



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

**ESTUDIO COMPARATIVO DE LA FORMACIÓN DE *p*-CLOROANILINA AL
USAR ÁCIDO CÍTRICO Y SUERO FISIOLÓGICO DURANTE LA APLICACIÓN
DE PROTOCOLO DE IRRIGACIÓN ENDODÓNTICO. ESTUDIO *EX VIVO***

Pedro Ángel Castillo Castillo

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

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Dra. Alejandra Fuenzalida Muñoz

TUTORES ASOCIADOS

Prof. Ismael Yévenes López

Prof. Dr. Mauricio Ruiz Nolf

Adscrito a Proyecto FIOUCH 13-015

Santiago – Chile

2019



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

**ESTUDIO COMPARATIVO DE LA FORMACIÓN DE *p*-CLOROANILINA AL
USAR ÁCIDO CÍTRICO Y SUERO FISIOLÓGICO DURANTE LA APLICACIÓN
DE PROTOCOLO DE IRRIGACIÓN ENDODÓNTICO. ESTUDIO *EX VIVO***

Pedro Ángel Castillo Castillo

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

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Dra. Alejandra Fuenzalida Muñoz

TUTORES ASOCIADOS

Prof. Ismael Yévenes López

Prof. Dr. Mauricio Ruiz Nolf

Adscrito a Proyecto FIOUCH 13-015

Santiago – Chile

2019

El sentido de la vida es dar a la vida sentido.

Viktor E. Frankl

AGRADECIMIENTOS

En este largo recorrido, no podría ser tan egoísta al creer que este cierre de una etapa tan importante sea un logro exclusivamente de mi persona.

Quiero empezar por agradecer a mis padres, por todo su amor y cariño. Por dar todas las herramientas y posibilidades que estaban a su alcance para la educación de sus hijos. Agradecer a mis hermanas, Marcela y Carolina, por su apoyo incondicional y mutuo en todos aquellos momentos felices y también los complicados. A mis tíos, por siempre confiar en mí durante toda la carrera y antes.

Agradecer a mis amigas y amigos, por estar ahí en las buenas y en las malas. Su apoyo les estaré infinitamente agradecido, además de atesorar aquellos momentos compartidos con todos ustedes. A Gonzalo y Carolina por su amistad sin barreras desde que éramos chicos. A Hetiel, Hans, Francisco, Flaco, Chelo, Mau, Seba, Pato y Horma por ser los mejores partners entre Santiago y Rancagua. Dani, Monse, Vale, Rocío, Ricardo, Pams, Steis, Carito, Coté, Irina, Is, Lina, Caro, Mari, Camilo, Uri, Pelao, Naco, Cami, Javier, Walter, Pazi, Rafa, Dieguito, Jorge, Gabo, Coni, Carlitos, Barbie y aún más gente de los que podría mencionar, todos estos años en la facultad han sido agradables y estoy más que agradecido de que el destino haya sido tan amable de permitirme conocerlos y compartir tantas experiencias con todos ustedes.

Agradecer a los docentes que estuvieron a cargo y me enseñaron que no sólo de odontología, sino de la vida. A Dra. María Cristina Jiménez, Dr. Mauricio Garrido, Dra. Constanza Osorio, Dra. Paulina San Pedro y en especial a Dr. Nelson Brierley. Agradecer a aquellos docentes a quienes aceptaron mi ayuda y creyeron en mí, como el Dr. Julio Tobar, Dr. Mauricio Ruiz, Dra. Andrea Dezerega y Dra. Natalia Concha, que finalmente me hicieron brotar el interés por la docencia.

Finalmente agradecer a mis tutores, Dra. Alejandra Fuenzalida, Dr. Mauricio Ruiz y Prof. Ismael Yévenes por su aceptación, su apoyo, sus consejos, su preocupación y especialmente su guía en la realización de este proyecto de investigación.

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| MARCO TEÓRICO | 1 |
| INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| SOLUCIONES IRRIGANTES | 3 |
| HIPOCLORITO DE SODIO | 3 |
| ÁCIDO ETILENDIAMINOTETRAACÉTICO..... | 5 |
| ÁCIDO CÍTRICO | 6 |
| MEDICACIÓN INTRACANAL | 8 |
| DIGLUCONATO DE CLORHEXIDINA | 8 |
| HIDRÓXIDO DE CALCIO | 10 |
| INTERACCIONES ENTRE IRRIGANTES | 10 |
| SOLUCIONES UTILIZADAS COMO IRRIGANTES INTERMEDIOS..... | 12 |
| HIPÓTESIS..... | 15 |
| OBJETIVOS..... | 15 |
| METODOLOGÍA | 16 |
| SELECCIÓN DE MUESTRAS | 16 |
| OBTENCIÓN DE MUESTRAS | 17 |
| TRATAMIENTO ENDODÓNTICO DE LAS MUESTRAS..... | 18 |
| PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO | 21 |
| Determinación de NaClO..... | 23 |
| Determinación de PCA..... | 24 |
| Análisis por espectrometría infrarroja | 25 |
| ANÁLISIS DE DATOS | 25 |

| | |
|--|----|
| RESULTADOS..... | 26 |
| Concentración de NaClO..... | 26 |
| Concentración de PCA..... | 27 |
| Análisis en FTIR-ATR..... | 28 |
| DISCUSIÓN..... | 31 |
| CONCLUSIONES..... | 36 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 37 |
| ANEXOS Y APÉNDICES..... | 49 |
| Anexo 1: Acta de aprobación de protocolo de investigación..... | 49 |
| Anexo 2: Autorización extensión proyecto FIOUCh, 2016..... | 52 |
| Anexo 3: Autorización extensión proyecto FIOUCh, 2017..... | 53 |
| Anexo 4: Consentimiento informado para donación de dientes para investigación (donantes adultos)..... | 54 |
| Anexo 5: Protocolo de irrigación y medicación de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile..... | 57 |
| Anexo 6: Dispositivo para toma de muestras..... | 59 |

LISTA DE ABREVIACIONES:

| Abreviación | Significado |
|---------------------------------|---|
| AC | Ácido Cítrico |
| FTIR-ATR | Espectrofotometría de infrarrojos por transformada de Fourier de reflexión total atenuada |
| Ca(OH)₂ | Hidróxido de Calcio |
| CHX | Clorhexidina |
| Cl₂ | Gas cloro |
| EDTA | Ácido Etilendiaminotetraacético |
| IRR | Irrigación |
| NaCl 0,9% | Suero Fisiológico |
| NaClO | Hipoclorito de Sodio |
| PCA | Paracloroanilina |
| PQM | Preparación quimio-mecánica |
| OCR | Obtención de canales radiculares |
| SCR | Sistema de Canales Radiculares |

RESUMEN

Introducción: La combinación de soluciones irrigantes endodónticas entre sí o con medicamentos intracanal pueden generar subproductos que podrían interferir con la desinfección del sistema de canales radiculares y/o ser tóxicos para los tejidos periapicales. La interacción entre hipoclorito de sodio (NaClO) con clorhexidina (CHX) forma un precipitado que se ha asociado a paracloroanilina (PCA). El uso de EDTA como irrigante intermedio disminuye *in vitro* la formación de PCA, pero forma otro precipitado, por lo que se ha considerado el uso de ácido cítrico (AC) como alternativa a éste. El objetivo de este estudio es determinar *ex vivo* si AC 10% evita la formación de PCA al ser utilizado como irrigante intermedio entre NaClO 5% y CHX 2%.

Materiales y métodos: A 30 dientes extraídos se les realizó un tratamiento endodóntico aplicando el protocolo de irrigación y medicación de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. 20 conformaron el grupo experimental y 10 el grupo control, utilizando AC 10% y suero fisiológico como irrigantes intermedios respectivamente. Se recolectaron 13 muestras en distintas etapas del tratamiento, determinándose la concentración de NaClO y PCA por espectrofotometría. Además, se procedió al análisis por espectrometría infrarroja de un precipitado inespecífico detectado en las últimas etapas.

Resultados: Al utilizar los irrigantes intermedios, las concentraciones de NaClO son levemente más altas en el grupo experimental que en el grupo control. Sin embargo, la concentración de PCA posterior a la medicación fue mayor en el grupo control. Al reaccionar CHX y AC se detectó la formación de un precipitado, el que podría corresponder a una sal.

Conclusión: El uso del ácido cítrico 10% como irrigante intermedio reduce la concentración final de PCA posterior a la medicación con CHX al 2%, en comparación con suero fisiológico. La interacción entre CHX y AC genera un precipitado distinto a PCA que puede estar en contacto con las paredes radiculares. Se requieren estudios adicionales para evaluar estructura y efectos de este precipitado.

1. MARCO TEÓRICO

1.1. INTRODUCCIÓN

El principal objetivo de un tratamiento endodóntico es la desinfección y sellado tridimensional del sistema de canales radiculares para evitar la reinfección y propender a la reparación de los tejidos afectados (Bysreöm y Sundqvist 1981; Swedish Council on Health Technology Assessment 2012; American Association of Endodontists 2016). La preparación mecánica de los canales radiculares, por sí sola, no es suficiente para lograr este objetivo, ya que existen zonas no instrumentables en el sistema de canales. Ésta es una de las razones por la que se emplean soluciones irrigantes para lograr la desinfección de todo el sistema de canales radiculares (SCR) (Peters 2004; Haapasalo y cols. 2014).

La preparación quimio-mecánica (PQM) incorpora la irrigación como un paso para el logro de los objetivos clínicos del tratamiento. Este proceso se define como el lavado y aspiración de todos los restos y sustancias preexistentes o generadas en la instrumentación (Marchesan y cols. 2007) y debe cumplir con ciertos objetivos que se describen a continuación (Tabla N°1) (Basrani y Haapasalo 2012).

Tabla N°1: Objetivos de la irrigación endodóntica (Basrani y Haapasalo 2012)

| Biológicos | Químicos y Mecánicos |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> ➤ Disminuir microorganismos anaerobios y facultativos en estado libre y en biofilm. ➤ Inactivar endotoxinas. ➤ No causar daños a los tejidos periapicales o reacciones alérgicas en el individuo. | <ul style="list-style-type: none"> ➤ Diluir y eliminar detritus. ➤ Lubricar el canal radicular. ➤ Prevenir la formación de barro dentinario, o disolverlo si se ha formado. |

Así, se describen una serie de características que idealmente un irrigante debiera tener (Tabla N°2). Sin embargo, no existe un irrigante que cumpla con

todos los requisitos, por lo que se hace necesario el uso de dos o más irrigantes en una secuencia durante el tratamiento endodóntico (Haapasalo y cols. 2014).

Tabla N°2: Características ideales de un irrigante endodóntico (Basrani y Haapasalo 2012; Haapasalo y cols. 2014)

| |
|--|
| Poseer efecto germicida y fungicida en estado planctónico y en biofilm. |
| Favorecer el desprendimiento del biofilm. |
| Ser estable en solución. |
| Tener prolongado efecto antimicrobiano y sostenido efecto antibacteriano después de su uso. |
| Ser activo en presencia de sangre, suero y proteínas derivadas de los tejidos. |
| Ser capaz de eliminar por completo el barro dentinario. |
| Tener baja tensión superficial. |
| Ser capaz de penetrar y desinfectar canales periféricos. |
| No teñir la estructura dentaria. |
| Ser inactivo en un medio de cultivo. |
| No irritar tejidos periapicales ni interferir en su reparación. |
| No inducir una respuesta inmune mediada por células. No ser antigénico, tóxico ni carcinogénico para los tejidos que rodean al diente. |
| No presentar efectos adversos en las propiedades físicas de la dentina. |
| No tener efecto adverso en la capacidad de sellado de los materiales de relleno. |
| Ser de fácil uso y bajo costo. |

La interacción de distintas soluciones irrigantes o de éstas con soluciones, geles o pastas utilizadas como medicación intracanal pueden generar subproductos que pudieran ir en desmedro de los objetivos previamente planteados al formar precipitados que ocluyen túbulos dentinarios, interfiriendo con la desinfección o sellado de éstos y en algunos casos podrían ser tóxicos para los tejidos periapicales. Por esta razón, se ha propuesto la utilización de irrigantes intermedios entre los irrigantes principales que eviten interacciones y la formación de estos precipitados (Basrani y cols. 2007; Gasic y cols. 2012).

1.2. SOLUCIONES IRRIGANTES

Son medios químicos esenciales en la preparación mecánica, durante y después de la instrumentación, ayudando a obtener un SCR libre de tejido pulpar, detritus dentinario, bacterias y sus subproductos, permitiendo un ambiente favorable para una obturación ideal de los canales radiculares para lograr el éxito clínico (Gatewood 2007).

Se han utilizado diversas soluciones irrigantes durante la terapia endodóntica. A continuación, se describen las soluciones más utilizadas actualmente.

1.2.1. HIPOCLORITO DE SODIO

El hipoclorito de sodio (NaClO) es la solución irrigante más utilizada y cumple con varias de las características ideales, siendo las más importantes su capacidad de degradar tejido orgánico, su amplio espectro antimicrobiano y su capacidad de remover biofilm (Haapasalo y cols. 2014). Estas características de acción se fundamentan en su equilibrio químico en solución acuosa (Figura N°1), donde forma hidróxido de sodio y ácido hipocloroso (Estrela y cols. 2002). La presencia de hidróxido de sodio y ácido hipocloroso permite reacciones con aminoácidos y ácidos grasos.

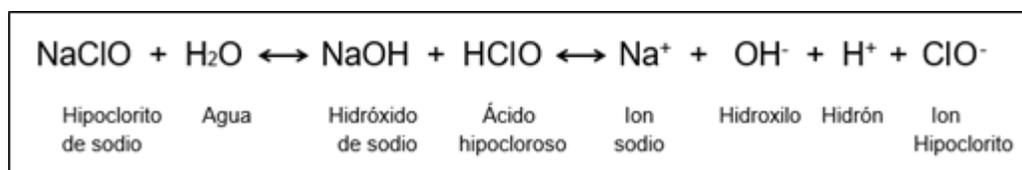


Figura N°1: Equilibrio químico del hipoclorito de sodio en agua (Pecora y cols. 1999)

Una de estas reacciones es la saponificación (Figura N°2), donde el hidróxido de sodio, producto de la disociación de hipoclorito en solución acuosa, degrada grasas en sales de ácidos grasos o jabón y glicerol, actuando como un solvente orgánico y reduciendo la tensión superficial de la solución remanente. De esta manera altera las membranas citoplasmáticas, degradando fosfolípidos o ácidos grasos insaturados presentes en ellas, ayudando con el proceso de disolución de tejido orgánico (Estrela y cols. 2002; Kandaswamy y Venkateshbabu 2010).

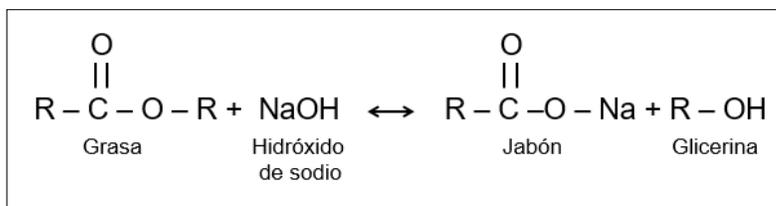


Figura N°2: Reacción de Saponificación (Estrela y cols. 2002)

La segunda reacción es la neutralización (Figura N°3), donde el hidróxido de sodio neutraliza aminoácidos formando sales sódicas y agua, produciendo una reducción del pH e inactivando irreversiblemente enzimas bacterianas (Estrela y cols. 2002).

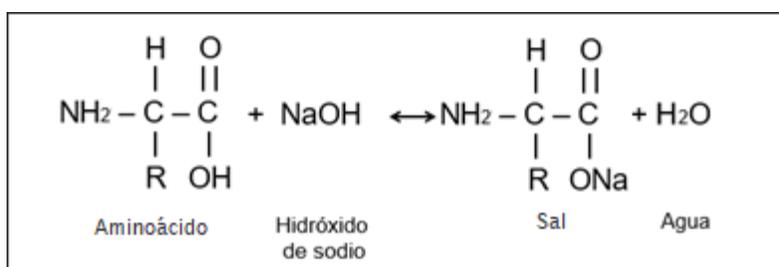


Figura N°3: Reacción de Neutralización (Estrela y cols. 2002)

Otro mecanismo de acción es el efecto del ácido hipocloroso sobre el grupo amino de un aminoácido, formando cloraminas (Figura N°4). Este proceso de cloraminación interfiere en el metabolismo celular bacteriano, inhibiendo las enzimas básicas para su supervivencia. Por ejemplo, en enzimas que presentan el aminoácido cisteína, actúan sobre su grupo sulfhidrilo, oxidándolo irreversiblemente (Estrela y cols. 2002; Kandaswamy y Venkateshbabu 2010). Los aminoácidos participantes de este proceso vienen de la ruptura de los enlaces peptídicos presentes en proteínas del tejido pulpar o del pus que reaccionaron inicialmente con NaClO (Mohammadi 2008).

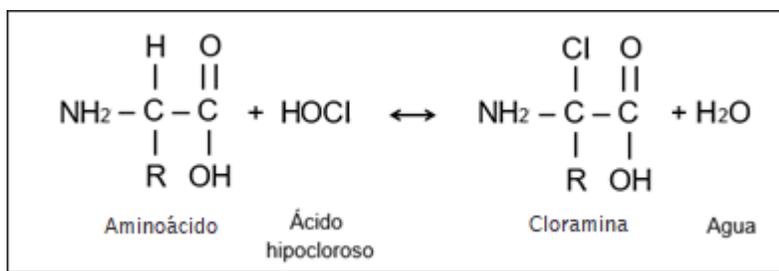


Figura N°4: Reacción de Cloraminación (Estrela y cols. 2002)

La concentración de NaClO utilizada en la práctica endodóntica varía entre 0,5 a 6%, pues no existe un consenso respecto a cuál es la concentración óptima para utilizarlo (Gernhardt y cols. 2004). La concentración es proporcional a la citotoxicidad tanto de células bacterianas como humanas, siendo especialmente efectivo y eficiente ante cepas asociadas a infecciones persistentes como *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans* (Siqueira y cols. 2000; Radcliffe y cols. 2004; Du y cols. 2014). Una solución de NaClO de 0,5% requiere de al menos 30 minutos para inhibir el crecimiento bacteriano *in vitro*, mientras que una solución al 5,25% es capaz de eliminar microorganismos *in vitro* en pocos segundos (Gomes y cols. 2001; Vianna y cols. 2004; Tirali y cols. 2009).

Por estos mecanismos, el NaClO es capaz de degradar tejido orgánico, desde remanentes de tejido pulpar vital o necrótico y también el componente orgánico del barro dentinario. El barro dentinario corresponde a la capa de 2 a 5 μm de grosor generada durante el corte mecánico de la dentina de las paredes de los canales radiculares, que incluye remanentes de procesos odontoblásticos, proteínas coaguladas, tejido pulpar, células sanguíneas, bacterias y hongos. Sin embargo, el NaClO requiere de un irrigante coadyuvante para poder lograr la eliminación del componente inorgánico de éste, cuya persistencia podría comprometer el resultado del tratamiento endodóntico al impedir la penetración de la medicación intracanal o del cemento sellador en los túbulos dentinarios (Kandaswamy y Venkateshbabu 2010; Violich y Chandler 2010; Haapasalo y cols. 2014).

1.2.2. ÁCIDO ETILENDIAMINOTETRAACÉTICO

El ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) es un ácido poliprótico, cuya sal disódica actúa como un agente quelante al formar complejos mediante enlaces covalentes coordinados a iones metálicos divalentes de compuestos inorgánicos, como ocurre con los iones calcio del barro dentinario y la estructura dentaria (Craig y Nyholm 1964; Rossi-Fedele y cols. 2012). Para que esto sea posible este ácido debe utilizarse posterior al uso de un agente proteolítico como el NaClO, el que expone el componente inorgánico del barro dentinario para poder eliminarlo y permitir el acceso tanto de la medicación intracanal como de cementos selladores a los túbulos dentinarios (Haapasalo y cols. 2014).

Además, se utiliza para facilitar el acceso y conformación instrumental en canales atrésicos al reducir la microdureza de la dentina (Cruz-Filho y cols. 2011; Patil y Uppin 2011). Si bien su efecto quelante es autolimitante por la acidificación del pH de la solución al formar el complejo estable con el ion calcio, se recomienda la administración de 1 ml durante 1 minuto para no debilitar la estructura dentinaria, en concentraciones entre 10 a 17% (Hülsmann y cols. 2003; Khedmat y Shokouhinejad 2008).

Se ha descrito también un leve efecto antifúngico y bacteriostático al debilitar la superficie de sus membranas, conduciendo a la muerte celular en combinación con otro antibacteriano que actúe sobre la membrana celular (Haapasalo y cols. 2014).

1.2.3. ÁCIDO CÍTRICO

El ácido cítrico (AC) cuya fórmula IUPAC es ácido 2-hidroxiopropano-1,2,3-tricarboxílico o $C_6H_8O_7$ (Figura N°5), es un ácido orgánico que está presente en varias frutas. Es obtenido industrialmente a través de la fermentación fúngica de glucosa o sacarosa a partir de cepas principalmente de *Aspergillus niger*. Es utilizado en la industria alimentaria como conservante y acidulante, en la industria farmacéutica por sus capacidades antioxidantes y en la industria biomédica como anticoagulante y un posible quelante alternativo en casos de intoxicación por metales pesados (Flora y cols. 2003; Ke y cols. 2009; Dhillon y cols. 2011; Angumeenal y Venkappayya 2013; National Center for Biotechnology Information (NCBI) 2018).

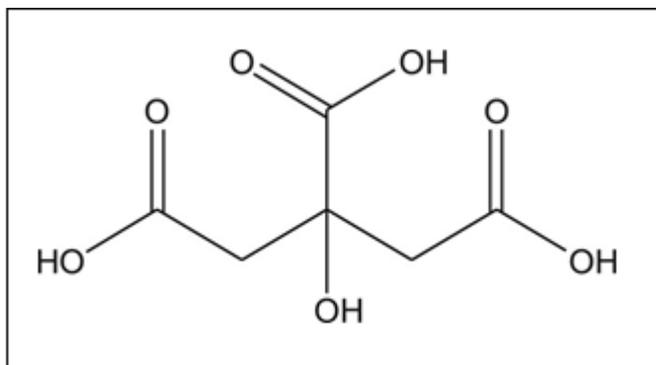


Figura N°5: Estructura química del ácido cítrico (National Center for Biotechnology Information (NCBI) 2018)

Desde el año 1957 se ha sugerido el uso de agentes quelantes como irrigantes durante el tratamiento endodóntico, principalmente EDTA, para permitir la eliminación de la fase inorgánica del barro dentinario y por lo tanto lograr la permeabilidad de los túbulos dentinarios. En 1975 Arnold Loel sugiere el uso del ácido cítrico por primera vez obteniendo resultados comparables al EDTA, por lo que se propone como el reemplazante ideal en caso de no contar con este último (Carlin 1957; Ötsby 1957; Loel 1975; Wayman y cols. 1979).

Si bien el AC cumple una función similar al eliminar la porción inorgánica del barro dentinario y su efecto desmineralizante es equivalente al del EDTA, estudios *in vitro* han demostrado que tiende a ser más biocompatible ya que se ha visto mayor viabilidad celular sin alteraciones en la proliferación de éstas en cultivos de fibroblastos y macrófagos al estar en contacto con este compuesto (Amaral y cols. 2007; Khedmat y Shokouhinejad 2008; Scelza y cols. 2010; Cruz-Filho y cols. 2011; Prado y cols. 2011). De la misma manera, en estudios *in vivo* se ha observado una respuesta inflamatoria menor del tejido óseo mandibular en contacto con AC, con una menor cantidad de infiltrado inflamatorio y permeabilidad vascular comparado con la reacción inflamatoria de este tejido al estar en contacto con EDTA (Malheiros y cols. 2005; Scelza y cols. 2010). El AC al entrar en contacto con los tejidos orgánicos produciría a nivel de los macrófagos una menor activación de la enzima Óxido Nítrico sintetasa inducible, encargada de producir óxido nítrico que activa la producción de citoquinas proinflamatorias e induce la diferenciación de osteoclastos. Además el AC es una molécula esencial en el metabolismo celular y posee un bajo peso molecular (Krebs 1970; Gyurko y cols. 2005; Do Nascimento y cols. 2006; Pappen y cols. 2009; Kandaswamy y Venkateshbabu 2010).

Se ha descrito también acción antibacteriana del AC ante cepas como *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*, aunque no es efectiva ante biofilms de *Enterococcus faecalis* (Krause y cols. 2007; Nagoba y cols. 2008; Arias-Moliz y cols. 2009; Mortenson y cols. 2012; Nakamura y cols. 2013).

En relación a las concentraciones del AC utilizadas en endodoncia, a pesar de no existir diferencias significativas entre distintas concentraciones y su tiempo de exposición respecto a la resistencia a la fractura de raíces tratadas endodónticamente, la concentración ideal de este ácido es una solución al 10% por su menor citotoxicidad y menor efecto proinflamatorio, ya que a partir de concentraciones iguales o superiores a 15% se ha observado menor viabilidad celular en estudios *in vitro* (Navarro-Escobar y cols. 2010; Scelza y cols. 2010; Prado y cols. 2013; Arslan, Barutçigil, y cols. 2014).

1.3. MEDICACIÓN INTRACANAL

La medicación intracanal corresponde a la administración local de un fármaco con buena biocompatibilidad al interior del SCR para ejercer un efecto antimicrobiano y mantener la asepsia entre una sesión y otra, y que permita posteriormente la obturación del canal radicular (OCR) (Kawashima y cols. 2009). Sus objetivos son eliminar bacterias que pueden persistir después de la instrumentación, neutralizar residuos tóxicos y antigénicos remanentes, reducir la inflamación de los tejidos periapicales, disminuir los exudados persistentes en la zona apical y actuar como barrera contra la filtración de la obturación temporal. Su uso está indicado en el tratamiento de dientes infectados o necropulpectomías (Gatewood 2007).

Existe una gran variedad de antisépticos utilizados como medicamentos intracanaliculares, incluyendo compuestos fenólicos, aldehídos, compuestos halogenados, antibióticos, gluconato de clorhexidina e hidróxido de calcio; los más usados hoy en día corresponden a los dos últimos mencionados anteriormente que presentan mejor actividad antibacteriana, mejor biocompatibilidad y estabilidad bioquímica (Walton y cols. 2003; Law y Messer 2004).

1.3.1. DIGLUCONATO DE CLORHEXIDINA

La clorhexidina (CHX) es una biguanida catiónica sintética (Figura N°6), que posee dos anillos simétricos de 4-clorfenil y dos grupos biguanídinos conectados por una cadena hexametileno central (Kandaswamy y Venkateshbabu 2010).

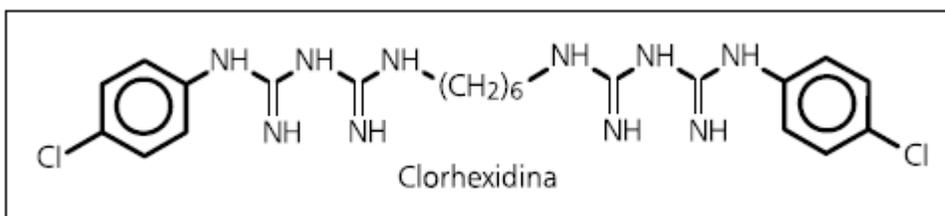


Figura N°6: Estructura química de la CHX (Diomedí y cols. 2017)

Su carga positiva le da características lipofílicas, interactuando así con las cargas negativas de lipopolisacáridos y fosfolípidos de la pared celular bacteriana, aumentando la permeabilidad de ésta al alterar el equilibrio osmótico permitiendo el ingreso de la molécula al interior de la bacteria. Como actúa a nivel de la pared bacteriana, actúa sobre bacterias Gram positivas, Gram negativas e incluso hongos como *Candida albicans* (Bernardi y Teixeira 2015). Además, es esta misma carga la que le da la propiedad de sustantividad, es decir que su efecto perdura luego de su aplicación al unirse a la estructura dentaria, retardando la colonización bacteriana. La duración del efecto depende de la cantidad de moléculas disponibles para interactuar con la dentina y se ha descrito una sustantividad que va desde 12 horas en boca hasta 12 semanas colocada en el interior del SCR (Rosenthal y cols. 2004; Paquette y cols. 2007; Mohammadi y Abbott 2009).

En el ámbito odontológico, se ha utilizado digluconato de clorhexidina en concentraciones que varían entre 0,1 al 2% para controlar el biofilm oral, para la prevención de caries y en endodoncia como solución irrigante y medicación intracanal. A bajas concentraciones (desde 0,2%) la CHX ejerce un efecto bacteriostático, al permitir la salida de sustancias de bajo peso molecular a través de la membrana celular como fósforo y potasio. A altas concentraciones (desde 2%) su efecto es bactericida, provocando la precipitación del contenido citoplasmático (Kandaswamy y Venkateshbabu 2010). Su acción bactericida será inmediata si el vehículo en el que está la CHX al 2% es acuoso, pero si es un gel su acción tardará alrededor de 45 minutos (Wang y cols. 2007). Sin embargo, pese a que su efecto bactericida es tan efectivo como el del NaClO, no disuelve tejido orgánico por lo que no puede ser utilizada como única solución irrigante y se

ocupa como irrigación complementaria o como medicación intracanal (Davis y cols. 2007; Gatewood 2007).

1.3.2. HIDRÓXIDO DE CALCIO

El hidróxido de calcio (Ca(OH)_2) se usa en la práctica endodóntica tanto en la OCR siendo un componente de algunos cementos selladores, para terapias de recubrimiento pulpar y como medicación intracanal dadas sus propiedades antisépticas, bactericidas a nivel local y su capacidad de inducir aposición de tejido calcificado (Mohammadi y Dummer 2011). Además, tiene la capacidad de controlar exudados inflamatorios, presenta biocompatibilidad y es estable en el tiempo (Kawashima y cols. 2009).

Sin embargo, sus propiedades antisépticas no son tan efectivas en comparación con otras sustancias, siendo la CHX 2% más efectiva contra cepas resistentes como *E. faecalis* y *C. albicans*. Aunque se ha propuesto la mezcla entre Ca(OH)_2 y CHX, esto no mejora las propiedades antibacterianas del hidróxido de calcio (Ferreira y cols. 2015).

1.4. INTERACCIONES ENTRE IRRIGANTES

Se han sugerido diversos protocolos de irrigación para conseguir los objetivos clínicos de la PQM. Uno de ellos propone la utilización de NaClO para disolver el tejido orgánico, EDTA para eliminar la porción inorgánica del barro dentinario y el uso de CHX para aumentar el espectro antimicrobiano y otorgar sustentividad durante el tratamiento (Haapasalo y cols. 2010).

Sin embargo, la solución irrigante que se utiliza primero no puede ser eliminada por completo antes de aplicar la siguiente solución en el SCR dada su complejidad y variaciones anatómicas. Por lo tanto los irrigantes entran en contacto dentro del canal y pueden reaccionar formando subproductos que interfieren entre los materiales de medicación u obturación y la superficie dentinaria, comprometiendo la desinfección y el sellado óptimo del SCR (Basrani y cols. 2007; Bui y cols. 2008).

La interacción entre NaClO y CHX genera un precipitado anaranjado-marrón (Figura N°7), producto de una reacción ácido-base. La CHX actúa como

ácido dicatiónico y el NaClO como base alcalina. Este precipitado es neutro e insoluble y se le ha asociado con paracloroanilina (PCA), 1-amina-4-cloro-benceno o *p*-cloroanilina, aunque la composición química precisa no está establecida (Basrani y cols. 2007; Marchesan y cols. 2007; Haapasalo y cols. 2014).

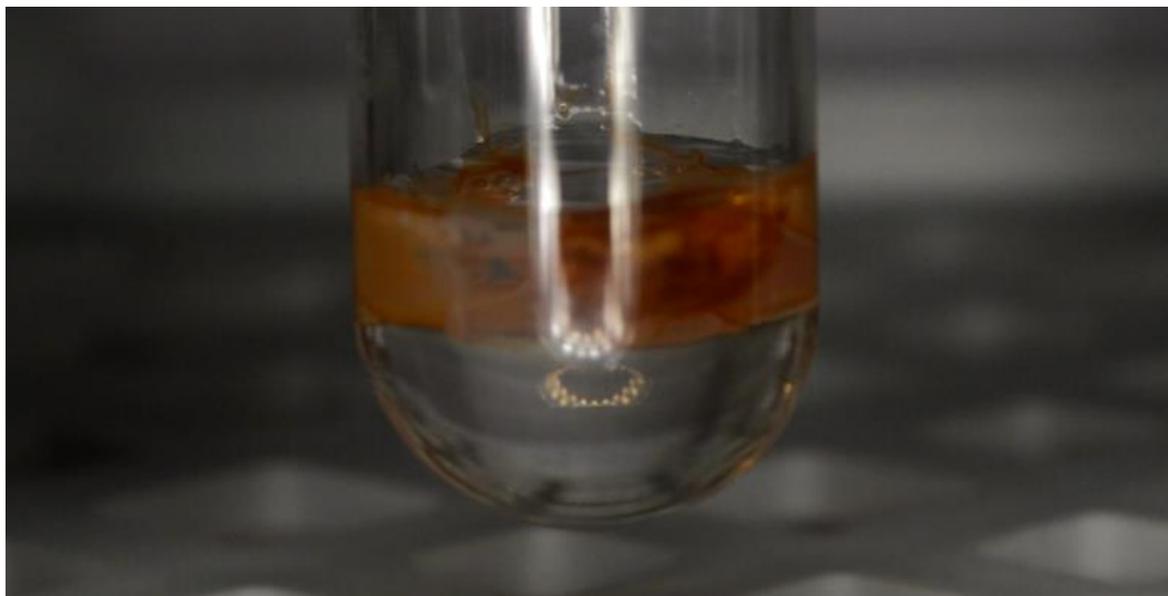


Figura N°7: Imagen del precipitado producto de la interacción entre NaClO y CHX.

Si bien la presencia de NaClO permite la formación de PCA en forma proporcional a la concentración de NaClO, se ha descrito que la CHX, en presencia de calor, luz y un ambiente alcalino, se hidroliza y forma PCA, por lo que no se recomienda su uso con ultrasonido donde se alcanzan temperaturas sobre los 45°C (Bui y cols. 2008). También se ha descrito la formación de PCA en soluciones de CHX 2% almacenadas por 7 días en condiciones de humedad relativa del 95% y a 36,5°C (Barbin y cols. 2013).

Se ha descrito que la PCA al estar en contacto directo con la piel, al ser inhalada o al ser digerida tiene efectos tóxicos relacionados con la formación de enlaces covalentes con hemoglobina y proteínas del hígado y riñones, generando problemas en el transporte de gases a través de la sangre e incluso produciendo anoxia (World Health Organization 2003). En pruebas toxicológicas en animales, la exposición repetida a esta sustancia produce cianosis y metahemoglobinemia como primeros síntomas, para después manifestar cambios en los parámetros hematológicos, hepáticos, esplenomegalia y hemosiderosis en el bazo, hígado y

riñones, acompañada de hematopoyesis extramedular causada por una hemólisis excesiva inducida por la PCA. Considerando todo esto, es que el nivel máximo tolerable de exposición humana del compuesto es de 2 µg/kg de peso/día (Basrani y cols. 2010).

Existe evidencia de que la PCA es carcinogénica para animales, los que al estar expuestos a este compuesto generan tumores infrecuentes (fibrosarcomas y osteosarcomas) (Ward y cols. 1980; Chhabra y cols. 1991). En humanos se han reportado intoxicaciones durante el proceso de producción de químicos para la agricultura, en la fabricación de pigmentos y colorantes para textiles, cosméticos y productos farmacéuticos. La Organización Mundial de la Salud y la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer la incluyen en la lista de sustancias 2B como potencial carcinogénico (International Agency for Research on Cancer 1993).

A nivel endodóntico la PCA precipita y oblitera los túbulos dentinarios, donde además se adhiere a las paredes del canal dificultando su eliminación e interfiriendo con la medicación intracanal y la penetración del cemento sellador (Bui y cols. 2008; Akisue y cols. 2010; Kim 2012). Sin embargo, no existen estudios que demuestren sus efectos potencialmente dañinos a nivel local y sistémico (Haapasalo y cols. 2014). Algunos estudios han determinado y cuantificado la presencia de este compuesto, que posiblemente contiene PCA y se ha visto que la formación de precipitado está en directa relación con la cantidad de NaClO residual y la capacidad de distintos irrigantes intermedios para optimizar la remoción de NaClO previo a la irrigación o medicación con CHX 2% (Riquelme y cols. 2016; Alegre y cols. 2017; Quiroz y cols. 2017; Yévenes y cols. 2017).

Por lo tanto, para evitar la formación de estos subproductos, el irrigante principal debe ser eliminado por completo o ser reducido a la mínima concentración de modo que no interactúe para formar subproductos. Para ello, se ha sugerido el uso de irrigantes intermedios (Haapasalo y cols. 2010).

1.5. SOLUCIONES UTILIZADAS COMO IRRIGANTES INTERMEDIOS

Corresponden a soluciones que se ocupan entre las soluciones irrigantes principales o previo a la medicación intracanal con el objetivo de lavar, diluir o

remover el irrigante residual del SCR y evitar las interacciones entre ellos. Se han propuesto varias soluciones como agua destilada estéril, suero fisiológico (NaCl 0,9%), peróxido de hidrógeno, peróxido de urea y compuestos yodados, de los cuales ninguno tiene capacidad de disolver tejidos y sólo el último posee acción antibacteriana (Haapasalo y cols. 2010).

Si bien el NaCl 0,9% como irrigante intermedio es usado ampliamente para bajar la concentración de NaClO, no elimina por completo su presencia en el SCR al igual que el uso de agua destilada (Riquelme y cols. 2016; Alegre y cols. 2017).

El uso de soluciones quelantes como irrigantes intermedios han mostrado *in vitro* resultados favorables en relación a evitar la formación de PCA (Fuenzalida y cols. 2017). El EDTA y el ácido cítrico (AC), al interactuar con NaClO producen una reacción exotérmica que genera gas cloro (Cl_2), disminuyendo el ion cloro disponible para formar el precipitado con CHX, siendo el AC más eficiente que el EDTA para captar el ion cloruro (Baumgartner e Ibay 1987; Rossi-Fedele y cols. 2012). Además, AC no genera ningún tipo de precipitado al interactuar con CHX a diferencia del EDTA, el cual forma un precipitado blanco lechoso producto de una reacción ácido-base (Mortenson y cols. 2012; Prado y cols. 2013).

En la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile se utiliza un protocolo de irrigación endodóntica que incluye NaClO al 5,25% como irrigante principal, y en algunas situaciones terapéuticas utiliza CHX 2% como medicación intracanal, utilizando NaCl 0,9% como irrigante intermedio previo a la aplicación de la medicación. Sin embargo, estudios recientes han detectado la presencia de PCA y otros precipitados al utilizar este protocolo, por lo que se hace necesario buscar otras alternativas que eviten la formación de estos subproductos que podrían afectar los resultados del tratamiento endodóntico (Bui y cols. 2008; Alegre y cols. 2017).

Se ha estudiado y considerado el uso de soluciones quelantes como una alternativa de irrigante intermedio para evitar la formación del precipitado. Se ha analizado el uso de EDTA y se ha visto que *in vitro* disminuye la formación, pero no la evita completamente (Fuenzalida y cols. 2017). Otra solución quelante que pudiera utilizarse con este propósito es el AC que como ya se ha mencionado, se

utiliza en endodoncia para la remoción del componente inorgánico del barro dentinario (Akisue y cols. 2010; Khadse y cols. 2014). Por lo tanto, el objetivo de este estudio es determinar *ex vivo* el efecto del ácido cítrico al 10% en la formación de PCA al ser utilizado como irrigante intermedio entre NaClO al 5% y la medicación intracanal con CHX 2%.

2. HIPÓTESIS

El uso de ácido cítrico al 10% como irrigante intermedio entre hipoclorito de sodio al 5% y digluconato de clorhexidina al 2% es más efectivo que el suero fisiológico para disminuir la formación de *p*-cloroanilina en modelo *ex vivo*.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

Comparar *ex vivo* la formación de *p*-cloroanilina al utilizar ácido cítrico o suero fisiológico como irrigantes intermedios entre hipoclorito de sodio al 5% y digluconato de clorhexidina al 2%.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar la concentración de hipoclorito de sodio en las etapas previas a la medicación con digluconato de clorhexidina al 2% al utilizar ácido cítrico al 10% o suero fisiológico como irrigantes intermedios.

Determinar la concentración de *p*-cloroanilina formada al utilizar ácido cítrico al 10% o suero fisiológico como irrigantes intermedios entre hipoclorito de sodio al 5% y digluconato de clorhexidina al 2%.

Comparar la formación de *p*-cloroanilina al utilizar ácido cítrico al 10% y suero fisiológico como irrigantes intermedios.

4. METODOLOGÍA

Este estudio es de carácter prospectivo, experimental, descriptivo y comparativo *ex vivo*.

4.1. SELECCIÓN DE MUESTRAS

En el presente estudio se realizó la comparación de la concentración de PCA después de utilizar suero fisiológico como grupo control y ácido cítrico al 10% en el experimental como irrigantes intermedios entre NaClO al 5% y CHX al 2%. En este contexto, la fórmula matemática que permitió calcular el tamaño muestral “*n*” para la comparación de dos medias (SEQC, 2008) fue la siguiente (Figura N°8):

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

Figura N°8: Ecuación de cálculo de tamaño muestral para comparación de dos medias (SEQC, 2008).

z_{α} es el valor z correspondiente al riesgo deseado; z_{β} es el valor z correspondiente a la potencia estadística deseada; s^2 es la varianza de la variable cuantitativa que tiene el grupo control; d es el valor mínimo de la diferencia que se desea detectar.

Para la aplicación de esta fórmula se utilizó el dato de desviación estándar (*s*) del grupo control en un estudio previo donde se determinó el contenido residual de PCA que se produce al utilizar suero fisiológico como irrigante intermedio entre NaClO al 5% y CHX al 2% (Tabla N°3) (Alegre y cols. 2017).

Tabla N°3: Concentración de PCA medida en estudio de Alegre (2017)

| | |
|------------------------|-------------|
| Concentración mínima | 0,00004012% |
| Concentración máxima | 0,0013235% |
| Concentración promedio | 0,0007312% |
| Desviación estándar | 0,0002230 |

Basado en este estudio, también se estableció el valor mínimo de diferencia que se desea detectar (**d**), este valor corresponde a la diferencia entre la concentración promedio y la concentración mínima de PCA, teniendo un valor de 0,00033 en este caso.

Por lo tanto, si se acepta un riesgo de 0,05 ($z_{\alpha} = 1,96$) y una potencia estadística del 90% ($z_{\beta} = 1,282$), se tiene que (Figura N°9):

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

Figura N°9: Cálculo de tamaño muestral (n).

Se corroboró esta medición utilizando el software Calculadora de tamaño muestral GRANMO (Institut Municipal d'Investigació Mèdica (IMIM) 2012), adicionando como dato que se desea una razón del n de 1:2 entre el grupo control y el grupo experimental debido a que en estudios experimentales a medida que las repeticiones aumentan, las estimaciones de las medias observadas se hacen más precisas.

Según el software utilizado, se precisó un $n = 10$ para el grupo control y un $n = 20$ en el grupo experimental para detectar una diferencia igual o superior a 0.00033 (Institut Municipal d'Investigació Mèdica (IMIM) 2012), resultado que se condice con el resultado obtenido previamente en la ecuación de cálculo de tamaño muestral (Figura N°9).

4.2. OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Se seleccionaron 30 dientes humanos permanentes maduros, sanos y unirradiculares extraídos por indicación ortodóncica, y que al análisis radiográfico presentan un calibre del canal radicular medio o amplio en los tercios cervical y medio y calibre medio en el tercio apical, además de una raíz y canal recto o con curvatura leve. Las muestras fueron obtenidas de pacientes cuyo rango etario estuvo comprendido entre los 16 y 30 años.

Las exodoncias de dichos dientes se realizaron en la Clínica Odontológica de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, en la clínica

correspondiente al curso de Cirugía Maxilofacial de cuarto año de la carrera, previo consentimiento informado adscrito al proyecto FIOUCH 13-015 y aprobado por el Comité Ético Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile (N°20140505) firmado por el paciente o apoderado, según correspondiera (**Anexo 4**). El procedimiento se realizó bajo anestesia local con vasoconstrictor y una vez realizada la exodoncia, los dientes fueron limpiados y debridados mecánicamente con curetas para luego ser almacenados en NaCl 0,9% hasta su uso. Se tomaron radiografías a todos los dientes, y se seleccionaron aquellos que cumplían con los criterios anatómicos de inclusión.

4.3. TRATAMIENTO ENDODÓNTICO DE LAS MUESTRAS

Los dientes seleccionados fueron divididos aleatoriamente en dos grupos: un grupo control ($n = 10$) y un grupo experimental ($n = 20$). Al grupo control se les realizó un tratamiento endodóntico según el protocolo clínico de irrigación y medicación de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, detallado en el **Anexo 5**.

Para la aspiración y recolección de las diferentes soluciones producidas durante las fases del tratamiento se utilizó un dispositivo diseñado ad-hoc (Creación del Dr. Mauricio Ruiz Nolf) que se muestra en la Figura N°10 y se describe en el **Anexo 6**.



Figura N°10: Dispositivo toma de muestras Dr. Mauricio Ruiz Nolf

Se recolectaron 13 muestras por cada diente en los siguientes momentos:

1. Después de realizar la comunicación con la cavidad pulpar, permeabilizar el canal radicular y finalizar los desgastes compensatorios, durante la irrigación con 3 ml de NaClO 5%.

2. Al finalizar la preparación de los tercios cervical y medio del canal (flare) con fresas Gates-Glidden, durante la irrigación con 3 ml de NaClO 5%.
3. Al realizar la preparación del tercio apical, se recolecta con cada lima hasta la lima maestra (LM), K #40, durante la irrigación con 3 ml de NaClO 5%.
4. Al realizar el retroceso (Step-Back) hasta unir la instrumentación del tercio apical con la preparación de los tercios cervical y medio, durante la irrigación con 3 ml de NaClO 5%.
5. Irrigación con 1 jeringa de 3 ml. de suero fisiológico (NaCl 0,9%). Se seca después de la recolección con conos de papel.
6. Se repite el paso anterior.
7. Se repite el paso anterior
8. Irrigación con 1 jeringa de 3 ml. de EDTA al 10% por 1 minuto. Se seca después de la recolección con conos de papel.
9. Irrigación con 1 jeringa de 3 ml. de suero fisiológico (NaCl 0,9%). Se seca después de la recolección con conos de papel.
10. Se repite el paso anterior.
11. Se repite el paso anterior
12. Irrigación con 1 jeringa de 3 ml. de CHX 2%. Se seca después de la recolección con conos de papel y se obtura realizando la técnica de doble-sellado (motita de algodón estéril, Fermin® y cemento de vidrio-ionómero de fraguado químico) y se sella el ápice con cera rosada.
13. Posterior a 7 días de ser almacenado el diente en NaCl 0,9% a 37°C, se elimina el doble sellado, se repasan las paredes del canal con LM y se irriga con 3 ml de CHX 2%.

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

A los dientes del grupo experimental se les aplicó el mismo protocolo clínico de irrigación y medicación descrito anteriormente, pero en ellos se sustituyó el suero fisiológico por ácido cítrico al 10% en las Fases 5, 6, 7, 9, 10 y 11, utilizando el mismo volumen que el suero fisiológico, es decir, el equivalente a tres jeringas de irrigación de 3 ml por 30 segundos, cada vez que corresponda según el protocolo.

Para la realización del tratamiento endodóntico se utilizaron los siguientes materiales:

Tabla N°4: Materiales para procedimientos clínicos

- **Turbina, micromotor y contra-ángulo convencionales**

- **Dispositivo para la toma de muestras (Anexo 3)**

- **Piedras de diamante redondas de alta velocidad N°12, N°14.**
SS White Burs, Inc.1145 Towbin Avenue Lakewood, New Jersey 08701, USA.

- **Fresas carbide redondas de baja velocidad N°12 y N°14**
SS White Burs, Inc.1145 Towbin Avenue Lakewood, New Jersey 08701, USA.

- **Fresas Endo Z ® de baja velocidad**
Dentsply-Maillefer, Chemin du Verger 3, 1338 Ballaigues, Suisse.

- **Fresas Gates Glidden N° 1-2-3**
MANI, INC. 743 Nakaakutsu, Takanezawa, Shioya, Tochigi 329-1234, Japan.

- **Jeringas de Irrigación, Monoject ®.**
Covidienlic, 15 Hampshire, Mansfield, MA 02048 USA.

- **Limas tipo Kerr Subserie, 1era Serie Flexofile y 2da Serie, Maillefer®, 25 mm**
Dentsply-Maillefer, Chemin du Verger 3, 1338 Ballaigues, Suisse.

- **Conos de papel estériles**
RITE-DENT MFG, CORP. 3750 East 10 Court Hialeah, Florida 33013, USA.

- **Hipoclorito de Sodio 5%.**
NaCl, Sigma-Aldrich 3050 Spruce St. St. Louis, MO 63103 USA.

- **Clorhexidina Digluconato solución tópica 2%.**
Chlorhexidine Digluconate solution 20% in H₂O, Sigma-Aldrich 3050 Spruce St. St. Louis, MO 63103 USA.

- **EDTA 10%**
EDTA, Merck Millipore, Frankfurter Str. 250, 64293 Darmstadt, Germany.

- **Cloruro de Sodio 0,9%**
J. T. Baker, Mallinckrodt Baker, S.A. de C.V. Xalostoc, 55320, Edo de Mex. Mexico, made in USA printed in Mexico.

- **Ácido cítrico 10%**
Citric acid, Merck Millipore, Frankfurter Str. 250, 64293 Darmstadt, Germany.

- **Cemento provisorio Fermin®**
DETAX GmbH & Co KG, Carl-Zeiss-Str. 476275, Germany.

- **Cemento de Vidrio Ionómero de fraguado químico Chemfil®**
DENTSPLY DeTrey GmbH 78467, Konstanz, Germany.

4.4. PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO

Las muestras recolectadas fueron trasladadas a tubos Eppendorf (1,5 ml), refrigeradas y centrifugadas a 10.000 rpm durante 5 minutos con el fin de precipitar posibles residuos presentes y posteriormente se procedió a su análisis químico.

Se midió la concentración del NaClO desde la fase 1 a la fase 11 y la concentración de PCA fue medida en las fases 12 y 13. Las muestras fueron analizadas mediante espectrofotometría, previo a obtener su espectro de absorción en el rango UV-visible (200-800 nm) y la curva de calibración correspondiente.

Debido a la presencia de un precipitado inespecífico en los tubos Eppendorf de las fases 12 y 13, se procedió a su análisis por espectrometría infrarroja para intentar identificar si correspondía a CHX, AC, PCA o una molécula distinta.

Los materiales utilizados en todos los procedimientos de laboratorio fueron los siguientes:

Tabla N°4: Materiales y reactivos para procedimientos de laboratorio

Todas las soluciones y diluciones usadas en la investigación fueron preparadas en el laboratorio de Química de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

-
- **Tubos Eppendorf 1,5 ml**
Biologix Group Limited, No.2766 Ying Xiu Road, High-Tech Industrial Development Zone Jinan, Shandong 250101 P.R. China.

 - **Micropipetas 100 y 1000 Labopette®**
Hirschmann, Inc., Holloway Road, Suite 104, Bluegrass Industrial Park. Louisville, KY 40299, USA.

 - **Centrífuga Hermle z216 MK.**
HERMLE Labortechnik GmbH., Siemensstr 25 D-78564, Wehingen, Alemania.

 - **Ácido Clorhídrico**
J.T. Baker, Mallinckrodt Baker, S.A. de C.V. Xalostoc, 55320, Edo de Mex. México. Made in USA printed in Mexico

 - **Nitrito de Sodio**
Merck Millipore, Frankfurter Str. 250, 64293 Darmstadt, Alemania.

 - **Sulfamato de Amonio.**
Sigma-Aldrich Chemie GmbH., Munich, Germany

 - **Naftiletindiaminadihidrocloruro.**
Sigma-Aldrich 3050 Spruce St., St. Louis, MO 63103 USA.

 - **Ethanol**
Merck Millipore, Frankfurter Str. 250, 64293 Darmstadt, Alemania.

 - **Espectrofotómetro UNICAM ® UV-530/VIS**
ThermoSpectronic Unicam Ltd., 820 Linden Avenue, Rochester, NY 14625, USA.

 - **Cubetas de cuarzo 1cc.**
Scientech, Inc. 5649 Arapahoe Avenue Boulder, CO 80303-1399, USA.

 - **Espectrómetro de infrarrojos Agilent ® Cary 630**
Aligent Technologies, Inc., 4380 Ziegler Road, MS 23, Fort Collins, CO 80525, USA.

 - **Liofilizador ilshinBioBase © FD8508/8512/8518**
ilShinBioBase Co. Ltd., 1075-1, Sangpaedong, Dongducheonsi, Gyeonggido, South Korea.

4.4.1. Determinación de NaClO

Con los valores de absorbancia de las muestras a un $\lambda_{\text{Máx.}}$ de 292 nm., se determinó la concentración de NaClO en una curva de calibración obtenida con estándares de hipoclorito, cuyos valores de absorbancia son menores a 2.

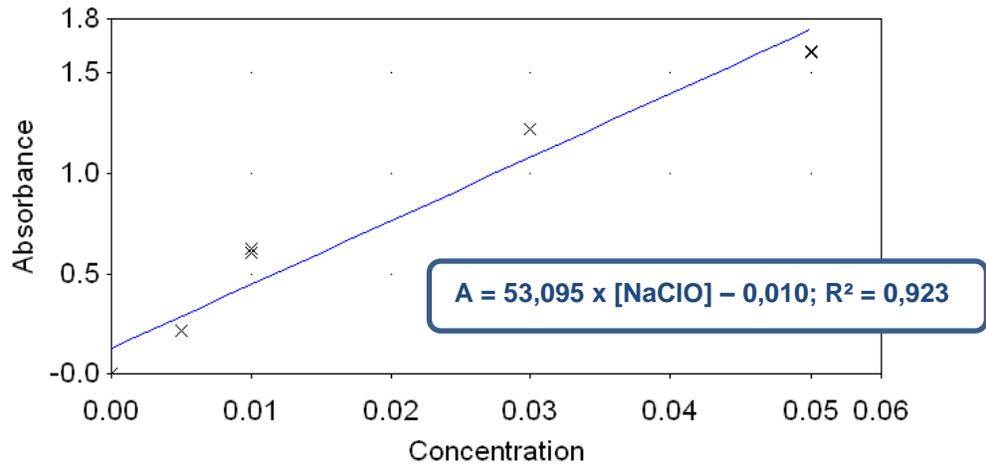


Gráfico N°1: Curva de calibración del NaClO.

[NaClO]: Concentración de NaClO. A: Absorbancia.

En aquellos casos donde la absorbancia de la solución fuese mayor al rango que comprendía la curva de calibración, es decir las primeras cuatro muestras, éstas fueron diluidas con agua destilada. En aquellas muestras donde la concentración estaba dentro del rango de la curva de calibración, en las muestras 5 a la 7, no se realizó dilución alguna.

Una vez obtenidos los valores de absorbancia, éstos fueron transformados en concentración mediante la ecuación de la curva de calibración (Figura N°11). Las muestras diluidas fueron multiplicadas según el factor de dilución para conocer la concentración original del irrigante en la muestra.

$$[\text{NaClO}] = \frac{A + 0,010}{53,095}$$

Figura N°11: Ecuación de la curva de calibración.

[NaClO]: Concentración de NaClO. A: Absorbancia

4.4.2. Determinación de PCA

Según el protocolo para la detección de PCA en soluciones de digluconato de clorhexidina descrito por la Farmacopea Europea y modificado por Alegre y cols. (The European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare and Council of Europe 2009; Alegre y cols. 2017), se realizó:

A 1 ml de muestra se agregaron 250 μ L de ácido clorhídrico diluido (73g/L) y se diluyó hasta 2ml. Luego se agregaron 36 μ L de nitrito de sodio (solución 100g/L), 200 μ L de sulfamato de amonio (solución 50g/L), 500 μ L naftil etilendiamina dihidrocloruro (solución 1g/L) y 100 μ L de alcohol (Solución etanol 96%). Finalmente se diluyó hasta 5 ml con agua y se dejó reposar por 30 minutos.

Empleando los valores de absorbancia de las muestras coloreadas a un $\lambda_{\text{Máx.}}$ de 552 nm., se determinó la concentración de PCA. La curva de calibración mostrada en el Gráfico N°2 corresponde a la curva de calibración de PCA obtenida a partir de soluciones estándar de p-cloroanilina con valores de absorbancia menores a 2.

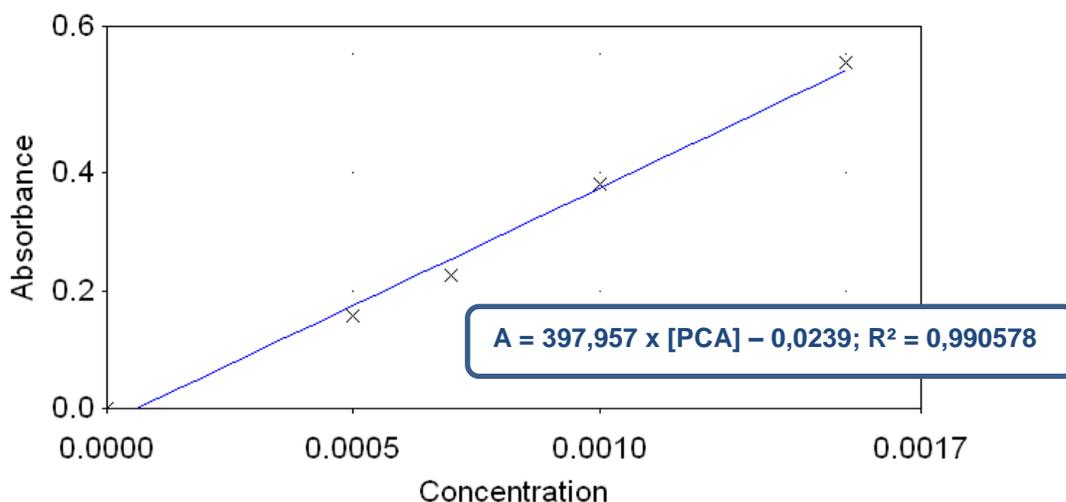


Gráfico N°2: Curva de calibración de PCA.

A: Absorbancia. [PCA]: Concentración de PCA

Los valores de absorbancia fueron reemplazados en la ecuación de la curva (Figura N°12) donde se obtuvo finalmente la concentración de PCA en las fases donde se aplicó la medicación con CHX al 2% (Fase 12 y 13).

$$[PCA] = \frac{A + 0,0239}{397,957}$$

Figura N°12: Ecuación de la curva de calibración de PCA (Reyes, 2015).

A: Absorbancia. [PCA]: Concentración de PCA

4.4.3. Análisis por espectrometría infrarroja

Después del procedimiento se detectó en las paredes de los tubos Eppendorf utilizados en las etapas 12 y 13, correspondientes a la medicación con CHX 2%, un precipitado opaco grisáceo e inespecífico. Se analizó este precipitado, obtenido por la mezcla de CHX 2% y AC 10% en una proporción 1:1, mediante espectrofotometría de infrarrojos por transformada de Fourier de reflexión total atenuada (ATR-FTIR) por transmisión. Se formaron dos fases, una superior de aspecto coloidal y color similar al precipitado encontrado en las paredes de los tubos. La fase inferior corresponde a un líquido translúcido. Ambas fases y muestras de CHX 2% y AC 10% fueron deshidratadas por liofilización para ser analizadas por ATR-FTIR.

Esta metodología analítica permite una estimación de las moléculas presentes en una sustancia desconocida al identificar patrones espectrales de grupos funcionales específicos, según la masa de los átomos involucrados, la fuerza de los enlaces y su carga que influenciarán que tanto se estrechan o deforman los enlaces de los grupos funcionales involucrados.

4.5. ANÁLISIS DE DATOS

Para conocer las diferencias entre las concentraciones medidas de NaClO y PCA en el grupo control y en el grupo experimental, los datos fueron analizados a través del test estadístico Shapiro-Wilk para determinar el tipo de distribución, en el cual se observó que correspondía a una distribución no normal. Por lo anterior, fueron sometidos al test de Mann Whitney para establecer la significancia de las diferencias encontradas utilizando el software estadístico GraphPad Prism v6.01, fijando un intervalo de confianza del 95% aceptando diferencias estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Concentración de NaClO

Utilizando las ecuaciones de las curvas de calibración y valores de absorbancia obtenidos de las muestras se determinó la concentración de NaClO en las etapas previas a la aplicación de EDTA 10% correspondientes a la preparación quimio-mecánica y a las primeras diluciones con irrigante intermedio. A continuación, se muestran los resultados del grupo control con el grupo experimental y la comparación entre ambos.

Concentración de hipoclorito de sodio en fases 1 a 7

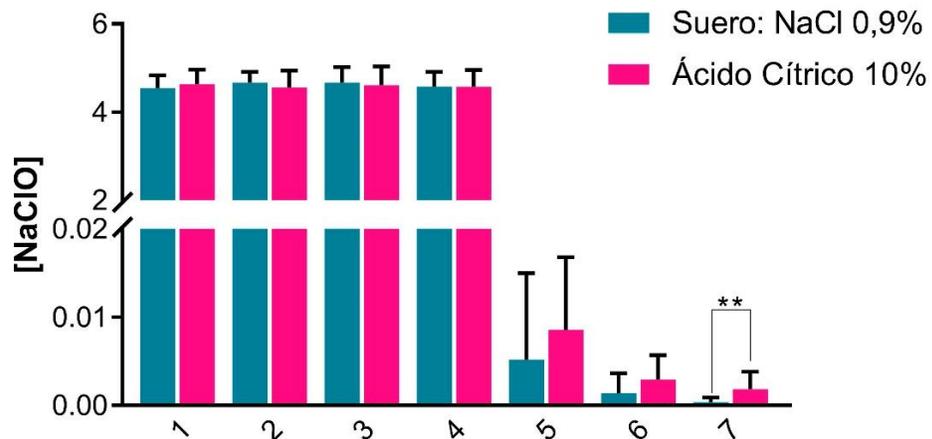


Gráfico N°3: Concentración de hipoclorito de sodio en las fases 1 a 7.

La concentración de NaClO del 5% disminuyó levemente en las primeras 4 etapas de la PQM del canal radicular, pero no existieron diferencias estadísticamente significativas entre estas etapas en el grupo control, ni en el grupo experimental ni al ser comparadas entre sí ($p > 0,05$). Durante las etapas 5, 6 y 7 correspondientes a irrigación intermedia sí se produjo una marcada disminución de la concentración de NaClO residual dentro del canal.

Concentración de hipoclorito de sodio en fases 5 a 7

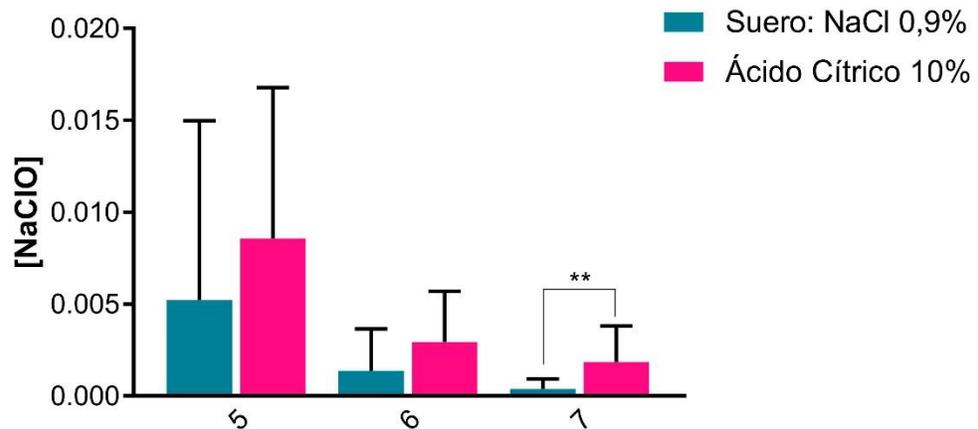


Gráfico N°4: Detalle de la concentración de hipoclorito de sodio en las fases 5, 6 y 7, correspondientes a irrigación intermedia. ** = $p < 0,05$

El gráfico 4 detalla la disminución de NaClO presente en el canal al aplicar cada irrigante intermedio. La concentración de NaClO disminuyó en ambos grupos desde concentraciones de 5% a concentraciones menores a 0,02%. Sin embargo, no existió una diferencia estadísticamente significativa en la disminución de la concentración de NaClO en el grupo experimental en comparación con el grupo control, excepto en la etapa previa a la aplicación de EDTA ($p < 0,05$).

5.2. Concentración de PCA

Utilizando la curva de calibración y la absorbancia obtenida luego de someter las muestras al protocolo de identificación de PCA previamente descrito, la concentración de este compuesto fue determinada en aquellas muestras donde CHX al 2% fue aplicada, tanto en el grupo control (Tabla N°7) como en el grupo experimental (Tabla N°8) y fueron comparadas entre sí para observar la existencia de diferencias estadísticamente significativas (Gráfico N°3).

Concentración de paracloroanilina en fases 12 y 13

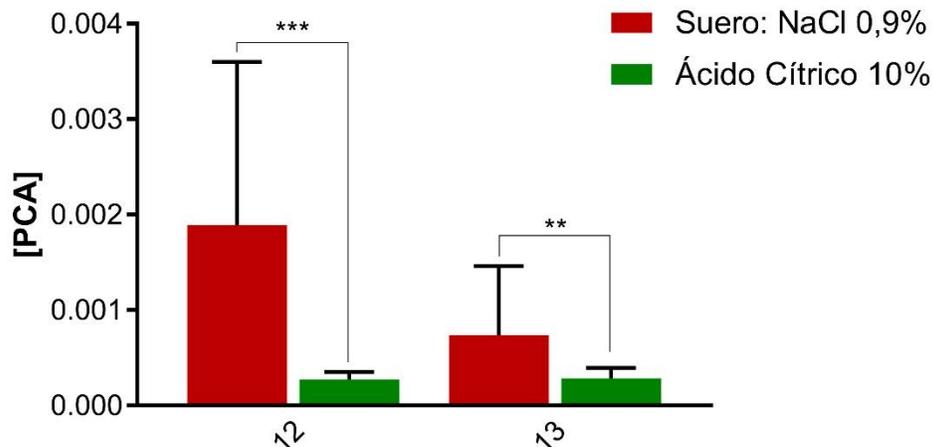


Gráfico N°5: Concentración de paracloroanilina en fases 12 y 13.

*** = $p < 0,001$ ** = $p < 0,005$

Una vez medicado con CHX al 2% se observó la presencia de PCA en ambas fases. Para la primera fase (Fase 12) existe una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo control y el grupo experimental con un $p < 0,001$. En la fase 13 que corresponde a la segunda aplicación de CHX una semana después se observa una diferencia significativa con un $p < 0,005$.

5.3. Análisis en FTIR-ATR

Los espectros de FTIR por transmitancia entre números de onda $4000-400 \text{ cm}^{-1}$ de la fase coloidal AC-CHX, la fase líquida/solución AC-CHX, el ácido cítrico y la clorhexidina se muestran en el gráfico N°6.

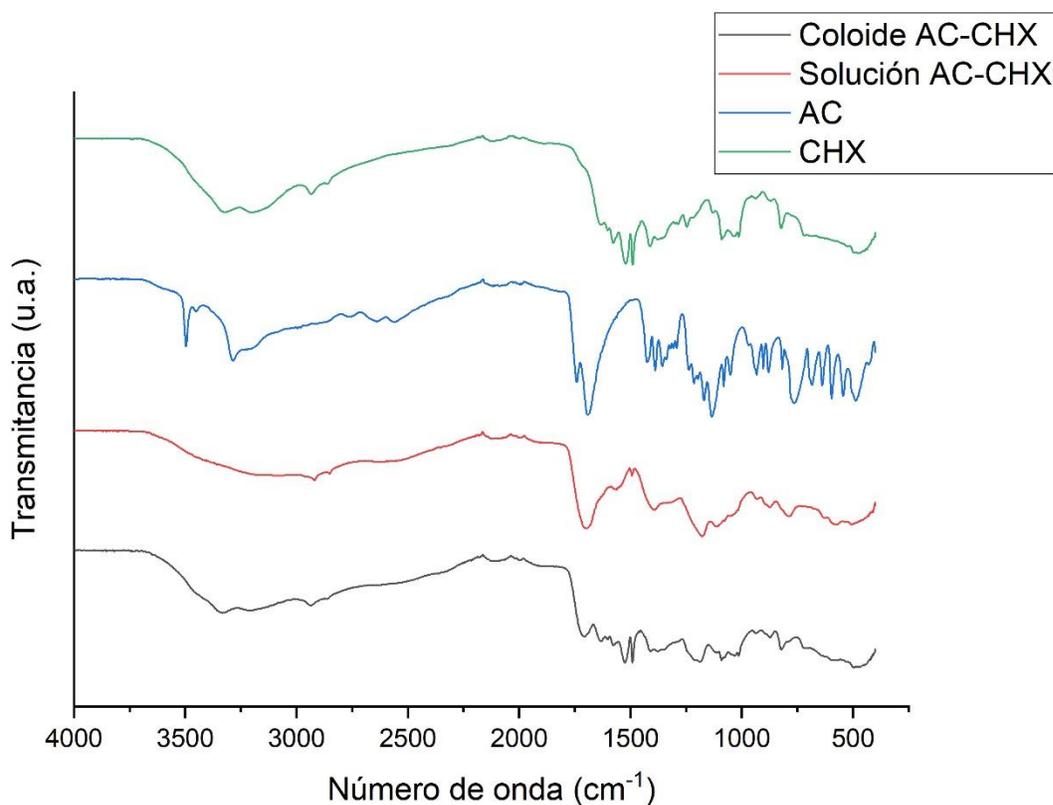


Gráfico N°6: Espectros obtenidos por ATR-FTIR de Clorhexidina (verde), Ácido cítrico (azul) y de fase coloidal (negro) y fase líquida (rojo) formada a partir de la mezcla entre las dos primeras soluciones.

Si bien los espectros de transmitancia tanto del coloide (negro) como de la fase líquida (rojo) son distintas entre sí y sus constituyentes, estas contienen señales de grupos funcionales tanto de CHX (verde) como de AC (azul) con intensidades variables. El coloide (negro) y la fase líquida (rojo) presentan distintas señales de transmitancia indicando que tienen estructuras químicas diferentes; sin embargo, en los espectros se pueden observar bandas vibratorias específicas que dan cuenta de algunos grupos funcionales en común con CHX (verde) y AC (azul), con distintas intensidades entre sí.

La fase coloidal presenta señales correspondientes a grupos aromáticos, grupos iminos, aminos secundarios y a enlace cloroalcano, similares a las encontradas en el espectro de transmitancia de CHX, donde la intensidad de la señal es especialmente menor en lo que corresponde a grupos aromáticos. También existe una señal que evidencia un cambio de una amina secundaria a una primaria o una amida primaria. En cambio, la fase líquida tiene señales de

grupos aminos secundarios, grupos carbonilos y grupos metilenos similares a CHX y a AC.

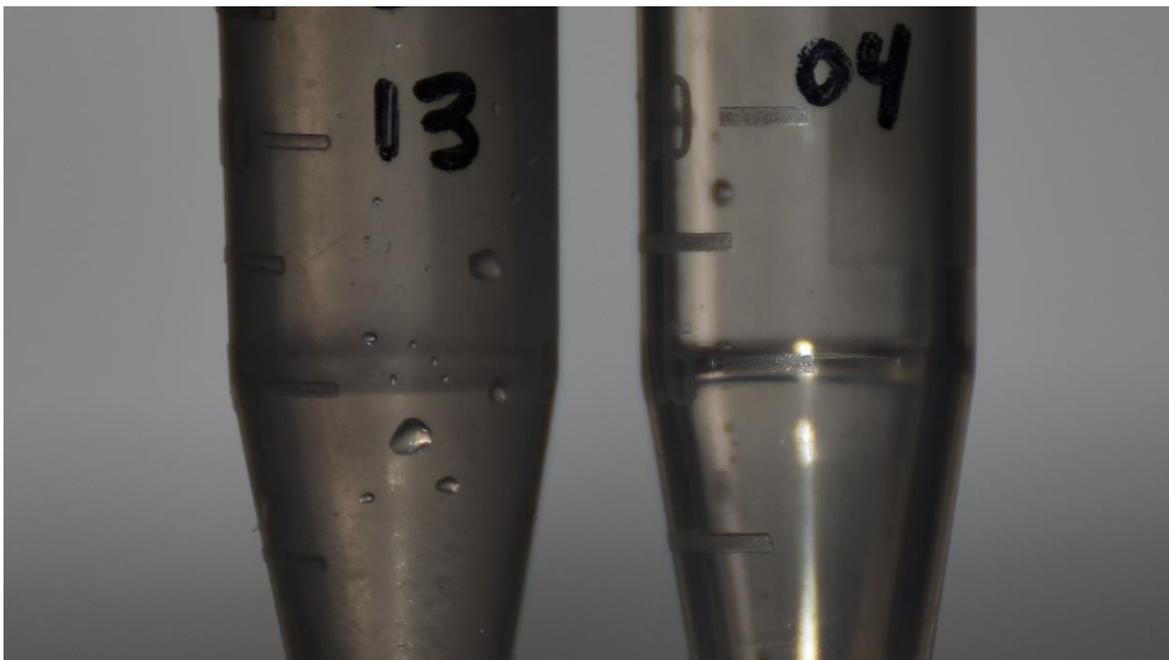


Figura N°13: Diferencia de opacidad entre tubos Eppendorf de fases 13 y 4, que señalan la presencia de un precipitado en las paredes del primero.

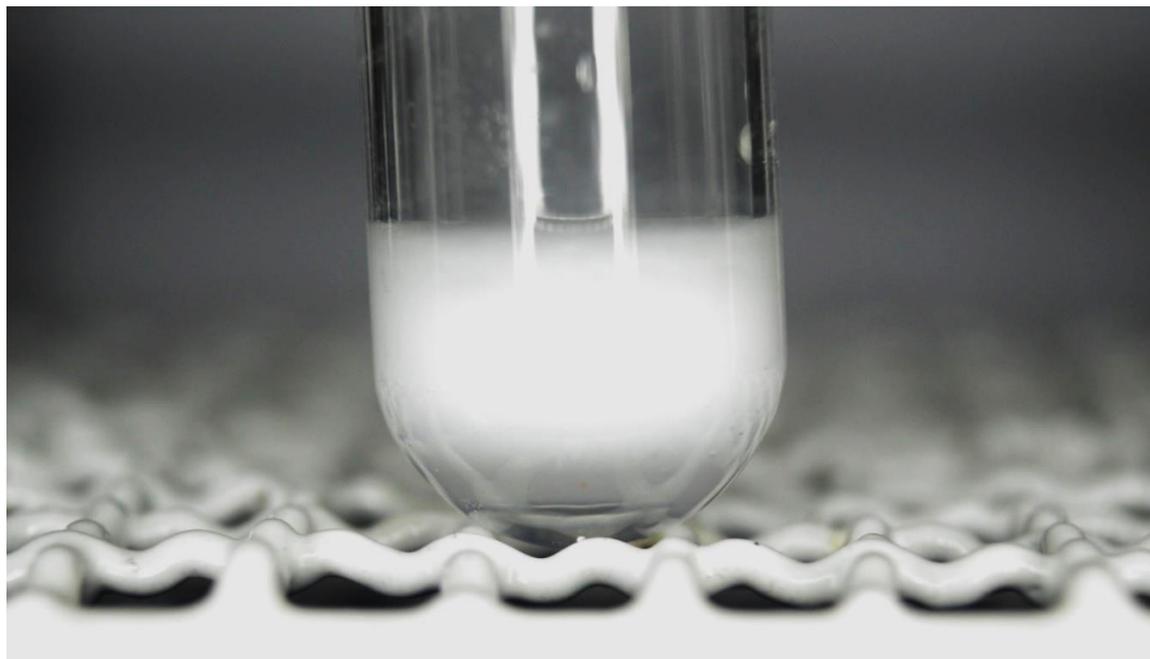


Figura N°14: Imagen del precipitado coloidal y fase líquida de la interacción entre AC y CHX.

6. DISCUSIÓN

La instrumentación y la irrigación son etapas fundamentales del tratamiento endodóntico, por lo que el conocimiento de las características individuales y de los efectos e interacciones de las soluciones químicas utilizadas dentro del SCR es tan importante como sus efectos a nivel de los tejidos periapicales (Kandaswamy y Venkateshbabu 2010; Basrani y Haapasalo 2012; Haapasalo y cols. 2014; Jena y cols. 2015). Los resultados obtenidos en esta investigación sugieren que el uso de ácido cítrico como irrigante intermedio reduce la concentración final de PCA posterior a la medicación con CHX al 2%, si se compara con suero fisiológico, pero no la evita completamente. Esta disminución en la concentración de PCA podría disminuir el riesgo de los efectos tóxicos de la PCA en los tejidos periapicales.

Las características ácidas de las soluciones quelantes utilizadas en odontología, como el ácido cítrico, cambian el equilibrio iónico del ácido hipocloroso proveniente de NaClO, provocando que aumente la cantidad de protones, bajando el pH de la solución e incrementando la cantidad de ion cloruro disponible, que finalmente forma gas cloro (Cl_2) el que es liberado (Christensen y cols. 2008; Rossi-Fedele y cols. 2012; Prado y cols. 2013). La concentración de AC utilizada en este estudio fue al 10% y no al 50% como en estudio de Baumgartner, en el que añadieron una solución de AC al 50% en NaClO al 5,25% y se observó que liberó significativamente más Cl_2 que al usar EDTA al 15% (Baumgartner e Ibay 1987). En nuestro estudio se obtuvo una menor concentración de NaClO en el grupo control a diferencia del grupo experimental con AC, sugiriendo que favorece su acción quelante sobre las paredes del canal, lo que alteraría en menor medida el equilibrio iónico del hipoclorito. Otra explicación es que sustancias originadas por la acción de AC presentes en el SCR pudiesen absorber luz a la misma longitud de onda que NaClO, situación que no se da con el control.

El contacto entre NaClO 5% y CHX 2% forma PCA con una coloración anaranjada muy fuerte. La coloración de este subproducto decrece junto a una mayor dilución en agua del hipoclorito de sodio, influyendo directamente en la formación de PCA (Akisue y cols. 2010; Prado y cols. 2013; Riquelme y cols.

2016). Aún con concentraciones bajas de NaClO, el precipitado anaranjado está presente en forma de solución y no como precipitado que es potencialmente cancerígeno (Basrani y cols. 2007; Marchesan y cols. 2007; Haapasalo y cols. 2014). Otros autores sugieren que el precipitado que se forma no es PCA al ser analizado por espectrometría por resonancia magnética nuclear, sino que puede ser paraclorfenilurea (PCU) o paraclorofenilguanidil-1,6-diguanidilhexano (PCGH) (Thomas y Sem 2010; Nowicki y Sem 2011; Orhan y cols. 2016).

Al analizar las concentraciones de PCA medidas se observa que éstas son mucho mayores en el grupo control, situación ya descrita por Prado y cols. que señalan que AC inhibe la concentración de PCA, a pesar de las lecturas de NaClO en las etapas previas mostraron todo lo contrario. Esta reducción de PCA en presencia de AC fue comprobada por curvas espectrales realizadas a las soluciones de NaClO, AC y la mezcla NaClO/AC. Estas curvas como se pueden ver en la Figura N°15 muestran una desaparición de la señal de NaClO en la mezcla NaClO/AC. Esto también se refuerza por la detección de PCA, que es una espectrometría más específica y la presencia de interferencias es menos probable. Dicho esto, la utilización del irrigante intermedio experimental en este estudio tuvo significativamente menor concentración de este subproducto potencialmente cancerígeno, siendo estos resultados similares a los obtenidos en estudios previos (Mortenson y cols. 2012; Khadse y cols. 2014).

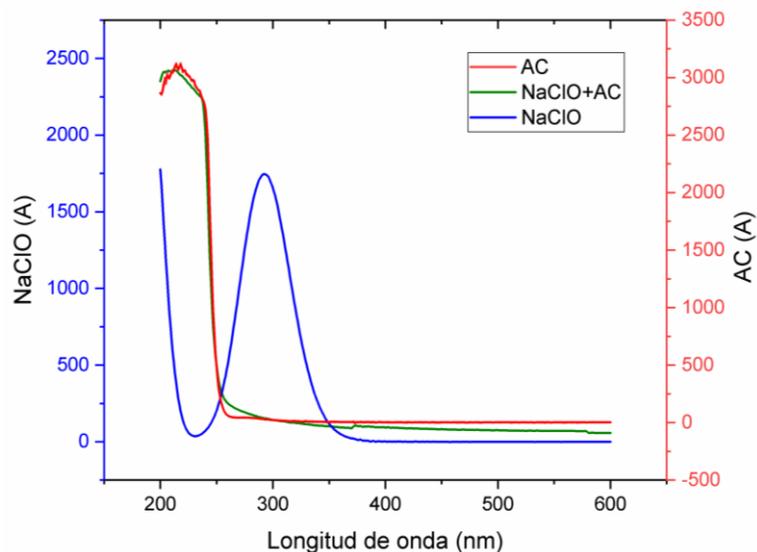


Figura N°15: Curvas espectrales de AC (rojo), NaClO (azul) y mezcla NaClO/AC (verde).

Además, se pudo detectar que la combinación de AC con CHX genera una reacción ácido-base en donde ambas soluciones generan subproductos. Otros estudios describen la reacción entre ambos como una dilución y no se detectaron subproductos (Akisue y cols. 2010; Rossi-Fedele y cols. 2012; Prado y cols. 2013; Arslan, Gok, y cols. 2014). Sin embargo, en nuestro estudio fueron detectados dos subproductos distintos, donde uno de ellos tiene el potencial de interferir en el resultado de tratamiento endodóntico, obliterando los túbulos dentinarios. Esta reacción es de similares características a aquella entre la CHX y el EDTA, en la cual también produce un precipitado blanco, que se compone de CHX y el quelante, sugiriendo que es una sal entre sus estructuras catiónicas y aniónicas respectivamente (Rasimick y cols. 2008; Prado y cols. 2013; Fuenzalida y cols. 2017). La ausencia de este precipitado en estudios anteriores puede deberse a que no presenta un color característico que llame la atención para ser identificado recubriendo las paredes del SCR, además que para formar este precipitado en laboratorio se necesita un régimen de formación lento, y la adición de exceso de AC a la solución rompe el equilibrio químico y se disuelve el precipitado existente.

Con la información entregada por el FTIR-ATR, se puede decir que no existe contaminación de las muestras de CHX y AC, ya que sus curvas son similares a los estándares de la base de datos de espectrometría del Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada de Japón (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology 2016). Se puede además inferir que existe una reacción química entre CHX y AC formándose dos compuestos distintos, que corresponde a una reacción donde la CHX es catalizada por el AC, en la que CHX actúa como catión y el AC como anión citrato. En esta reacción química, uno de sus enlaces imino es reducido, generando así una amina alifática o también podría ser reemplazado por un oxígeno y formarse una amida alifática, correspondiendo al desplazamiento de la señal de número de onda entre 1700 y 1600. Además, se deduce que este compuesto tendría un solo grupo clorfenilo por su señal de transmitancia con menor intensidad.

Por lo anterior, se podría sugerir la estructura química del coloide como paraclorofenilguanidil-1,6-carbamidilurea (Figura N°16), que es una de las impurezas detectadas en la fabricación de CHX por la Farmacopea Europea (The

European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare and Council of Europe 2009). Además, el coloide estaba adherido a las paredes de polipropileno de los tubos Eppendorf y no pudo ser disuelto en agua ni en alcohol, sí en una solución ácida. Esto sugiere que la molécula propiamente tal tiene una polaridad muy baja y se une a través de fuerzas de Van der Waals (Elmendorp y Schoonenberg 1995). Otra opción es que corresponda a otro tipo de molécula que incluya al menos los grupos funcionales paraclorofenil, guanidil y amida en su composición. La fase líquida en solución podría corresponder a una sal de citrato o ácido tricarboxílico, ya que sus señales de transmitancia son similares a AC y corresponderían a la disolución en medio ácido del precipitado antes mencionado.

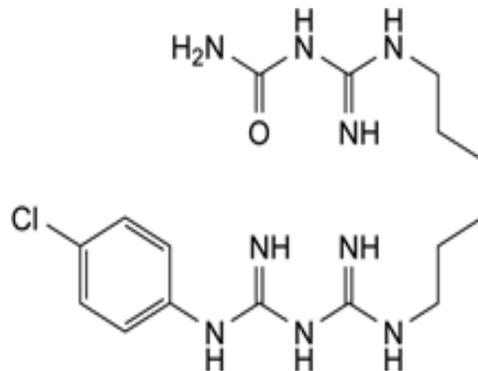


Figura N°16: Estructura química de paraclorofenilguanidil-1,6-carbamidilurea o [[6-[[[(4-clorofenil)carbamimidol]carbamimidol]-amino]hexyl]carbamimidol]urea (The European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare and Council of Europe 2009).

Con todo lo anterior, la diferencia significativa encontrada entre la menor presencia de PCA en el grupo experimental en comparación con el grupo control también podría ser explicada por la mayor formación de este coloide a expensas de PCA, pues este coloide presenta el grupo funcional anilina, evitando así una mayor precipitación de este.

Respecto a los resultados del grupo control, éstos son similares a estudios anteriores que demuestran que la solución salina al 0,9% no logra reducir la completamente concentración de NaClO residual, y no impide la formación de PCA, sino sólo que reduce su precipitación (Krishnamurthy y Sudhakaran 2010; Mortenson y cols. 2012; Riquelme y cols. 2016; Alegre y cols. 2017; Quiroz y cols. 2017).

Si se asume que el volumen intracanal es de 0,1 ml o 100 μ L, y que PCA tiene el potencial de afectar los tejidos periapicales y por ende exponer al cuerpo a este químico potencialmente cancerígeno, y considerando que la dosis máxima tolerable de PCA según la Organización Mundial de la Salud corresponde a 2 μ g/kg de peso/día, entonces podemos decir que el protocolo de irrigación intermedia con AC tiene un nivel de exposición menor a 0,30 μ g y por ende, sin riesgos de exposición a los efectos tóxicos de PCA según la OMS (International Agency for Research on Cancer 1993; Basrani y cols. 2010).

Este estudio, al ser *ex vivo*, presenta limitaciones para proponer la aplicación de este protocolo experimental para uso clínico, al menos hasta que se realicen más estudios de biocompatibilidad y de compatibilidad con los materiales de OCR (Malheiros y cols. 2005; Amaral y cols. 2007; Olmos Fassi y cols. 2009; Navarro-Escobar y cols. 2010).

Otro aspecto a considerar es que el uso de dos sustancias quelantes en un mismo protocolo podría tener un efecto importante en la estructura de las paredes del SCR, ya que la estructura dentinaria interna presenta mayor grado de erosión ácida cuando el contacto con estas sustancias es por más de un minuto (Machado-Silveiro y cols. 2004; Pérez-Heredía y cols. 2008; Reis y cols. 2008; Prado y cols. 2011). Otros autores clasifican el efecto desmineralizante de AC como tiempo-dependiente y pH-dependiente, por lo que se podría esperar que la irrigación con este quelante en varias etapas del tratamiento podría no sólo eliminar el barro dentinario, sino también erosionar la dentina intertubular y peritubular, debilitando la estructura dentinaria y su microdureza (Di Lenarda y cols. 2000; Ayad 2001; Eldeniz y cols. 2005; De-Deus y cols. 2006; Reis y cols. 2008; Cruz-Filho y cols. 2011).

El conocimiento de alternativas adicionales para ser usadas como soluciones irrigantes intermedias que permitan reducir las concentraciones de PCA al mínimo y que no generen otro tipo de precipitados que interfieran con los objetivos del tratamiento endodóntico es de suma importancia clínica, por lo que se sugiere comparar distintas soluciones quelantes con otras soluciones

intermedias alternativas que permitan determinar la solución intermedia ideal entre NaClO y CHX, para posteriormente comprobar su efectividad clínicamente.

Finalmente, el presente trabajo indica que el ácido cítrico al 10% como irrigante intermedio entre hipoclorito de sodio al 5% y digluconato de clorhexidina al 2% no impide la formación de paracloroanilina, pero si reduce su concentración a niveles más que aceptables para evitar los riesgos tóxicos respecto a suero fisiológico. Sin embargo, este resultado se produce a expensas de la formación de un precipitado que requiere estudios adicionales que evalúen su estructura y efectos biológicos a nivel general y local en los tejidos periapicales para poder validar este protocolo clínico.

7. CONCLUSIONES

El uso de ácido cítrico al 10% como irrigante intermedio entre NaClO al 5% y CHX al 2% disminuye la concentración de *p*-cloroanilina de manera más efectiva que el suero fisiológico al 0,9% al momento de la medicación intracanal y 7 días posterior a la misma.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akisue E, Tomita VS, Gavini G, Poli de Figueiredo JA. 2010. Effect of the Combination of Sodium Hypochlorite and Chlorhexidine on Dentinal Permeability and Scanning Electron Microscopy Precipitate Observation. *J Endod.* 36(5):847–850. doi:10.1016/j.joen.2009.11.019.

Alegre O, Yévenes I, Parada J, Maggiolo S, Fernández E, Alegre O, Yévenes I, Parada J, Maggiolo S, Fernández E. 2017. Determination of residual parachloroaniline produced by endodontic treatment after the use of 5% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine combined: an *ex-vivo* study. *Rev clínica periodoncia, Implantol y Rehabil oral.* 10(3):145–148. doi:10.4067/S0719-01072017000300145.

Amaral KF, Rogero MM, Fock RA, Borelli P, Gavini G. 2007. Cytotoxicity analysis of EDTA and citric acid applied on murine resident macrophages culture. *Int Endod J.* 40(5):338–343. doi:10.1111/j.1365-2591.2007.01220.x.

American Association of Endodontists. 2016. *Guide to Clinical Endodontics, Sixth Edition.* Vol. 6. Chicago: American Association of Endodontists. p. 1–40.

Angumeenal AR, Venkappayya D. 2013. An overview of citric acid production. *LWT - Food Sci Technol.* 50(2):367–370. doi:10.1016/j.lwt.2012.05.016.

Arias-Moliz MT, Ferrer-Luque CM, Espigares-García M, Baca P. 2009. *Enterococcus faecalis* Biofilms Eradication by Root Canal Irrigants. *J Endod.* 35(5):711–714. doi:10.1016/j.joen.2009.01.018.

Arslan H, Barutcigil C, Karatas E, Topcuoglu HS, Yeter KY, Ersoy I, Ayrancı LB. 2014. Effect of citric acid irrigation on the fracture resistance of endodontically treated roots. *Eur J Dent.* 8(1):74–78. doi:10.4103/1305-7456.126248.

Arslan H, Gok T, Saygili G, Altintop H, Akçay M, Çapar ID. 2014. Evaluation of effectiveness of various irrigating solutions on removal of calcium hydroxide mixed with 2% chlorhexidine gel and detection of orange-brown precipitate after removal. *J Endod.* 40(11):1820–1823. doi:10.1016/j.joen.2014.06.003.

Ayad MF. 2001. Effects of rotary instrumentation and different etchants on removal of smear layer on human dentin. *J Prosthet Dent.* 85(1):67–72. doi:10.1067/mpr.2001.112792.

Barbin LE, Estrela C, Guedes DFC, Spanó JCE, 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(5):664–668. doi:10.1016/j.joen.2012.10.018.

Basrani B, Haapasalo M. 2012. Update on endodontic irrigating solutions. *Endod Top.* 27(1):74–102.

Basrani BR, Manek S, Mathers D, Fillery E, Sodhi RNS. 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):312–314. doi:10.1016/j.joen.2009.10.031.

Basrani BR, Manek S, Sodhi RNS, Fillery E, Manzur A. 2007. Interaction between Sodium Hypochlorite and Chlorhexidine Gluconate. *J Endod.* 33(8):966–969. doi:10.1016/j.joen.2007.04.001.

Baumgartner JC, Ibay AC. 1987. The chemical reactions of irrigants used for root canal debridement. *J Endod.* 13(2):47–51. doi:10.1016/S0099-2399(87)80153-X.

Bernardi A, Teixeira CS. 2015. The properties of chlorhexidine and undesired effects of its use in endodontics. *Quintessence Int.* 46(7):575–82. doi:10.3290/j.qi.a33934.

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(2):181–185. doi:10.1016/j.joen.2007.11.006.

Bysreöm A, Sundqvist G. 1981. Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. *Eur J Oral Sci.* 89(4):321–328.

- Carlin B. 1957. En experimentell jämförande studie över rotkanalrensning med H₂SO₄, EDTA och NaCl. *Apollonia* (Sydney). 3:215–218.
- Chhabra RS, Huff JE, Haseman JK, Elwell MR, Peters AC. 1991. Carcinogenicity of p-chloroaniline in rats and mice. *Food Chem Toxicol.* 29(2):119–124. doi:[https://doi.org/10.1016/0278-6915\(91\)90166-5](https://doi.org/10.1016/0278-6915(91)90166-5).
- Christensen CE, McNeal SF, Eleazer P. 2008. Effect of Lowering the pH of Sodium Hypochlorite on Dissolving Tissue *in Vitro*. *J Endod.* 34(4):449–452. doi:10.1016/j.joen.2008.01.001.
- Craig DP, Nyholm RS. 1964. Chapter 2: The Nature of the Metal-Ligand Bond. In: Dwyer FP, Mellor DPBT, editors. *Chelating Agents and Metal Chelates*. 1st Edition. New York & London: Academic Press. p. 51–93.
- Cruz-Filho AM, Sousa-Neto MD, Savioli RN, Silva RG, Vansan LP, Pécora JD. 2011. Effect of chelating solutions on the microhardness of root canal lumen dentin. *J Endod.* 37(3):358–362. doi:10.1016/j.joen.2010.12.001.
- Davis JM, Maki J, Bahcall JK. 2007. An *In Vitro* Comparison of the Antimicrobial Effects of Various Endodontic Medicaments on *Enterococcus faecalis*. *J Endod.* 33(5):567–569. doi:10.1016/j.joen.2007.01.015.
- De-Deus G, Paciornik S, Mauricio MHP. 2006. Evaluation of the effect of EDTA, EDTAC and citric acid on the microhardness of root dentine. *Int Endod J.* 39(5):401–407. doi:10.1111/j.1365-2591.2006.01094.x.
- Dhillon GS, Brar SK, Verma M, Tyagi RD. 2011. Recent Advances in Citric Acid Bio-production and Recovery. *Food Bioprocess Technol.* 4(4):505–529. doi:10.1007/s11947-010-0399-0.
- Di Lenarda R, Cadenaro M, Sbaizero O. 2000. Effectiveness of 1 mol L⁻¹ citric acid and 15% EDTA irrigation on smear layer removal. *Int Endod J.* 33(1):46–52. doi:10.1046/j.1365-2591.2000.00273.x.

Diomedi A, Chacón E, Delpiano L, Hervé B, Jemenao MI, Medel M, Quintanilla M, Riedel G, Tinoco J, Cifuentes M. 2017. Antisépticos y desinfectantes: apuntando al uso racional. Recomendaciones del Comité Consultivo de Infecciones Asociadas a la Atención de Salud, Sociedad Chilena de Infectología. Rev Chil infectología. 34(2):156–174. doi:10.4067/S0716-10182017000200010.

Do Nascimento CWA, Amarasiriwardena D, Xing B. 2006. Comparison of natural organic acids and synthetic chelates at enhancing phytoextraction of metals from a multi-metal contaminated soil. Environ Pollut. 140(1):114–123. doi:10.1016/j.envpol.2005.06.017.

Du T, Wang Z, Shen Y, Ma J, Cao Y, Haapasalo M. 2014. Effect of long-term exposure to endodontic disinfecting solutions on young and old *Enterococcus faecalis* biofilms in dentin canals. J Endod. 40(4):509–514. doi:10.1016/j.joen.2013.11.026.

Eldeniz AU, Erdemir A, Belli S. 2005. Effect of EDTA and Citric Acid Solutions on the Microhardness and the Roughness of Human Root Canal Dentin. J Endod. 31(2):107–110. doi:10.1097/01.DON.0000136212.53475.AD.

Elmendorp J, Schoolenberg G. 1995. Some wetting and adhesion phenomena in polypropylene composites. In: Karger-Kocsis J, editor. Polypropylene Structure, blends and Composites: Volume 3 Composites. London: Chapman & Hall. p. 228–262.

Estrela CR, Barbin EL, Spano JC, Marchesan M a, Pecora JD. 2002. Mechanism of action of sodium hypochlorite. Braz Dent J. 13:113–117. doi:10.1590/S0103-64402002000200007.

Ferreira NS, Martinho FC, Cardoso FGR, Nascimento GG, Carvalho CAT, Valera MC. 2015. Microbiological profile resistant to different intracanal medications in primary endodontic infections. J Endod. 41(6):824–830. doi:10.1016/j.joen.2015.01.031.

Flora SJS, Mehta A, Satsangi K, Kannan GM, Gupta M. 2003. Aluminum-induced oxidative stress in rat brain: response to combined administration of citric acid and HEDTA. Comp Biochem Physiol Part C Toxicol Pharmacol. 134(3):319–328.

Fuenzalida A, Yévenes I, Ruiz M, Barrientos C, Cornejo D, Araya P, Correa V. 2017. EDTA as an Irrigant between 5 % Sodium Hypochlorite and 2 % Chlorhexidine in the Formation of Para-chloroaniline Related Precipitate. *EC Dent Sci.* 10.6(June):158–164.

Gasic J, Popovic J, Živković S, Petrovic A, Barac R, Nikolic M. 2012. Ultrastructural analysis of the root canal walls after simultaneous irrigation of different sodium hypochlorite concentration and 0.2% chlorhexidine gluconate. *Microsc Res Tech.* 75(8):1099–1103. doi:10.1002/jemt.22036.

Gatewood RS. 2007. Endodontic Materials. *Dent Clin North Am.* 51(3):695–712. doi:10.1016/j.cden.2007.04.005.

Gernhardt CR, Eppendorf K, Kozlowski A, Brandt M. 2004. Toxicity of concentrated sodium hypochlorite used as an endodontic irrigant. *Int Endod J.* 37(4):272–280. doi:10.1111/j.0143-2885.2004.00804.x.

Gomes BPFA, Ferraz CCR, 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.* 34:424–428.

Gyurko R, Shoji H, Battaglino RA, Boustany G, Gibson FC, Genco CA, Stashenko P, Van Dyke TE. 2005. Inducible nitric oxide synthase mediates bone development and *P. gingivalis*-induced alveolar bone loss. *Bone.* 36(3):472–479. doi:10.1016/J.BONE.2004.12.002.

Haapasalo M, Shen Y, Qian W, Gao Y. 2010. Irrigation in endodontics. *Dent Clin.* 54(2):291–312.

Haapasalo M, Shen Y, Wang Z, Gao Y. 2014. Irrigation in endodontics. *Br Dent J.* 216(6):299–303. doi:10.1038/sj.bdj.2014.204.

Hülsmann M, Heckendorff M, Lennon Á. 2003. Chelating agents in root canal treatment: mode of action and indications for their use. *Int Endod J.* 36(12):810–830. doi:10.1111/j.1365-2591.2003.00754.x.

Institut Municipal d'Investigació Mèdica (IMIM). 2012. Calculadora de Tamaño muestral GRANMO.

International Agency for Research on Cancer. 1993. para-Chloroaniline. In: Occupational Exposures of Hairdressers and Barbers and Personal Use of Hair Colourants; Some Hair Dyes, Cosmetic Colourants, Industrial Dyestuffs and Aromatic Amines. Vol. 57. Lyon, France: World Health Organization. p. 305–322.

Jena A, Sahoo SK, Govind S. 2015. Root canal irrigants: a review of their interactions, benefits, and limitations. *Compend Contin Educ Dent*. 36(4):174–179.

Kandaswamy D, Venkateshbabu N. 2010. Root canal irrigants. *J Conserv Dent*. 13(4):256. doi:10.4103/0972-0707.73378.

Kawashima N, Wadachi R, Suda H, Yeng T, Parashos P, Suda Tokyo H, Thai Yeng J, Parashos Melbourne P. 2009. Root canal medicaments. *Int Dent J*. 59:5–11. doi:10.1922/IDJ.

Ke S, Huang Y, Decker EA, Hultin HO. 2009. Impact of citric acid on the tenderness, microstructure and oxidative stability of beef muscle. *Meat Sci*. 82(1):113–118. doi:10.1016/j.meatsci.2008.12.010.

Khadse P, Banga A, Kamra KS. 2014. Effectiveness of various intermediate irrigants for the prevention of precipitate formed by the interaction of sodium hypochlorite and chlorhexidine- An *In Vitro* Study. *Endontology*. 26(2):309–313.

Khedmat SS, Shokouhinejad N. 2008. Comparison of the Efficacy of Three Chelating Agents in Smear Layer Removal. *J Endod*. 34(5):599–602. doi:10.1016/j.joen.2008.02.023.

Kim J-W. 2012. Precipitate from a combination of sodium hypochlorite and chlorhexidine. *Restor Dent Endod*. 37(3):185. doi:10.5395/rde.2012.37.3.185.

Krause TA, Liewehr FR, Hahn CL. 2007. The Antimicrobial Effect of MTAD, Sodium Hypochlorite, Doxycycline, and Citric Acid on *Enterococcus faecalis*. *J Endod*. 33(1):28–30. doi:10.1016/j.joen.2006.08.011.

- Krebs HA. 1970. The History of the Tricarboxylic Acid Cycle. *Perspect Biol Med.* 14(1):154–172. doi:10.1353/pbm.1970.0001.
- Krishnamurthy S, Sudhakaran S. 2010. Evaluation and prevention of the precipitate formed on interaction between sodium hypochlorite and chlorhexidine. *J Endod.* 36(7):1154–1157. doi:10.1016/j.joen.2010.01.012.
- Law A, Messer H. 2004. An evidence-based analysis of the antibacterial effectiveness of intracanal medicaments. *J Endod.* 30(10):689–694.
- Loel DA. 1975. Use of acid cleanser in endodontic therapy. *J Am Dent Assoc.* 90(1):148–151.
- Machado-Silveiro LF, González-López S, González-Rodríguez MP. 2004. Decalcification of root canal dentine by citric acid, EDTA and sodium citrate. *Int Endod J.* 37(6):365–369. doi:10.1111/j.1365-2591.2004.00813.x.
- Malheiros CF, Marques MM, Gavini G. 2005. *In Vitro* Evaluation of the Cytotoxic Effects of Acid Solutions Used as Canal Irrigants. *J Endod.* 31(10):1–3.
- Marchesan MA, Júnior BP, de Freitas Afonso MM, Sousa-Neto MD, Paschoalato C. 2007. Chemical analysis of the flocculate formed by the association of sodium hypochlorite and chlorhexidine. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology.* 103(5):2006–2008. doi:10.1016/j.tripleo.2006.11.008.
- Mohammadi Z. 2008. Sodium hypochlorite in endodontics: an update review. *Int Dent J.* 58:329–341.
- Mohammadi Z, Abbott P V. 2009. The properties and applications of chlorhexidine in endodontics. *Int Endod J.* 42(4):288–302. doi:10.1111/j.1365-2591.2008.01540.x.
- Mohammadi Z, Dummer PMH. 2011. Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology. *Int Endod J.* 44(8):697–730. doi:10.1111/j.1365-2591.2011.01886.x.

Mortenson D, Sadilek M, Flake NM, Paranjpe A, Heling I, Johnson JD, Cohenca N. 2012. The effect of using an alternative irrigant between sodium hypochlorite and chlorhexidine to prevent the formation of para-chloroaniline within the root canal system. *Int Endod J.* 45(9):878–882. doi:10.1111/j.1365-2591.2012.02048.x.

Nagoba BS, Gandhi RC, Wadher BJ, Potekar RM, Kolhe SM. 2008. Microbiological, histopathological and clinical changes in chronic infected wounds after citric acid treatment. *J Med Microbiol.* 57(5):681–682. doi:10.1099/jmm.0.47647-0.

Nakamura VC, Cai S, Candeiro GTM, Ferrari PH, Caldeira CL, Gavini G. 2013. *Ex vivo* evaluation of the effects of several root canal preparation techniques and irrigation regimens on a mixed microbial infection. *Int Endod J.* 46(3):217–224. doi:10.1111/j.1365-2591.2012.02110.x.

National Center for Biotechnology Information (NCBI). 2018. Citric acid. PubChem Compd Database; CID=311.

National Institute of Advanced Industrial Science and Technology. 2016. Spectral Database for Organic Compounds. :Aniline (SDBS #: 905).

Navarro-Escobar E, Gonzalez-Rodriguez MP, Ferrer-Luque CM, González-Rodríguez MP, Ferrer-Luque CM. 2010. Cytotoxic effects of two acid solutions and 2.5% sodium hypochlorite used in endodontic therapy. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 15(1):90–94. doi:10.4317/medoral.15.e90.

Nowicki JB, Sem DS. 2011. An *in vitro* spectroscopic analysis to determine the chemical composition of the precipitate formed by mixing sodium hypochlorite and chlorhexidine. *J Endod.* 37(7):983–988. doi:10.1016/j.joen.2011.03.033.

Olmos Fassi J, Del Carril MA, Saguir S, Garcia Rusco A. 2009. Limpieza de las paredes del conducto usando una combinación de hipoclorito de sodio 2,5% -ácido cítrico 10% y clorhexidina 2% -ácido cítrico 10%. *Endodoncia (Mex).* 27(2):63–67.

Orhan EO, Irmak Ö, Hür D, Yaman BC, Karabucak B. 2016. Does para-chloroaniline really form after mixing sodium hypochlorite and chlorhexidine? *J Endod.* 42(3):455–459. doi:10.1016/j.joen.2015.12.024.

Ötsby BN. 1957. Chelation in root canal therapy: EDTA for cleaning and widening of root canals. *Odontol Tidskr.* 65:3–11.

Pappen FG, Souza EM, Giardino L, Carlos IZ, Leonardo MR, de Toledo Leonardo R. 2009. Endodontic Chelators Induce Nitric Oxide Expression by Murine-cultured Macrophages. *J Endod.* 35(6):824–828. doi:10.1016/j.joen.2009.03.002.

Paquette L, Legner M, Fillery ED, Friedman S. 2007. Antibacterial Efficacy of Chlorhexidine Gluconate Intracanal Medication *In Vivo*. *J Endod.* 33(7):788–795. doi:10.1016/j.joen.2005.12.017.

Patil CR, Uppin V. 2011. Effect of endodontic irrigating solutions on the microhardness and roughness of root canal dentin: An *in vitro* study. *Indian J Dent Res.* 22(1):22. doi:10.4103/0970-9290.79969.

Pecora JD, Sousa-Neto MD, Estrela CR. 1999. Soluções irrigadoras auxiliares do preparo do canal radicular. In: Estrela CR, Figueiredo J, editors. *Endodontia - Princípios biológicos e mecânicos*. 1st ed. São Paulo: Artes Médicas. p. 552–569.

Pérez-Heredia M, Ferrer-Luque CM, González-Rodríguez MP, Martín-Peinado FJ, González-López S. 2008. Decalcifying effect of 15% EDTA, 15% citric acid, 5% phosphoric acid and 2.5% sodium hypochlorite on root canal dentine. *Int Endod J.* 41(5):418–423. doi:10.1111/j.1365-2591.2007.01371.x.

Peters OA. 2004. Current challenges and concepts in the preparation of root canal systems: a review. *J Endod.* 30(8):559–567.

Prado M Do, Gusman H, Gomes BPF, Simão RA. 2011. Scanning electron microscopic investigation of the effectiveness of phosphoric acid in smear layer removal when compared with EDTA and citric acid. *J Endod.* 37(2):255–258. doi:10.1016/j.joen.2010.11.011.

Prado M Do, Santos Júnior HM, Rezende CM, Pinto AC, Faria RB, Simão RA, Gomes BPF. 2013. Interactions between irrigants commonly used in endodontic practice: A chemical analysis. *J Endod.* 39(4):505–510. doi:10.1016/j.joen.2012.11.050.

Quiroz GK, Yévenes I, Fuenzalida A, Ruiz M. 2017. Distilled Water as an Intermediate Irrigant Between 5 % Sodium Hypochlorite and 2 % Chlorhexidine to Prevents the Formation of Parachloroaniline. *EC Dent Sci.* 12.5(July):208–213.

Radcliffe CE, Potouridou L, Qureshi R, Habahbeh 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(7):438–446. doi:10.1111/j.1365-2591.2004.00752.x.

Rasimick BJ, Nekich M, Hladek MM, Musikant BL, Deutsch AS. 2008. Interaction between Chlorhexidine Digluconate and EDTA. *J Endod.* 34(12):1521–1523. doi:10.1016/j.joen.2008.08.039.

Reis C, De-Deus G, Leal F, Azevedo É, Coutinho-Filho T, Paciornik S. 2008. Strong effect on dentin after the use of high concentrations of citric acid: An assessment with co-site optical microscopy and ESEM. *Dent Mater.* 24(12):1608–1615. doi:10.1016/j.dental.2008.03.027.

Riquelme MJ, Correa V, Araya P, Neira M, Yévenes I. 2016. Water and Physiological Saline to Prevent the Formation of P-Chloroaniline. *Int J Odontostomatol.* 9(3):399–404. doi:10.4067/s0718-381x2015000300008.

Rosenthal S, Spångberg L, Safavi K. 2004. Chlorhexidine substantivity in root canal dentin. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology.* 98(4):488–492.

Rossi-Fedele G, Doramac EJ, Guastalli AR, Steier L, Poli De Figueiredo JA. 2012. Antagonistic interactions between sodium hypochlorite, chlorhexidine, EDTA, and citric acid. *J Endod.* 38(4):426–431. doi:10.1016/j.joen.2012.01.006.

Scelza MFZ, Pierro VS da S, Chagas MA, da Silva LE, Scelza P. 2010. Evaluation of Inflammatory Response of EDTA, EDTA-T, and Citric Acid in Animal Model. *J Endod.* 36(3):515–519. doi:10.1016/j.joen.2009.11.011.

Siqueira J, Rôçac IN, Favieri A, Lima K. 2000. Chemomechanical Reduction of the Bacterial Population in the Root Canal after Instrumentation and Irrigation with 1%, 2.5%, and 5.25% Sodium Hypochlorite. *J Endod.* 26(6):331–334. doi:10.1097/00004770-200006000-00006.

Swedish Council on Health Technology Assessment. 2012. Methods of Diagnosis and Treatment in Endodontics. Order A J Theory Ordered Sets Its Appl. 2012(June).

The European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, Council of Europe. 2009. Chlorhexidine digluconate solution. In: Council of Europe, editor. *European Pharmacopoeia 7.0*. Strasbourg: Council of Europe. p. 1661–1662.

Thomas JE, Sem DS. 2010. An *In Vitro* Spectroscopic Analysis to Determine Whether Para-Chloroaniline Is Produced from Mixing Sodium Hypochlorite and Chlorhexidine. *J Endod.* 36(2):315–317. doi:10.1016/j.joen.2009.10.028.

Tirali RE, Turan Y, Akal N, Karahan ZC. 2009. *In vitro* antimicrobial activity of several concentrations of NaOCl and Octenisept in elimination of endodontic pathogens. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology.* 108(5):e117–e120.

Vianna ME, Gomes BPFDA, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CCR, Zaia AA, Souza-Filho FJ, 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(1):79–84. doi:10.1016/S1079-2104(03)00360-3.

Violich DR, Chandler NP. 2010. The smear layer in endodontics - A review. *Int Endod J.* 43(1):2–15. doi:10.1111/j.1365-2591.2009.01627.x.

Walton R, Holton I, Michelich R. 2003. Calcium hydroxide as an intracanal medicament: effect on post-treatment pain. *J Endod.* 27(3):627–9.

Wang CS, Arnold RR, Trope M, Teixeira FB. 2007. Clinical Efficiency of 2% Chlorhexidine Gel in Reducing Intracanal Bacteria. *J Endod.* 33(11):1283–1289. doi:10.1016/j.joen.2007.07.010.

Ward JM, Reznik G, Garner FM. 1980. Proliferative Lesions of the Spleen in Male F344 Rats Fed Diets Containing P-Chloroaniline. *Vet Pathol.* 17(2):200–205. doi:10.1177/030098588001700208.

Wayman BE, Kopp WM, Pinero GJ, Lazzari EP. 1979. Citric and lactic acids as root canal irrigants *in vitro*. *J Endod.* 5(9):258–265. doi:10.1016/S0099-2399(79)80171-5.

World Health Organization. 2003. Concise International Chemical Assessment Document 65: 4--Chloraniline. Geneva, Switzerland.

Yévenes I, Neira M, Parada J, Correa V, Araya P. 2017. Effect of Ultrasound on the Formation of Parachloroaniline Study in *ex-vivo*. *J Clin Exp Orthop.* 3(2):34. doi:10.4172/2471-8416.100034.

9. ANEXOS Y APÉNDICES

9.1. Anexo 1: Acta de aprobación de protocolo de investigación



FACULTAD DE
ODONTOLÓGIA
UNIVERSIDAD DE CHILE

COMITÉ ÉTICO
CIENTÍFICO

ACTA DE APROBACION DE PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN

Ed 17/08/2014

Dra. MA. Torres Palle/ Dra. C. Lefmil/ Secra/ Dr. E. Rodríguez/ Srta. K. Lagos/ Dra. X. Lee/ Dra. B. Urzúa/ Srta. A. Herrera/ Srta. M.I. Comejo

ACTA N°: 2014/02

1. Acta de Aprobación de Proyecto N° 2013/34

2. Miembros del Comité Ético-Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile participantes en la aprobación del Proyecto:

| | | |
|--|---|--|
| Dra. M^a Angélica Torres V. Presidente CEC | Srta. Karin Lagos Secretaria (S) | Dra. Ximena Lee Miembro permanente del CEC |
| Dra. Blanca Urzúa Miembro permanente del CEC | Srta. Andrea Herrera Miembro permanente del CEC | Dr. Eduardo Rodríguez Miembro permanente del CEC |

3. Fecha de la Aprobación: 28 de Mayo de 2014.

4. Título completo del manuscrito: "Determinación del Contenido Residual de P-Cloroanilina *Ex Vivo* y en Humanos, Producido en un Tratamiento Endodóntico Tras la Utilización de Hipoclorito al 5% y Clorhexidina al 2%". Proyecto FIOUCh, versión del 04 de Mayo, 2014.

5. Investigador Responsable: Dra. Silvana Maggiolo
Depto. Odontología Conservadora.
Facultad de Odontología, Universidad de Chile.
Fono: 29781839 E-mail: silvanamaggiolo@gmail.com

6. Institución: Facultad de Odontología, Universidad de Chile.

7. Documentación Revisada:

- Proyecto FIOUCh Completo, formato electrónico, titulado "Determinación del Contenido Residual de P-Cloroanilina *Ex Vivo* y en Humanos, Producido en un Tratamiento Endodóntico Tras la Utilización de Hipoclorito al 5% y Clorhexidina al 2%". Proyecto FIOUCh, versión del 04 de Mayo, 2014.
- Documentos de Consentimiento Informado para donación de dientes para investigación: donantes adultos, donantes adolescentes, padres de donantes, versión 04/05/2014, del Proyecto de investigación "Determinación del Contenido Residual de P-Cloroanilina *Ex Vivo* y en Humanos, Producido en un Tratamiento Endodóntico Tras la Utilización de Hipoclorito al 5% y Clorhexidina al 2%". Proyecto FIOUCh, versión del 04 de Mayo, 2014.
- Documento de Consentimiento Informado para participación de investigación de pacientes adultos, versión 04/05/2014, del Proyecto de investigación Determinación del Contenido Residual de P-Cloroanilina *Ex Vivo* y en Humanos, Producido en un Tratamiento Endodóntico Tras la Utilización de Hipoclorito al 5% y Clorhexidina al 2%". Proyecto



Ed 17/08/2014

FIOUCh, versión del 04 de Mayo, 2014. Carta compromiso de Directora(S) de la Clínica Odontológica de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile 6 Mayo 2014.

- CV de co-investigador Ismael Yévenes López. Instituto de Ciencias Odontológicas.

8.- Carácter de la población

Se realizará una parte experimental *ex vivo* donde se usarán 20 dientes naturales sanos con indicación de extracción terapéutica solicitados en donación los cuales serán tratados endodónticamente. También se analizarán los tratamientos endodónticos de 20 pacientes, entre 18 y 70 años, de ambos sexos que requieren de algún tratamiento endodóntico de necropulpectomía. Sus tratamientos serán realizados bajo los protocolos enseñados en el área de endodoncia de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile y se verificará en cada lavado de canales el residuo líquido al interior.

8.- Fundamentación de la aprobación:

El tratamiento endodóntico es hasta ahora la alternativa de tratamiento más conservadora y efectiva para la eliminación bacteriana en los conductos de las raíces dentarias infectadas. La completa eliminación del tejido pulpar inflamado, bacterias y otros restos de tejidos dentro del canal radicular, es realizada gracias a la limpieza mecánica y química del interior de los canales radiculares y en ocasiones se dejan medicaciones entre sesiones de limpieza al interior de los conductos.

Los tipos de irrigantes químicos de desinfección en ocasiones reaccionan, generando productos que a largo plazo pueden ser nocivos para los tejidos peridentarios, si éstos no son completamente eliminados (ejemplos: Paracloroanilina, como resultado de la interacción de Hipoclorito de Sodio al 5% y Clorhexidina al 2%).

Dado que los protocolos de lavado nunca han buscado establecer exactamente la cantidad de estos productos potencialmente tóxicos producidos al interior de los canales radiculares, y que eventualmente explicarían algunos de los fracasos a largo plazo de estas terapias, este estudio pretende analizar la concentración real de estos productos al interior del canal después de cada lavado durante el tratamiento endodóntico, usando el protocolo de irrigación de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. De esta forma, la única variación en el protocolo de tratamiento endodóntico será el proceso de toma de muestra de fluidos intracanales, que normalmente son descartados por secado. Así, se pretende verificar que las técnicas endodónticas preconizadas están siendo óptimas y seguras para la salud, o de otro modo mejorar los protocolos. Este estudio busca evidencias que ratifican las técnicas que nos han permitido por años mantener los dientes desvitalizados en boca, evitando así el dramático desdentamiento de la población.

Los investigadores se han comprometido a verificar en cada etapa la presencia de estos productos intrarradiculares y en caso de encontrar alguno de ellos, han asegurado la protección de los individuos tratados realizando lo necesario para que no queden vestigios de ninguno de esos productos.



Ed 17/08/2014

Esta investigación se enmarca en los principios de respeto a los derechos de los participantes y los garantiza en todos los procedimientos, metodologías y procesos de investigación, así como en el manejo divulgación y archivo de los datos que se obtendrán.

Los protocolos de tratamiento son los realizados a todos los pacientes en forma rutinaria en la clínica Odontológica de la Facultad de Odontología y para ello los pacientes son informados de los riesgos y beneficios de este tratamiento en el esquema del sistema asistencial donde la clínica y el odontólogo especialista tratante responde y garantiza el tratamiento.

Los participantes serán informados del fin de esta investigación y la investigadora principal se ha comprometido a asegurarse de la comprensión de ella por los participantes al firmar un documento de Consentimiento Informado.

En consecuencia, el Comité Ético Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, Aprueba por unanimidad de sus miembros el estudio: Determinación del Contenido Residual de P-Cloroanilina *Ex Vivo* y en Humanos, Producido en un Tratamiento Endodóntico Tras la Utilización de Hipoclorito al 5% y Clorhexidina al 2%". Proyecto FIOUCH, versión del 04 de Mayo, 2014, bajo la conducción de la Dra. Silvana Maggiolo Depto. Odontología Conservadora. Facultad de Odontología, Universidad de Chile.

Una vez finalizado el estudio el comité deberá ser informado de los resultados mediante carta formal o envío electrónico del informe final. Este Comité se reserva el derecho de monitorear este proyecto si lo considera necesario y el investigador deberá, bajo mutuo acuerdo, presentar los antecedentes solicitados.



Dra. María Angélica Torres V.
Presidente CEC-FOUCH

C/C. Investigador Principal.
Secretaría C.E.C.



9.2. Anexo 2: Autorización extensión proyecto FIOUCh, 2016



Santiago, 9 de noviembre de 2016

Mat.: Autoriza extensión proyecto FIOUCh

Señor
Dr. Ismael Yévenes L.
 Investigador Responsable
 Proyecto FIOUCh 13-015
Presente

Estimado Dr. Yévenes:

En respuesta a su carta donde solicita prórroga del Proyecto FIOUCh 13/015, se le recuerda que en carta DIFO N° 0145/2015 del 27 de agosto de 2015 ya tuvo una extensión de plazo por 6 meses, que era hasta diciembre de 2016. Por tanto, el comité en esta oportunidad otorga el aplazamiento por 6 meses más, siendo hasta junio de 2017, cuando sus informes académico y económico deberán ser entregados en forma impostergradable.

Sin otro particular, saluda atentamente a usted,

Dra. Denisse Bravo Rodríguez
 Directora de Investigación



9.3. Anexo 3: Autorización extensión proyecto FIOUCh, 2017



Santiago, 16 de octubre de 2017

Mat.: Autoriza extensión Proyecto FIOUCh.

Señor
Prof. Ismael Yévenes López
 Investigador Responsable
 Proyecto FIOUCh 13/015
Presente

Estimado Prof. Yévenes:

En respuesta a su carta de fecha 16 de octubre del año en curso, donde solicita extender por un año, el plazo del Proyecto FIOUCh 13/015, titulado: "Determinación del contenido residual del p-cloroanilina (PAC) *ex vivo* y en humanos producido en un tratamiento endodóntico tras la utilización de hipoclorito al 5% y CHX 2%", informo a usted que su solicitud ha sido autorizada. Por lo tanto, el plazo de término del mencionado proyecto será el 31 de diciembre de 2018.

Sin otro particular, saluda atentamente a usted,

Dr. Alfredo Criollo C.
 Director de Investigación



ACC/rom.



9.4. Anexo 4: Consentimiento informado para donación de dientes para investigación (donantes adultos)



Fecha de edición: Stgo, 4 de Mayo de 2014

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA DONACION DE DIENTES PARA INVESTIGACIÓN (Donantes Adultos)

Nombre de Estudio: "Determinación Del Contenido Residual De P-Cloroanilina Ex Vivo Y En Humanos Producido En Un Tratamiento Endodóntico Tras La Utilización De Hipoclorito Al 5% Y Clorhexidina Al 2%".

Investigador Responsable: Dra. Silvana Maggiolo
 Depto. Odntologia Conservadora.
 Facultad de Odontología, Universidad de Chile.
 Sergio Livingstone Pohlhammer 943,
 Independencia, Santiago.
 Fono: 29781839, E-mail: silvanamaggiolo@gmail.com

Nombre del Patrocinante: Facultad de Odontología, Universidad de Chile

Proyecto revisado y aprobado por el Comité Ético Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

Presidente CEC: Dra. María Angélica Torres
 CEC-FOUCh. 4º piso Edificio Admnsitrativo
 Facultad de Odontología . U de Chile
 Sergio Livingstone Pohlhammer 943, Independencia, Santiago.
 Fono 29781703, en horarios de oficina
 e-mail: cec.fouch@odontologia.uchile.cl.

Nombre del Participante: _____

Este Documento de Consentimiento Informado tiene dos partes:

- Información (proporciona información sobre el estudio para usted)
- Formulario de Consentimiento (para firmar si está de acuerdo en participar)

Se le dará una copia del Documento completo de Consentimiento Informado

Solicitamos a Usted su colaboración con este estudio. Antes de decidir si colabora o no, debe conocer y comprender los aspectos que se exponen a continuación. Siéntase con absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto sobre el cual tenga dudas. Una vez que haya comprendido el estudio y si usted desea colaborar, entonces se le pedirá que firme este formulario.



EXPLICACION DEL PROYECTO

La invasión bacteriana en los canales de las raíces dentarias es crucial para el comienzo y mantenimiento de las enfermedades de las raíces de los dientes. Cuando esto ocurre, la alternativa de tratamiento más conservadora y efectiva es el tratamiento de conducto, de canales o tratamiento endodóntico. El éxito de éste depende en gran medida de una completa eliminación del tejido pulpar inflamado, bacterias y otros restos de tejidos dentro del canal radicular.

Para esto en la sesión clínica se recurre a limpiar los canales con instrumentos mecánicos y a lavar con productos químicos. Sin embargo hay casos en los cuales esto no es suficiente y hay que dejar una medicación dentro de los canales de una sesión a otra, el que ayuda a la desinfección del canal radicular.

Dentro de los irrigantes químicos más usados y efectivos está el Hipoclorito de Sodio al 5%, mientras que la medicación intracanal se realiza en algunas ocasiones con Clorhexidina al 2% (CHX 2%) o con Hidróxido de Calcio con suero, pero la CHX 2% es mas facil de manipular. Se ha visto, sin embargo, que al interaccionar el Hipoclorito de Sodio al 5% y la CHX 2%, forman un compuesto llamado Paracloroanilina (PCA), de color café-anaranjado, que dificulta el tratamiento endodóntico obstaculizando el sellado de los canales, además puede ser tóxico para los tejidos que rodean al diente en concentraciones más altas.

Existen numerosas investigaciones que demuestran que la formación del compuesto de PCA se puede prevenir o al menos minimizar irrigando en forma abundante con suero fisiológico luego del uso de Hipoclorito de Sodio, procedimiento que es realizado sistemáticamente en el protocolo de tratamiento de endodoncia usado en esta facultad, pero se desconoce la concentración final de este producto en los canales radiculares después del uso de esta técnica de lavado.

El objetivo del presente estudio es estudiar la concentración real de paracloroanilina que se forma o no al interior del canal durante el tratamiento endodóntico, de dientes medicados con CHX 2%, y usando el protocolo de irrigación de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, que busca evitar la formación de éste. Así podremos analizar si nuestros tratamientos están siendo óptimos y seguros para la salud, o si por el contrario deberemos realizar cambios en los irrigantes utilizados para lograr este objetivo.

Lo hemos contactado porque usted requiere la extracción de algunos dientes que cumplen con los requisitos para este estudio (la extracción de un diente sano por indicación protésica u ortodóncicas, sin enfermedad periodontal ni otras enfermedades generales); y quisieramos solicitar a Usted la donación de los dientes extraídos.

Los dientes donados se utilizarán sólo con el fin recién expuesto y no se guardará ningún registro de su relación con el donante. Ningún otro tipo de estudio se realizará con los dientes. Una vez observados y descritos, los dientes serán destruidos y eliminados siguiendo los protocolos de bioseguridad vigentes.

La obtención de estas muestras en sí no presenta riesgos, ni costos adicionales para usted, pero el financiamiento del proceso quirurgico de extracción será su responsabilidad.

No existe ningún tipo beneficio inmediato por la participación en el estudio ya que los dientes a utilizar son normalmente desechados. Sin embargo, como consecuencia de esta donación y de la investigación a realizar se espera contribuir a aplicaciones futuras en el ámbito clínico.



Aclaraciones

- La donación del o los dientes es completamente voluntaria
- No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted en caso de no aceptar la invitación.
- No tendrá que efectuar gasto alguno como consecuencia del estudio.
- No recibirá pago por su donación.
- Si usted desea conocer los resultados o tiene cualquier pregunta puede hacerla ahora o más tarde, acudiendo a Av. La Paz 571, Facultad de Odontología de Universidad de Chile, Áreas de Endodoncia o Química y comunicarse con la Dra Maggiolo los días Martes, Jueves o Viernes de 8 a 12 horas o al teléfono 29781839.
- También puede contactarse con el Comité Ético Científico de la Facultad de Odontología cuyo presidente es la Dra. María Angélica Torres, al fono 29781703, en horarios de oficina o al mail cec.fouch@odontologia.uchile.cl.

FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

He sido invitado a colaborar con la investigación de "Determinación Del Contenido Residual De P-Cloroanilina Ex Vivo Y En Humanos Producido En Un Tratamiento Endodóntico Tras La Utilización De Hipoclorito Al 5% Y Clorhexidina Al 2%". Entiendo que colaboraré donando los dientes que me serán extraídos, los que serán utilizados para la realización de tratamiento de canal y destruidos una vez tratados y observados. Sé que no existen beneficios para mi persona y que no se me recompensará por participar. Se me ha proporcionado el nombre de un investigador que puede ser fácilmente contactado y su dirección de correo electrónico.

He leído la información proporcionada. He tenido la oportunidad de preguntar sobre ella y se me ha contestado satisfactoriamente las preguntas que he realizado. Consiento voluntariamente colaborar en esta investigación donando mis dientes extraídos.

Nombre del Donante _____

Firma _____

Santiago, ____/____/____

Sección a llenar por el Investigador o su representante:

He explicado al Sr(a)..... la naturaleza de la investigación. He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda. Una vez concluida la sesión de preguntas y respuestas, se procedió a firmar el presente documento

Nombre y Firma del Investigador que toma el CI _____ Fecha _____

Nombre y Firma del Investigador Principal _____ Fecha _____

Nombre y Firma del director del Centro o de su Representante _____ Fecha _____



9.5. Anexo 5: Protocolo de irrigación y medicación de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile

PRIMERA SESIÓN:

1. Cavidad de acceso: Se realizará la cavidad de acceso endodóntico con piedra de diamante de alta velocidad (0.12, 0,14) en esmalte, de acuerdo con el tamaño de la cámara pulpar del diente, refrigerando hasta llegar a dentina. En dentina se cortará con fresas de carburo-tungsteno redondas de baja velocidad de acuerdo con la anatomía del diente hasta realizar la comunicación con la cámara pulpar. Una vez que se comunique se irrigará con 3 ml de NaClO al 5% en una Jeringa de Irrigación *Monoject*®. Se realizará el destechamiento con fresa Endo Z® o piedra tipo llama de baja velocidad recorriendo el contorno del techo de la cámara pulpar. Una vez finalizado el destechamiento, se realizará el cateterismo con una lima K fina N° 10 o 15 graduada a dos tercios de la longitud aparente del diente medida en la radiografía previa, irrigando durante todo el procedimiento con NaClO al 5%. → Recolección N° 1
La siguiente etapa en el acceso serán los desgastes compensatorios que en dientes anteriores corresponden al bisel incisal y desgaste de la convexidad palatina; en premolares abordan las vertientes internas de las cúspides vestibular y palatina. Estos desgastes serán efectuados con una piedra tipo llama o fresa Endo-Z de baja velocidad.
2. Preparación 1/3 cervical y medio (Flare): Con fresas Gates-Glidden en una secuencia que se elige de acuerdo al calibre del canal en los tercios cervical y medio. Las fresas deben graduarse a los dos tercios de la longitud aparente del diente (LAD) medido en la radiografía previa. La secuencia para canales amplios será 3-2-1, para canales medios será 1-2-1 y para canales finos será un pre-flare con limas manuales y posteriormente la secuencia 1-2-1 irrigando con NaClO al 5%. → Recolección N° 2
3. Determinación Longitud de Trabajo (LT): Se realizará introduciendo la lima hasta que se visualice la punta de ésta por el foramen apical. Se dejará al ras con el foramen y esa longitud será definida como la longitud real del diente LRD, definiéndose la longitud de trabajo (LT) a -1mm de la LRD.
4. Preparación 1/3 Apical hasta Lima Maestra (LM) irrigando con NaClO al 5% entre cada paso de lima. → Recolección N° 3

5. Retroceso (Step-Back): desde la LM hasta alcanzar el diámetro de la última fresa Gates Glidden utilizada al realizar el flare (en la mayoría de los casos coincide con la fresa Gates Glidden #1 diámetro #50). Con esto se consigue unir la instrumentación del tercio apical con la preparación de los tercios cervical y medio del canal (técnica corono-ápico-medial). Se Irrigará con NaClO al 5 % entre cada paso de lima. → Recolección N°4
6. Secado del canal (con conos de papel estériles).
7. Irrigación (IRR) con suero fisiológico. Irrigar con 3 jeringas de 3 ml cada una. → Recolección N° 5, 6 y 7
8. Secado (con conos de papel).
9. IRR con 1ml de EDTA al 10% durante 1 minuto. → Recolección N° 8
10. Secado (con conos de papel).
11. IRR con suero fisiológico. Irrigar con 3 jeringas de 3 ml cada una. → Recolección N° 9, 10 y 11
12. Secado (con conos de papel).
13. IRR Final y medicación con CHX al 2%. Irrigar y medicar con 1 jeringa de 3 ml. → Recolección N° 12
14. Doble sellado: Se obturará la cavidad de acceso del diente con doble sellado, Fermin® y Vidrio Ionómero de autocurado y se sellará el ápice con cera rosada. Luego, 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:

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

9.6. Anexo 6: Dispositivo para toma de muestras

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

En la figura N° 17 se muestra el esquema del dispositivo. El vacío del eyector en a1 se transmite a través de la cañería a2 y de la tee a3 hasta el interior del contenedor de vidrio a4. El vacío dentro del contenedor a4 se aplica sobre la manguera de poliamida a5 hasta la aguja a6. Finalmente, el vacío se ejerce en la punta de la aguja en a7, lo que permite la succión de los fluidos contenidos dentro de la cavidad pulpar en dirección al frasco contenedor a4.

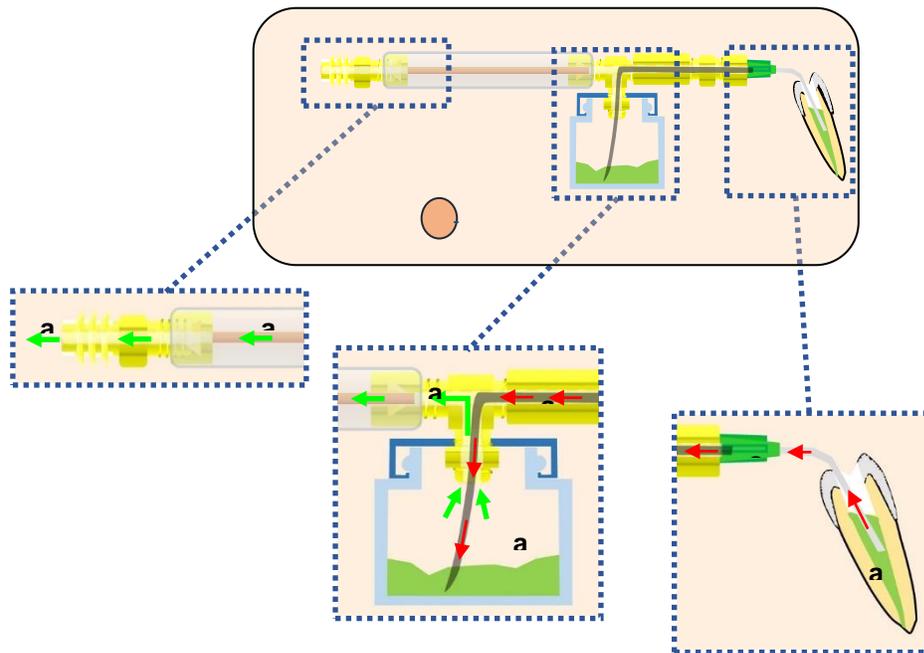


Figura N°17: Dispositivo para la toma de muestras fabricado por el Dr. Mauricio Ruiz Nolf.