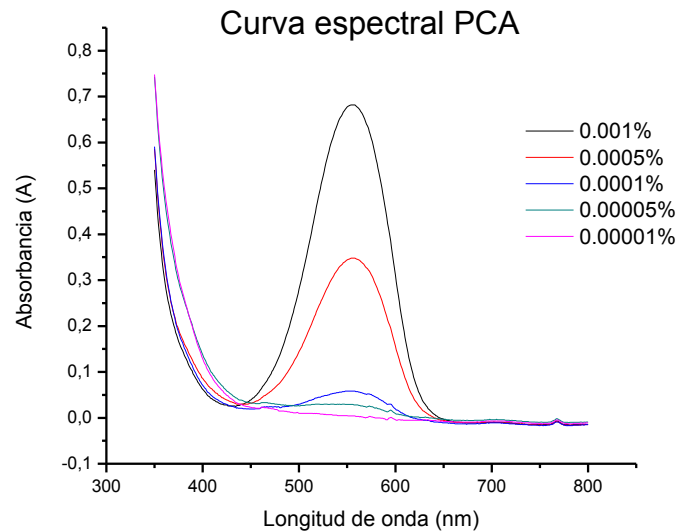


Gráfico 6: Espectros de Absorción de soluciones de PCA a distintas concentraciones, luego de ser sometidos al protocolo de identificación de PCA y determinación del  $\lambda_{m\acute{a}x}$ . 552 nm.

## 7. Análisis estadístico

Debido a que no existe un grupo con el cual realizar una comparación estadística, se procedió a calcular la concentración promedio NaClO, EDT, CHX y PCA, en todas las fases del tratamiento endodóntico, además de determinar su concentración mínima, máxima y desviación estándar.

## RESULTADOS

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

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

#### Fase 1: Cavidad de acceso

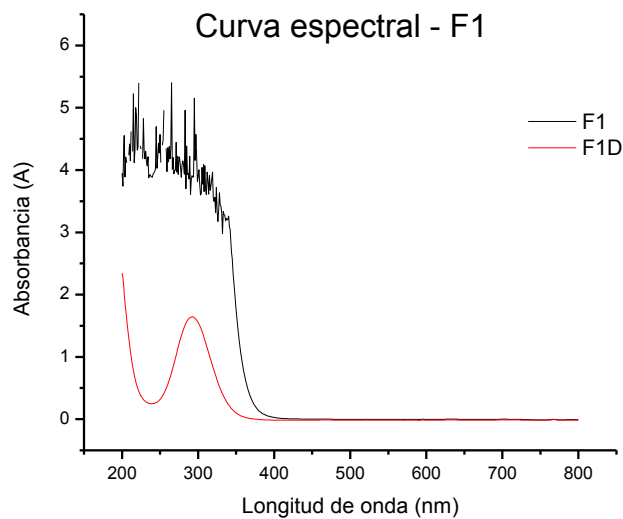


Gráfico 7: Espectros de absorción obtenidos en cavidad de acceso (Fase 1) de NaClO concentrado (-F1) y diluido (-F1D). Concentración Promedio encontrado de NaClO: 3,4%

## Fase 2: Preparación de 1/3 cervical y medio

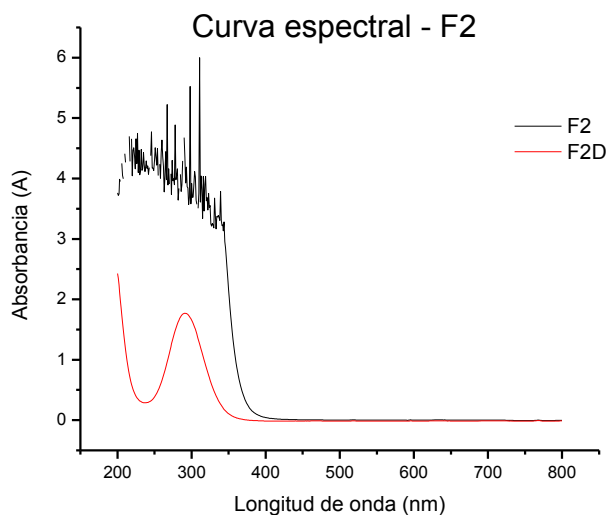


Gráfico 8: Espectros de absorción obtenidos en Preparación de 1/3 cervical y medio (Fase 2) de NaClO concentrado (-F2) y diluido (-F2D). Concentración Promedio encontrado de NaClO: 3,6%

## Fase 3: Preparación de 1/3 apical

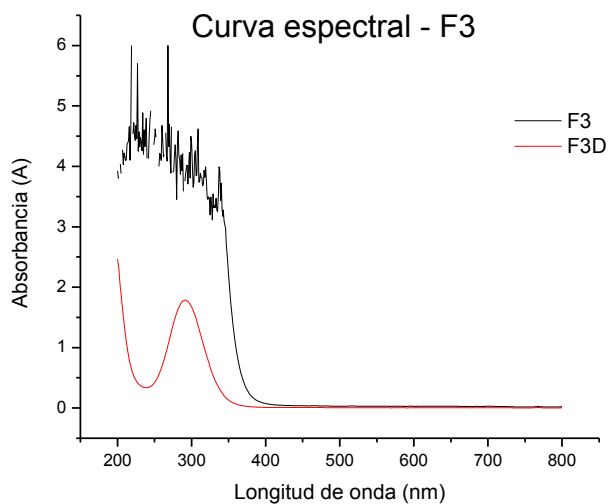


Gráfico 9: Espectros de absorción obtenidos en Preparación de 1/3 apical(Fase 3) de NaClO concentrado (-F3) y diluido (-F3D). Concentración Promedio encontrado de NaClO: 3,7%

### **Fase 4: Step-Back**

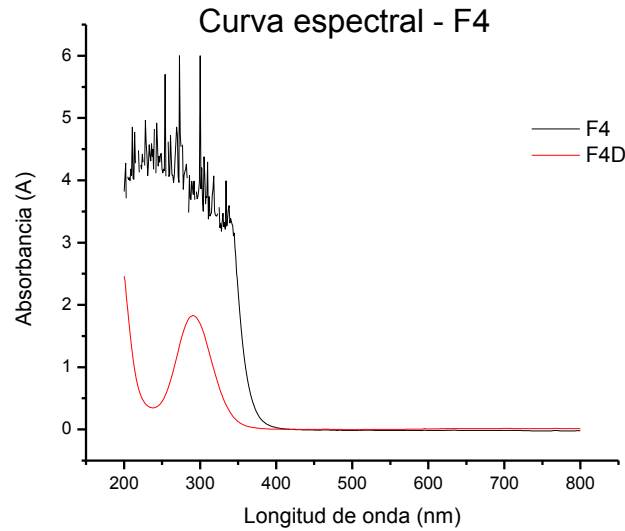


Gráfico 10: Espectro de absorción obtenidos en Step-Back(Fase 4) de NaClO concentrado (-F4) y diluido (-F4D). Concentración Promedio encontrado de NaClO: 3,8%

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

<b>Fase</b>	<b>Concentración Mínima</b>	<b>Concentración Máxima</b>	<b>Concentración Promedio</b>	<b>DS</b>
<b>F1</b>	2,4%	4,4%	<b>3,4%</b>	±0,631
<b>F2</b>	2,6%	4,6%	<b>3,6%</b>	±0,583
<b>F3</b>	2,5%	4,7%	<b>3,7%</b>	±0,641
<b>F4</b>	2,8%	4,9%	<b>3,8%</b>	±0,594

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

Las curvas espectrales del hipoclorito de sodio diluido obtenidas en las cuatro primeras etapas del procedimiento endodóntico se observan en el gráfico 11.

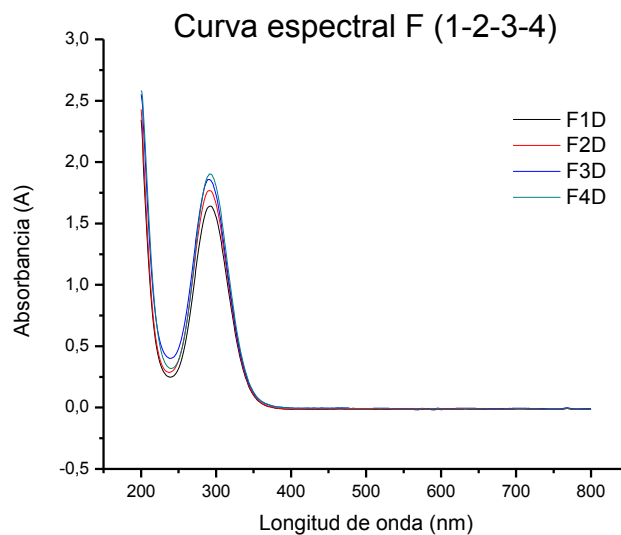


Gráfico 11: Espectros de absorción de NaClO diluido durante las primeras 4 fases de preparación del canal.

### **Fase 5,6 y 7: Irrigación con Suero fisiológico (NaCl 0,9%).**

En estas fases se asume que la concentración de NaCl 0,9% permanece constante y en las muestras de estas fases del tratamiento se determinó la concentración de hipoclorito de sodio residual.

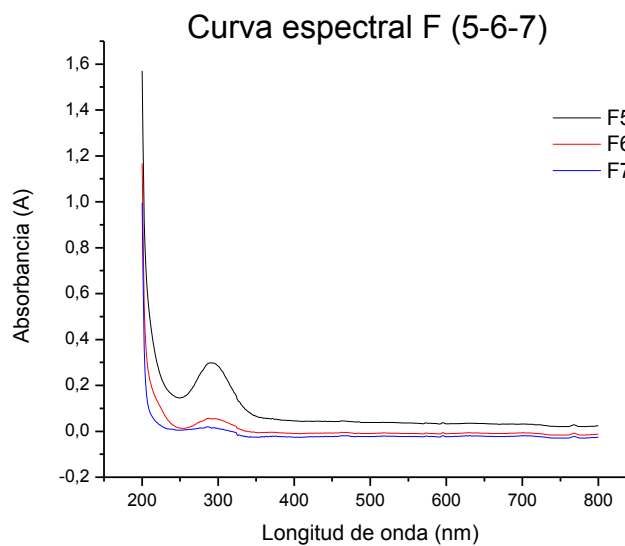


Gráfico 12: Espectros de absorción de NaClO en las fases 5,6 y 7 durante la irrigación con suero fisiológico.

**Tabla 2. Concentración de NaClO en las fases 5, 6 y 7, durante la irrigación con NaCl 0,9%.**

Fase	Concentración Mínima	Concentración Máxima	Concentración Promedio	DS
<b>F5</b>	0,002%	0,028%	<b>0,007%</b>	±0,006
<b>F6</b>	0,0018%	0,005%	<b>0,003%</b>	±0,0008
<b>F7</b>	0%	0,003%	<b>0,001%</b>	±0,001

F5: Primera irrigación con NaCl 0,9%. F6: Segunda irrigación con NaCl 0,9%. F7: Tercera irrigación con NaCl 0,9%. DS: Desviación estándar.

La concentración promedio de NaClO disminuye durante la irrigación sucesiva con suero fisiológico al 0,9%

### **Fase 8: Irrigación con EDTA 10%**

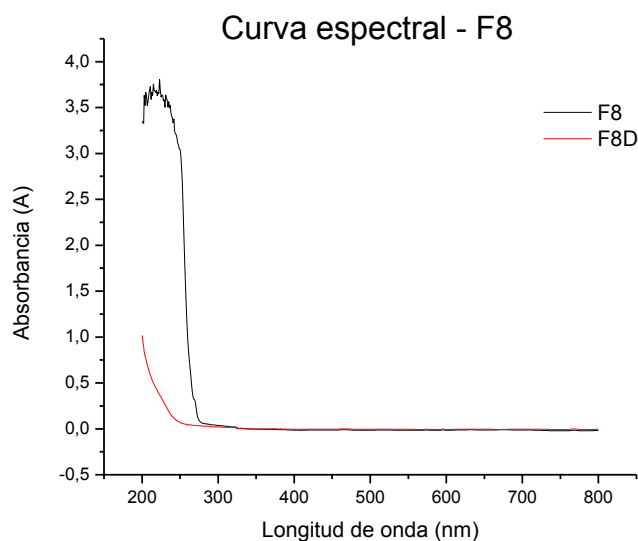


Gráfico 13: Espectros de absorción obtenidos en Irrigación con EDTA 10% (Fase 8) de EDTA concentrado (-F8) y diluido (-F8D).

**Tabla 3. Concentración de EDTA**

Fase	Concentración Mínima	Concentración Máxima	Concentración Promedio	DS
<b>F8</b>	6,8%	10,1%	<b>8,9%</b>	±1,03

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

Concentración promedio de EDTA en esta fase del tratamiento endodóntico disminuye a partir de su concentración inicial

### **Fase 9, 10 y 11: Irrigación con Suero fisiológico (NaCl 0,9%).**

En estas etapas se utiliza el suero fisiológico para eliminar el EDTA remanente en el interior del canal radicular. El gráfico 14 muestra las curvas espectrales del EDTA.

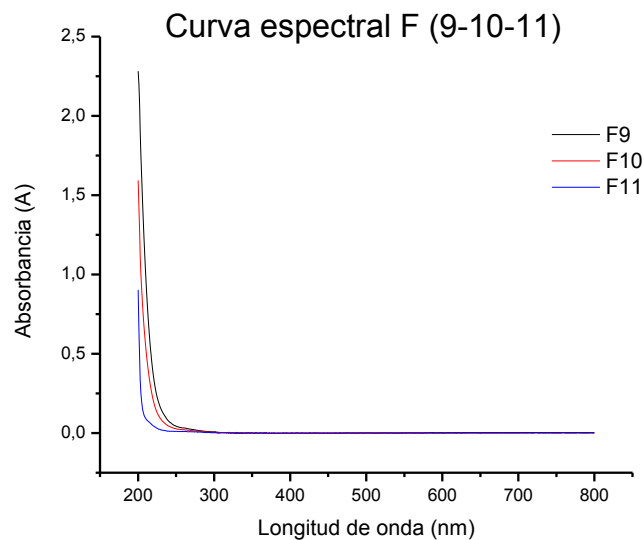


Gráfico 14: Espectros de absorción del EDTA durante irrigación con suero fisiológico al 0,9% en las fases de tratamiento 9,10 y 11.



**Tabla 4. Concentración de EDTA en las fases de tratamiento 9,10 y 11.**

<b>Fase</b>	<b>Concentración Mínima</b>	<b>Concentración Máxima</b>	<b>Concentración Promedio</b>	<b>DS</b>
<b>F9</b>	0,004%	0,034%	<b>0,013%</b>	±0,01
<b>F10</b>	0,002%	0,02%	<b>0,006%</b>	±0,0057
<b>F11</b>	0,0004%	0,003%	<b>0,002%</b>	±0,0006

F9: Primera irrigación con NaCl 0,9%. F10: Segunda irrigación con NaCl 0,9%. F11: Tercera irrigación con NaCl 0,9%. DS: Desviación estándar.

La concentración promedio de EDTA disminuye durante la irrigación sucesiva con suero fisiológico al 0,9%

En las fases de tratamiento 9,10 y 11 también se midió la concentración de hipoclorito de sodio residual que pudiera quedar en el interior del canal radicular, sus resultados se pueden ver en la tabla 5.

**Tabla 5. Concentración de NaClO residual en las fases de tratamiento 9,10 y 11.**

<b>Fase</b>	<b>Concentración Mínima</b>	<b>Concentración Máxima</b>	<b>Concentración Promedio</b>	<b>DS</b>
<b>F9</b>	0%	0,0024%	<b>0,0011%</b>	±0,001
<b>F10</b>	0%	0,0023%	<b>0,0009%</b>	±0,001
<b>F11</b>	0%	0,0022%	<b>0,0006%</b>	±0,0009

F9: Primera irrigación con NaCl 0,9%. F10: Segunda irrigación con NaCl 0,9%. F11: Tercera irrigación con NaCl 0,9%. DS: Desviación estándar.

La concentración promedio de NaClO disminuye durante la irrigación con suero fisiológico al 0,9%.

## Fase 12: Irrigación con CHX 2%.

Esta etapa corresponde a la medicación del canal radicular con CHX 2%.

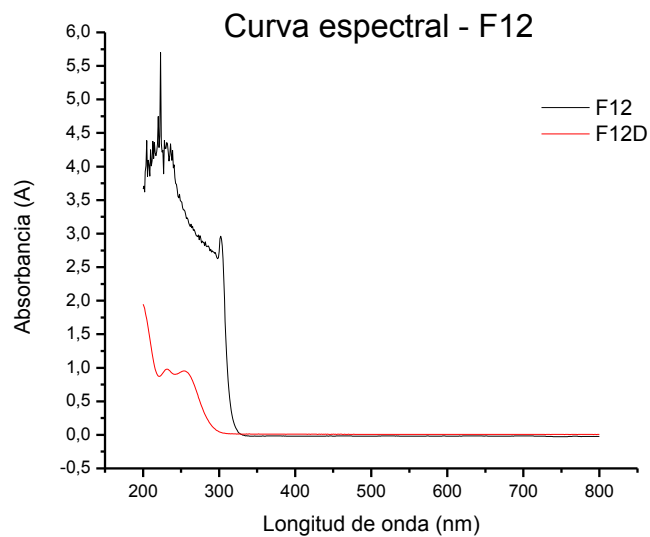


Gráfico 15: Espectros de absorción obtenidos en Irrigación con CHX 2%(Fase 12) de CHX concentrado (-F12) y diluido (-F12D). Concentración Promedio encontrado de CHX: 1,85%

### **Fase 13: Irrigación con CHX 2% .**

Esta etapa corresponde a la etapa final de irrigación del canal con CHX 2%, previo a la obturación. La muestra corresponde al eluido obtenido pasado una semana de incubación.

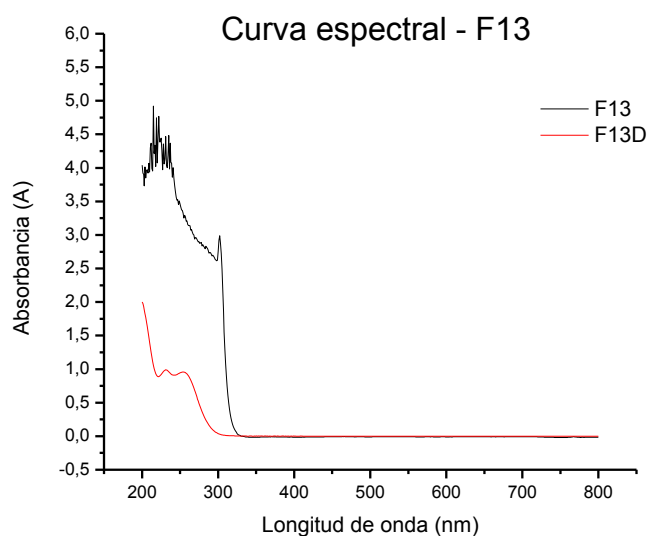


Gráfico 16: Espectros de absorción obtenidos en Irrigación con CHX 2% (Fase 13) de CHX concentrado (-F13) y diluido (-F13D). Concentración Promedio encontrado de CHX: 1,8%.

**Tabla 6. Concentración de CHX determinado en las fases 12 y 13.**

<b>Fase</b>	<b>Concentración Mínima</b>	<b>Concentración Máxima</b>	<b>Concentración Promedio</b>	<b>DS</b>
<b>F12</b>	1,7%	2,05%	<b>1,85%</b>	±0,13
<b>F13</b>	1,6%	2,02%	<b>1,8%</b>	±0,142

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

## 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%.

### Fase 12: Irrigación con CHX 2%.

En el eluido obtenido en esta fase del tratamiento endodóntico se obtuvo el espectro de absorción y la concentración de PCA formado.

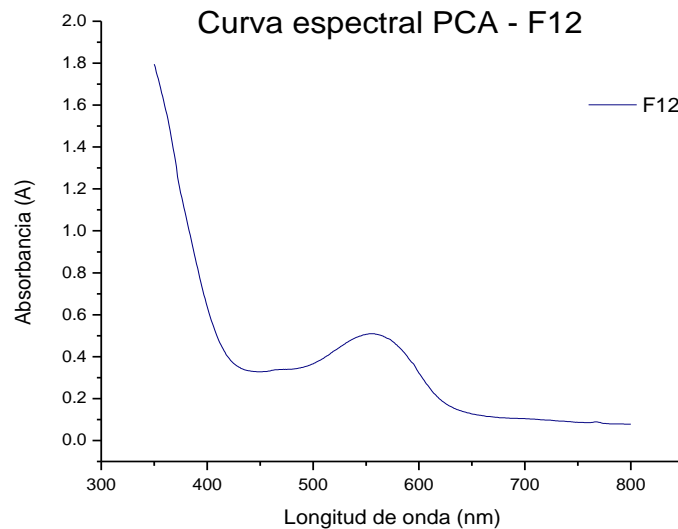


Gráfico 17: Espectro de absorción de PCA obtenido durante la Fase 12 (F12) del tratamiento endodóntico. Concentración promedio encontrado de PCA: 0,0007%

### **Fase 13: Irrigación con CHX 2%**

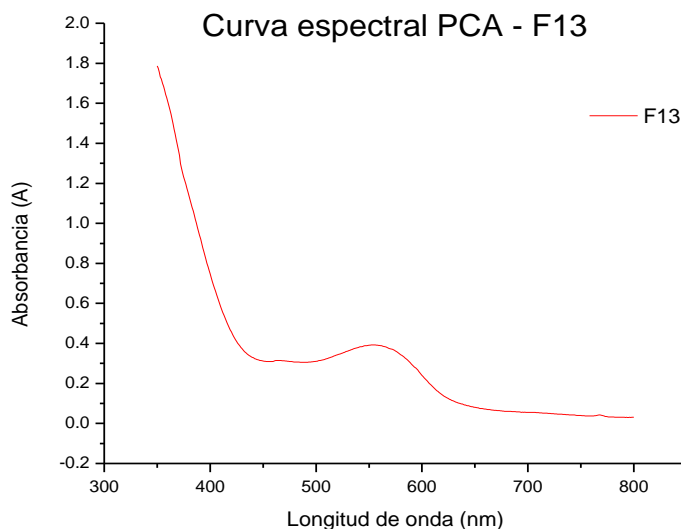


Gráfico 18: Espectros de absorción de PCA obtenido durante la Fase 13 (F13).  
Concentración promedio encontrado de PCA: 0,0005%

**Tabla 6. Concentración de PCA determinado en las fases 12 y 13.**

<b>Fase</b>	<b>Concentración Mínima</b>	<b>Concentración Máxima</b>	<b>Concentración Promedio</b>	<b>DS</b>
<b>F12</b>	0,0004%	0,0013%	<b>0,0007%</b>	±0,0002
<b>F13</b>	0,0001%	0,0009%	<b>0,0005%</b>	±0,0003

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

Las curvas espectrales de la PCA obtenidas en las fases 12 y 13 presentan formas similares pero con un pico de absorción mayor para la primera fase, esto implica una mayor concentración de PCA encontrado. **Ver gráfico 19.**

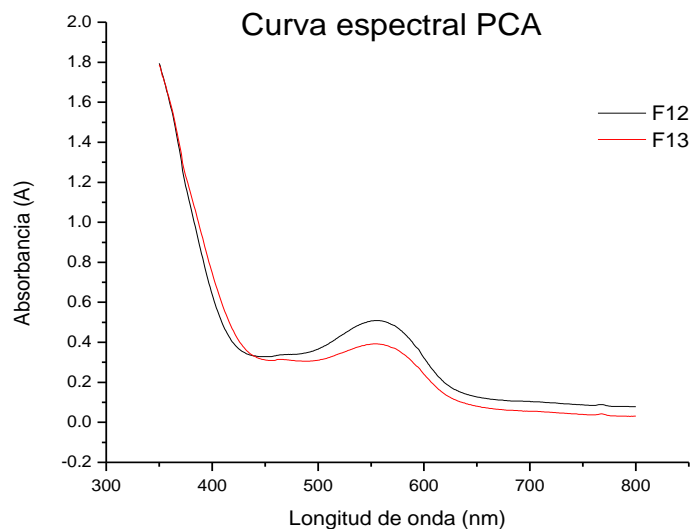


Gráfico 19: Espectros de absorción de PCA durante las fases 12 y 13 (F12 y F13) luego del uso de CHX al 2%

Se ha descrito que la CHX puede hidrolizarse espontáneamente y formar PCA en presencia de calor, luz y ambiente alcalino. Para ver el posible aporte de PCA a partir de la CHX 2% se realizó la determinación de PCA en la CHX utilizada en la irrigación.

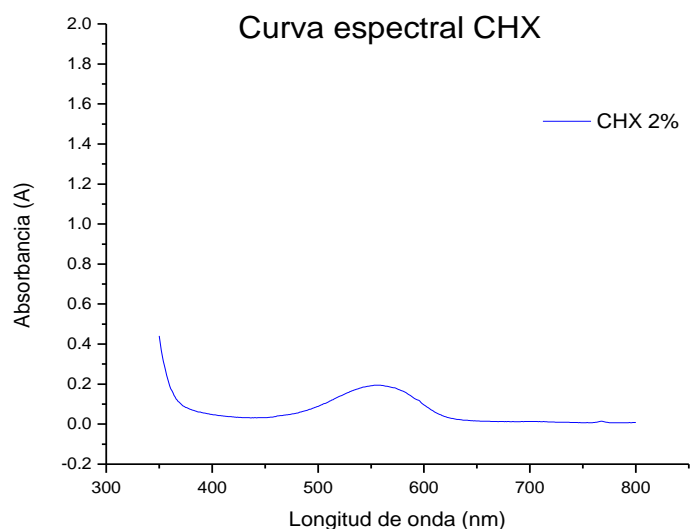


Gráfico 20: Espectro de absorción de PCA en solución de CHX al 2%.  
Concentración de PCA encontrada: 0,0002 %

Se puede observar que las curvas de absorción para las muestras del tratamiento endodóntico, F12 y F13 presentan picos muchos más intensos que la observada en la CHX 2%. **Ver gráfico 21.**

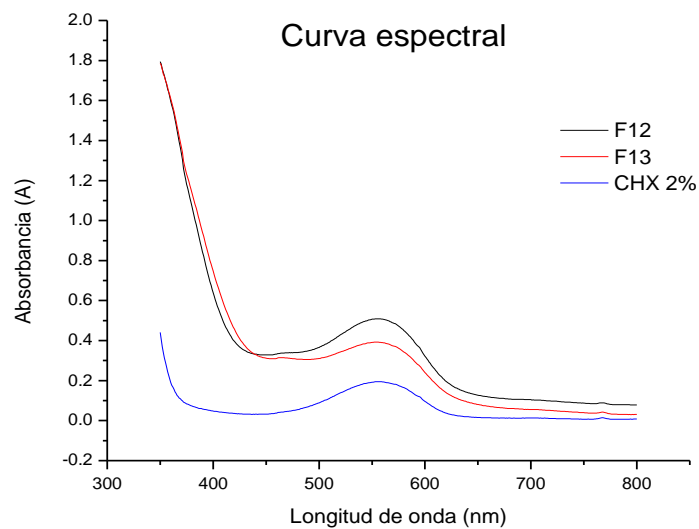


Gráfico 21: Espectros de absorción de PCA durante Fase 12, 13 y CHX al 2%.

## DISCUSIÓN

La irrigación es parte fundamental para el éxito del tratamiento endodóntico, en la actualidad no existe una solución que cumpla con todas las características del irrigante ideal, por lo tanto se debe hacer uso de múltiples soluciones durante la PQM del canal radicular, lo que puede llevar a la interacción de éstos, trayendo consigo la posible generación de subproductos. El protocolo de irrigación propuesto en este trabajo utilizó NaClO al 5% durante la fase de preparación mecánica del canal, con el objetivo de aprovechar su capacidad antimicrobiana y para disolver el componente orgánico y tejido necrótico presente en el canal radicular (Gomes y cols 2001; Vianna y cols. 2004), luego se irrigó con suero fisiológico para diluir la presencia del NaClO, posteriormente se utilizó EDTA al 10% y se dejó actuar por 1 minuto, para eliminar el barro dentinario producido por la instrumentación (Calt y cols 2002), nuevamente se lavó el canal con suero fisiológico para diluir el EDTA y NaClO remanentes y por último se utilizó CHX como medicación intracanal y previo a la OCR, debido a su sustantividad y amplio espectro antibacteriano (Zender 2006)

Diversos estudios han analizado la interacción entre NaClO y CHX y se han encontrado resultados dispares; mientras algunos han descartado la presencia de PCA (Thomas y Sem 2010; Prado y cols. 2013), otros han demostrado la formación de un precipitado color café-anaranjado cuando se mezclan soluciones de NaClO y CHX; además de la presencia de PCA en el precipitado (Basrani y cols 2007, 2009, 2010; Bui y cols. 2008; Krishnamurthy y Sudhakaran 2011, Mortenson y cols. 2012). Estas diferencias podrían deberse a las distintas metodologías utilizadas en los estudios. Debido a las características que posee PCA, su citotoxicidad en ratas y su potencial carcinogénico en seres humanos (World Health Organization, 2006), es importante evaluar distintos irrigantes intermedios y protocolos para prevenir su formación.



En este estudio también se calculó la concentración de NaClO durante las primeras fases de preparación del canal radicular y se determinó que disminuye en relación a su concentración inicial del 5% a valores promedios de 3,4% en la primera etapa (Cavidad de acceso) a 3,8% en la cuarta etapa (Step-Back), esto se explica por el mayor porcentaje de materia orgánica en las primeras etapas del proceso. La inactivación del NaClO al interactuar con materia orgánica ha sido descrita en estudios anteriores, midiendo su actividad antibacteriana luego de estar en contacto con la dentina. (Haapasalo M. 2000). Esta inactivación se provoca cuando el NaClO entra en contacto con materia orgánica, debido a que se producen las reacciones de saponificación, neutralización, además de la formación de cloraminas. Estas reacciones, que ocurren principalmente en la superficie de contacto entre NaClO y la materia orgánica, llevan a la licuefacción del tejido orgánico (Estrela y cols 2002) y al mismo tiempo, las moléculas de NaClO involucradas se consumen, resultando en una disminución de su concentración y actividad local (Stojicic y cols 2010).

El protocolo de irrigación utiliza suero fisiológico para diluir el NaClO que pudiera quedar en los canales radiculares; el suero fisiológico por tres veces, fases 5,6 y 7 del protocolo. Los resultados nos muestran una baja importante en la concentración de NaClO (0,007% a 0,001%), pero estudios han evidenciado que al mezclar CHX 2% con diluciones acuosas de NaClO que van del 5% al 0,0005% la solución cambia de color en relación directa a la concentración de NaClO evidenciado formación de PCA (Bilbao y cols 2013), lo que se corresponde con resultados obtenidos por Basrani y cols. (2007) y Gasic y cols. (2012).

También se determinó la variación de concentración del EDTA luego de su paso por el canal radicular, causando descalcificación de la dentina peri e intertubular y del barro dentinario. Se encontró que la concentración inicial de EDTA del 10% disminuye luego de estar en el canal radicular (fase 8) en forma importante a 8,9%. Su disminución se debe a su capacidad quelante, al ejercer su acción sobre los iones  $\text{Ca}^{+2}$  de la dentina, provocando su desmineralización por quelación durante el tiempo que este está en contacto con las paredes del canal

radicular. EDTA también ha sido utilizado en otro estudio como irrigante intermedio con el objetivo de lavar e inactivar el NaClO presente en los tubulos dentinarios y así evitar la formación de PCA, sin embargo al igual que en nuestros resultados se encontró la presencia de PCA, luego de usar CHX (Mortensen y cols 2012).

Las fases 9, 10, 11, que utilizan el NaCl al 0,9%, en el protocolo de irrigación, fundamentalmente tiene como objetivo eliminar de los canales radiculares la presencia de EDTA. Los valores medidos en estos fluidos nos indican concentraciones de EDTA de 0,013% a 0,002%. En este estudio el uso de suero fisiológico al 0,9% en abundante volumen como irrigación intermedia mostro ser eficaz en diluir la presencia de NaClO y EDTA del canal radicular, haciendo disminuir su concentración previo al uso de CHX 2%, pero no evita la formación de PCA. Esto puede confirmarse porque en estos fluidos (fases 9, 10, 11) es posible cuantificar NaClO en concentraciones que van 0,0011% a 0,0006% , valores pequeños pero que en presencia de CHX 2% forman PCA. Tal como fue demostrado anteriormente por un estudio *in vitro* que vio la influencia de NaCl al 0,9% en la formación de PCA, al ser usado entre NaClO 5% y CHX 2%, donde se vio que la dilución de NaClO con NaCl 0,9% no impide la formación de PCA (Bilbao C y cols 2013).

La CHX al 2%, como medicamento intracanal se utiliza en las fases 12 y 13. Un gran número de estudios señalan 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 Ca(OH)<sub>2</sub> por sí solo no hace. En nuestro estudio la concentración de CHX en los eluidos es menor al 2% (1,85% en fase 12 y 1,8% en fase 13). Esta disminución de la concentración podría ser explicada por la sustantividad de la CHX que es capaz de unirse a la dentina a través de una interacción electrostática entre ambos. Quizás a nivel *in vivo* la situación sea diferente por la presencia de microorganismos en los canales radiculares, lo que debiera producir una mayor caída de su concentración.

En este estudio se determinó la concentración de PCA modificando el protocolo usado en la detección (cualitativo) de Paracloroanilina en soluciones de digluconato de clorhexidina, 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 con 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 las últimas fases, luego de irrigar con CHX al 2%, con concentraciones promedios de PCA que se encuentra en el orden de los  $10^{-3}$  a  $10^{-4}$  g/100ml, por lo que no se confirma la hipótesis planteada, ya que las cantidades esperadas eran del orden de  $10^{-3}$  a  $10^{-2}$  g/100ml, cantidades que son menores a las esperadas, pero bastante cercanas.

Según lo establecido por la Organización Mundial de la Salud en relación a la exposición a PCA y considerando solo los efectos no neoplásicos, como por ejemplo metahemoglobinemia, el nivel máximo tolerable de exposición humana a PCA está en el orden de  $2\mu\text{g/kg}$  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 estarían entre  $0,1\mu\text{g}$  y  $1\mu\text{g}$ , lo que se encuentra bajo el nivel máximo tolerable.

Diversos estudios se han realizado para evaluar la formación de PCA luego de usar diferentes soluciones como irrigantes entre NaClO y CHX. Mortensen y cols (2012) utilizaron ácido cítrico o solución salina, sin embargo no se pudo prevenir la formación de PCA. Krishnamurthy y Sudhakaran (2010) también evaluaron el uso de irrigantes como alcohol isopropílico, solución salina y agua destilada para prevenir la formación de PCA, pero los resultados arrojaron que el único capaz de prevenir la formación de PCA fue la irrigación intermedia con alcohol isopropílico. Esto debido a que se trata de un agente tenso activo, volátil y altamente electronegativo, que podría penetrar de mejor manera en el canal radicular para remover el NaClO residual, sin embargo la biocompatibilidad del

alcohol con los tejidos periapicales no ha sido totalmente estudiada.

Si bien en este estudio el protocolo de irrigación planteado fue distinto a los utilizados en estudios previos, también se encontró PCA, lo que podría deberse a que los irrigantes utilizados en este caso, EDTA y NaCl al 0,9%, no logran penetrar completamente en el canal radicular o específicamente en los túbulos dentinarios para inactivar o arrastrar totalmente el NaClO.

Este estudio muestra que la CHX 2% pura contenía bajos niveles de PCA, esto sugiere que, tal como se ha reportado en otros estudios, cuando CHX se encuentra en solución acuosa, se hidroliza lentamente y se forma Paracloroanilina (PCA). Esto ocurre a través de la sustitución del grupo guanidino en la molécula de CHX. Se ha detectado PCA en muestras de CHX al 2%, almacenadas a 36,5° C y a una humedad relativa de 95%, inmediatamente y luego de 7 días de preparadas. Asimismo se observó un aumento en la generación de PCA durante estos 7 días (Barbin y cols 2013). También se sugiere que al mezclar con NaClO, la moléculas de CHX se hidrolizan en pequeñas partes, cada una formando un sub-producto. Se teoriza que el primer enlace en romperse en la reacción es entre carbono y nitrógeno por la baja energía de disociación entre estos 2 átomos y esta disociación resultaría en la formación de PCA entre otros fragmentos (Basrani y cols 2007; Krishnamurthy y Sudhakaran2010).

En conclusión, los datos obtenidos en este estudio muestran la presencia de PCA luego de utilizar el protocolo de irrigación propuesto en un modelo ex vivo. Lo que sería principalmente resultado de la interacción entre NaClO y CHX. Por lo tanto, se requiere mayor investigación acerca de esta reacción, de la formación de PCA y de su posible difusión a los tejidos periapicales, debido a su citotoxicidad en ratas y su potencial carcinogénico en seres humanos (World Health Organization, 2006). Por el momento se recomienda el uso de irrigación intermedia como suero fisiológico en grandes cantidades, además de conos de papel para eliminar el NaClO del canal radicular, evitando así su contacto directo con CHX, para disminuir la cantidad de PCA.

## CONCLUSIONES

A partir del presente trabajo de investigación se puede concluir:

1. La metodología UV-VISIBLE permite la medición de NaClO, EDTA, CHX y PCA en un protocolo endodóntico.
2. La concentración de hipoclorito de sodio al 5% disminuye significativamente durante las cuatro primeras fases por su efecto en la preparación químico-mecánica del canal radicular.
3. El constante recambio de NaClO durante la Preparación Químico mecánica del canal radicular, se justifica para mantener sus propiedades, debido a la inactivación durante su uso por contacto con materia orgánica y dentina.
4. Se detecta NaClO en las fases 5, 6, 7, 9,10 y 11 con concentraciones menores pero cuantificables.
5. La concentración de EDTA 10% en la fase 8, disminuye por su acción desmineralizadora sobre compuestos inorgánicos del barro dentinario. Se encuentra medible además en las fases 9,10 y 11.
6. La concentración de CHX 2% disminuye después de uso intracanal posiblemente por su sustentividad con la dentina de los canales radiculares.
7. Se forma PCA en los canales por presencia de CHX 2% y NaClO residual detectado en las fases 9, 10 y 11.
8. El uso de suero fisiológico al 0,9% permite diluir la concentración de NaClO y EDTA del canal radicular.
9. La Irrigación con suero fisiológico al 0,9% no evita la formación de PCA.
10. Se debe tener en consideración el modo de almacenamiento de la CHX, antes de ser usada debido a la posible formación de PCA por hidrolisis

## REFERENCIAS

1. Barbin LE, Estrela C, Guedes DF, Spanó JC, Sousa-Neto MD, Pécora JD (2013). Detection of Para-Chloroaniline, Reactive Oxygen Species, and 1-Chloro-4-Nitrobenzene in High Concentrations of Chlorhexidine and in a Mixture of Chlorhexidine and Calcium Hydroxide. J Endod. 39:664-668
2. Barbosa CA, Goncalves RB, Siqueira Junior JF (1997). Evaluation of the antibacterial activities of calcium hydroxide, chlorhexidine, and camphorated paramonochlorophenol as intracanal medicament. A clinical and laboratory study. J Endod. 23:297–300.
3. Basrani B, Santos M, Tjaderhane L, Grad H, Gorduysus O, Huang J (2002). Substantive antimicrobial activity in chlorhexidine-treated human root dentin. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 94:240-245
4. Basrani B (2005). Chlorhexidine Gluconate. Australian Endodontic Journal 31: 48-52
5. Basrani B, Manek S, Sodhi RN, Fillery E, Manzur A (2007). Interaction between sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate. J Endod 33:966–969.
6. Basrani B, Haapasalo H. (2012). Update on endodontic irrigating solutions Endodontic Topics 27:74–102
7. Basrani B, Manek S., Mathers D., Fillery E. (2010). Determination of 4-Chloroaniline and Its Derivatives Formed in the Interaction of Sodium Hypochlorite and Chlorhexidine by Using Gas Chromatography. J Endod 36:312-314.
8. Beltz RE, Torabinejad M, Pouresmail M (2003). Quantitative analysis of the solubilizing action of MTAD, sodium hypochlorite, and EDTA on bovine pulp and dentin. J Endod. 29:334-337.
9. Bilbao C. Trabajo de investigación para el título de cirujano dentista Influencia del suero fisiológico en la formación de Paracloroanilina, estudio *In vitro*, U de Chile, 2013.
- 10.Boehncke A, Kielhorn J, Könnecker G, Pohlenz-Michel C, and Mangelsdorf I(2003). 4-CHLOROANILINE, Fraunhofer Institute of Toxicology and Aerosol

Research, Drug Research and Clinical Inhalation, Hanover, Germany. World Health Organization

11. Bui TB, Baumgartner JC, Mitchell JC (2008). Evaluation of the interaction between sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate and its effect on root dentin. J Endod 34:181–185.
12. Calt S, Serper A (2002). Time-dependent effects of EDTA on dentin structures. J Endod 28:17–19.
13. Clegg MS, Vertucci FJ, Walker C (2006). The effect of exposure to irrigant solutions on apical dentin biofilms in vitro. J Endod 32:434–7.
14. Crumpton BJ, Goodell GG, McClanahan SB (2005). Effects on Smear Layer and Debris Removal with Varying Volumes of 17% REDTA after Rotary Instrumentation. J Endod 31:536-538
15. Delgado R J, Gasparoto T H, Sipert C R, Pinheiro C R, Moraes I G, Garcia R B, Bramante C M, Campanelli AP, Bernardineli N (2010). Antimicrobial effects of Calcium hydroxide and Chlorhexidine on Enterococcus faecalis. J Endod. 36:1389-1393.
16. Estrela C, E L Barbin, E. Spano, A. Marchesan, D. Pecora (2002). Mechanism of action of Sodium Hypochlorite. Braz Dent J.13: 113-117.
17. Farmacopea europea, Monografias C. Digluconato de Clorhexidina Solution. 5ª Edicion. 2005.
18. Frais S, Gulabivala K (2001). Some factors affecting the concentration of available chlorine in commercial sources of sodium hypochlorite. Int Endod J. 34:206
19. Gomes BP, Ferraz CC, Vianna ME (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.
20. Gomes BP, Sato E, Ferraz CC, Teixeira FB, Zaia AA, Souza-Filho FJ (2003 a). Evaluation of time required for recontamination of coronally sealed canals medicated with calcium hydroxide and chlorhexidine. Int Endod J 36:604–609
21. Gomes BPFA, Souza SFC, Ferraz CCR, Teixeira FB, Zaia AA, Valdrighi L, Souza-Filho (2003 b). Effectiveness of 2% chlorhexidine gel and calcium

- hydroxide against *Enterococcus faecalis* in bovine root dentine in vitro. Int Endod J.36:267-275
22. Gomes BP, Vianna ME, Zaia AA, Almeida JF, Souza-Filho FJ, FerrazCC (2013). Chlorhexidine in endodontics. Braz Dent J. 24:89-102
  23. Grande NM, Plotino G, Falanga A (2006). Interaction between EDTA and sodium hypochlorite: a nuclear magnetic resonance analysis. J Endod. 32:460-464.
  24. Grawehr M, Sener B, Waltimo T, Zehnder M (2003). Interactions of ethylenediaminetetraacetic acid with sodium hypochlorite in aqueous solutions. Int Endod J. 36:411–7.
  25. Haapasalo HK, Siren EK, Waltimo TM (2000). Inactivation of local root canal medicaments by dentine: an in vitro study. Int Endod J. 33:126–131.
  26. Haapasalo M, Shen Y, Qian W, Gao Y (2010). Irrigation in Endodontics. Dental Clinics of North America. 54:291-312
  27. Haapasalo M, Shen Y, Wang Z, Gao Y. Irrigation in Endodontics (2014). British Dental Journal. 216:299-303
  28. Khademi AA, Mohammadi Z, Havaee A (2006). Evaluation of the antibacterial substantivity of several intra-canal agents. Australian Endodontic Journal. 32:112–5.
  29. Krishnamurthy S. Sudhakaran S (2010). Evaluation and Prevention of the Precipitate Formed on Interaction between Sodium Hypochlorite and Chlorhexidine. J Endod. 36:1154–1157
  30. Law A, Messer H (2004). An evidence-based analysis of the antibacterial effectiveness of intracanal medicaments. J Endod. 30:689 –94.
  31. Ma J, Wang Z, Shen Y, Haapasalo M (2011). A new noninvasive model to study the effectiveness of dentin disinfection by using confocal laser scanning microscopy. J Endod. 37:1380–1385.
  32. Marchensen MA, Pasternak B, Afonso MM, Sousa-Neto MD, Paschoalato C (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
  33. Mareending M, Luder HU, Brunner TJ (2007). Effect of sodium hypochlorite on



- human root dentine—mechanical, chemical and structural evaluation. Int Endod J. 40:786–93.
34. Mohammadi Z, Abbott PV (2009). The properties and applications of chlorhexidine in endodontics. Int Endod J. 42:288–230
35. Mortenson D, Sadilek M, Flake NM, Paranjpe A, Helling I, Johnson JD, Cohenca N (2012). The effect of using an alternative irrigant between sodium hypochlorite and chlorhexidine to prevent the formation of para-chloroaniline within the root canal system. Int Endod J. 45:878–882
36. Naenni C, Kaya Thoma, Zehnder M (2004). Soft Tissue Dissolution Capacity of Currently Used and Potential Endodontic Irrigants. J Endod. 30:785-7.
37. Niu, T. Yoshioka, C. Kobayashi, H. Suda (2002). A scanning electron microscopic study of dentinal erosion by final irrigation with EDTA and NaOCl solutions. Int Endod J 35:934–939.
38. Oyarzun A, Cordero AM, Whittle M (2002). Immunohistochemical evaluation of the effects of sodium hypochlorite on dentin collagen and glycosaminoglycans. J Endod. 28:152–156.
39. Paquette L, Legner M, Fillery ED, Friedman S (2007). Antibacterial efficacy of chlorhexidine gluconate intracanal medication in vivo. J Endod. 33:788–795
40. Prado M, Santos Junior HM, Rezende CM, Pinto AC, Farias RB, Simao RA, Gomes BP (2013). Interactions between Irrigants Commonly Used in Endodontic Practice: A Chemical Analysis. J Endod. 39:505–510
41. Qian W, Shen Y, Haapasalo M (2011). Quantitative analysis of the effect of irrigant solution sequences on dentin erosion. J Endod. 37:1437–1441
42. Rasimick BJ, Nekich M, Hladek MM (2008). Interaction between chlorhexidine gluconate and EDTA. J Endod. 34:1521–1523.
43. Rosenthal S, Spangberg L, Safavi K (2004). Chlorhexidine substantivity in root canal dentin. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 98:488-92
44. Schoffstall (2004). Microscale and miniscale organic chemistry laboratory experiments. 2nd ed. New York: McGraw Hill.

45. Soares JI y Golbert S (2004). Endodoncia Técnicas y Fundamentos. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires.
46. Şen BH, Özlem Ertürk, Beyser Pişkin (2009). The effect of different concentrations of EDTA on instrumented root canal walls. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics. 108: 622-627
47. Stojicic S, Zivkovic S, Qian W, Zhang H, Haapasalo M (2010). Tissue dissolution by sodium hypochlorite: effect of concentration, temperature, agitation and surfactant. J Endod. 36:1558–1562.
48. Teixeira CS, Felipe MC, Felipe WT (2005). The effect of application time of EDTA and NaOCl on intracanal smear layer removal: an SEM analysis. Int Endod J. 38:285–290.
49. Triada M. Estadística 9ª ed. México: Pearson educación: 2004.
50. Vianna DD, Brenda PA, Gomes D (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
51. Violich DR, Chandler NP (2010). The smear layer in endodontics. Int Endod J. 43: 2–15.
52. Vivacqua-Gomes N, Ferraz CCR, Gomes BPFA, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ (2002). Influence of irrigants on the coronal microleakage of laterally condensed gutta-percha root fillings. International Endodontic Journal. 35:791-795
53. Wang Z, Shen Y, Haapasalo M (2012). Effectiveness of endodontic disinfecting solutions against young and old Enterococcus faecalis biofilms in dentin canals. J Endod. 38:1376–1379
54. World Health Organization (OMS), International Agency for Research on Cancer (IARC). Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Lyon, France Volumen 86, 2006.
55. Zamany A, Safavi K, Spangberg LS (2003). The effect of chlorhexidine as an endodontic disinfectant. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 96:578–81.
56. Zehnder M (2006) Root canal irrigants. J. Endod 32: 389–98.

57. Zou L, Shen Y, Li W, Haapasalo M (2010). Penetration of sodium hypochlorite into dentin. J Endod. 36:793–796.

## ANEXOS

### Anexo 1: PROTOCOLO DE IRRIGACION

#### 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 NaClO al 5% con *Jeringa irrigación Monoject* 3ml+Aguja (27x1 1/4). Se establece la permeabilidad del canal con limas K finas irrigando con NaClO al 5% → **Recolección # 1**
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 NaClO al 5%. → **Recolección # 2**
3. Determinación Longitud de Trabajo (LT): Se realizará introduciendo la lima hasta que se visualice la punta de ésta por el ápice.
4. Preparación 1/3 Apical hasta Lima Maestra (LM) irrigando con NaClO al 5 % entre cada paso de lima → **Recolección # 3**
5. Retroceso (Step-Back) desde la LM hasta preparación de 1/3 Medio irrigando con NaClO al 5 % entre cada paso de lima → **Recolección # 4**
6. Secado (con conos de papel)
7. Irrigación (IRR) con suero fisiológico, 3 jeringas de 3ml c/u → **Recolección # 5, 6 y 7**
8. Secado (con conos de papel)

9. IRR con EDTA al 10% → **Recolección # 8**
10. Secado (con conos de papel)
11. IRR con suero fisiológico, 3 jeringas de 3ml c/u → **Recolección # 9, 10 y 11**
12. Secado (con conos de papel)
13. IRR con CHX 2% 1 jeringa de 3ml → **Recolección # 12**
14. Doble sellado: Se sella el ápice y se pondrá 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 3ml de CHX 2% repasando con LM → **Recolección # 13**
2. Secado
3. Obturación
4. Doble sellado

## **Anexo 2: FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO**

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

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

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

Osvaldo Alegre Godoy, alumno 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. Silvana Maggiolo, está realizando un estudio cuyo objetivo es medir los volúmenes de eluidos recogidos durante el tratamiento endodóntico en dientes extraídos para luego determinar el volumen y concentración del compuesto formado entre hipoclorito de sodio 5% y clorhexidina 2%.

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

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

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

Si usted desea conocer los resultados de los análisis, deberá preguntarle al

alumno responsable (Nombre:Oswaldo Alegre Godoy; celular: 88270139)

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