

# Análisis espectroscópico del precipitado formado por la mezcla de hipoclorito de sodio y clorhexidina utilizando resonancia magnética nuclear

## Spectroscopic Analysis of the Precipitate Formed by Mixing Sodium Hypochlorite and Chlorhexidine Using Nuclear Magnetic Resonance

Marianella Benavides G. DDS<sup>1</sup>; Erick Hernández M. DDS<sup>1</sup>

1. Especialista en Endodoncia. Sección de Endodoncia, Departamento de Ciencias Restaurativas, Facultad de Odontología, Universidad de Costa Rica, Costa Rica.

Autor para correspondencia: Dra. Marianella Benavides G. - azulchelo@yahoo.com

Recibido: 28-IX-2015

Aceptado: 12-XI-2015

Publicado Online First: 16-XI-2015

DOI: <http://dx.doi.org/10.15517/ijds.v0i0.22146>

### RESUMEN

El objetivo de este estudio fue determinar la presencia de p-cloroanilina (PCA) en una mezcla de hipoclorito de sodio 5,25% y clorhexidina 2% por medio de espectroscopía de resonancia magnética nuclear de 600 MHz. Inicialmente se analizó una muestra comercial de PCA al 98% (Grupo 1: GPCA) mediante resonancia magnética nuclear (RMN-H1 600 MHz) con dimetilsulfoxido perdeuterado (d6-DMSO) como disolvente para conocer el espectro basal del reactivo puro. Para el grupo 2 (GHC) se prepararon 10 mezclas compuestas de 0.5 mL de NaOCl 5.25% con 0.5mL de CHX 2% (proporción 1:1 v/v). Cada una se centrifugó por 10 minutos a 25 °C. Seguidamente se eliminó el supernatante mediante aspiración y se mantuvo en una secadora al vacío para obtener el precipitado sólido. Este último se disolvió en 1.0 mL de d6-DMSO para analizarse mediante RMN-H1 600 MHz. La muestra comercial de PCA 98% presentó un espectro caracterizado por la presencia de una señal compuesta por un doblete característico con un desplazamiento de 7.03-7.02 ppm y 6.59-6.58 ppm. Por otra parte, las muestras del grupo 2, mostraron un espectro con una compleja combinación de diferentes señales, de las cuales ninguna corresponde con el espectro característico para PCA. Por lo tanto, basados en los resultados de este estudio se concluye que el precipitado formado por la mezcla de NaOCl y CHX no presenta PCA.

### PALABRAS CLAVE

Paracloroanilina, Hipoclorito de sodio, Clorhexidina, Precipitado, Resonancia magnética nuclear, Irrigación endodóntica.

## ABSTRACT

The aim of this study was to determine the presence of para-chloroaniline (PCA) obtained by the mixture of 5,25% sodium hypochlorite (NaOCl) and 2% chlorhexidine (CHX), evaluated by nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR-H-1) at 600MHz. Initially a commercial sample of 98% PCA (group 1: GPCA) was analyzed by NMRH-1 combining it with dimethylsulfoxide perdeuterated as solvent, in order to obtain the basal spectra. Ten samples were then prepared by combining equal amounts of 5,25%NaOCl and 2%CHX (group 2:GHC) (PROPORTION 1:1 v/v) by manual stirring. Each sample was then spinned for 10 minutes at 25C°, in order to eliminate the supernatant and to obtain the precipitate, which was prepared at dry vacuum to finally isolate the solid precipitate. The precipitate was again dissolved in d6-DMSO to perform the NMR.H-1 analysis. Commercial PCA showed a distinctive spectra, with a characteristic double sign at 7.02-7.03 ppm and 6.58-6.59 ppm. Experimental samples lack of this distinctive spectra, instead, they all showed a complex combination of signs, which none correspond to pure PCA.

## KEYWORDS

Parachloroaniline, Sodium hypochlorite, Chlorhexidine, Precipitate,  
Nuclear magnetic resonance, Irrigants.

## INTRODUCCIÓN

La terapia endodóntica tiene como principal objetivo la prevención y tratamiento de la periodontitis apical, mediante la prevención o eliminación de la infección microbiana del sistema de conductos radiculares (1). Es ampliamente aceptado que la forma para lograrlo se basa en la limpieza y conformación del sistema de conductos, ya que, los microorganismos que permanecen en el conducto radicular después del tratamiento o que por alguna razón lo vuelven a colonizar después de la obturación, son la principal causa del fracaso endodóntico, por lo tanto, durante el tratamiento de conductos radiculares la desinfección debe optimizarse (2). Estudios utilizando técnicas avanzadas, como escaneo de tomografía microcomputarizada, han demostrado que del 35% al 40% de las paredes del conducto radicular permanecen sin tocar una vez finalizada la instrumentación (3), razón por la cual se debe enfatizar en la importancia de los medios químicos de limpieza y desinfección del conducto radicular (4).

Idealmente, los irrigantes deben tener la capacidad de disolver tejido orgánico, eliminar bacterias y sus desechos, así como remover detritus y barro dentinario producto de la instrumentación del conducto radicular; sin embargo, hasta el momento no existe un irrigante que cumpla con todas esas propiedades. Por esta razón, el uso y combinación de varias sustancias ha sido sugerida para la irrigación y desinfección del conducto radicular, entre ellas el hipoclorito de sodio (NaOCl), el ácido etildiaminotetracético (EDTA), la clorhexidina (CHX), el hidróxido de calcio, agua destilada, entre otros (2).

Kuruvilla *et al.* (5) demostraron que una combinación de hipoclorito de sodio al 2.5% y clorhexidina al 2% resulta más efectiva en la desinfección del conducto radicular, pues se aprovechan las propiedades de sustantividad y desinfección de la clorhexidina, con la capacidad única de disolver el tejido orgánico del hipoclorito de sodio, en comparación con el uso de cada irrigante por separado. Sin embargo, estudios

posteriores demostraron que la combinación de estas sustancias produce un precipitado café-naranja caracterizado como PCA (para cloroanilina) (6), el cual podría ser mutagénico y carcinogénico para el ser humano (7), razón por la cual, actualmente, no se recomienda esta combinación.

Recientemente, Thomas et al. (8) analizaron la molécula del precipitado por medio de resonancia magnética nuclear (RMN-H1) de 400 MHz y concluyeron que en este, no hay presencia de PCA. Nowicki et al. (9) respaldan esos resultados y concluyen que el precipitado corresponde a fragmentos derivados de la clorhexidina producto de su degradación, tales como paraclorofenilguanil-1,6-diguanil hexano (PCGH) y para-clorofenil urea (PCU).

Por el efecto sinérgico ampliamente demostrado que genera la combinación de NaOCl y CHX para la desinfección del conducto radicular y a la luz de estas conclusiones, resulta de alto interés analizar dicho precipitado con un método de mayor precisión. Por lo tanto el objetivo de esta investigación fue determinar la presencia de p-cloroanilina (PCA) en una mezcla de NaOCl 5,25% y CHX 2% por medio de espectroscopía de resonancia magnética nuclear de 600 MHz.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras de estudio se dividieron en dos grupos experimentales, las cuales se prepararon en el laboratorio de Bioquímica y posteriormente fueron analizadas en el Centro de Investigaciones en Productos Naturales (CIPRONA) de la Universidad de Costa Rica.

En el primer grupo, Grupo PCA (GPCA) se determinó el espectro correspondiente a la estructura orgánica de una muestra comercial de 1 gr de para-cloroanilina (4-Chloroaniline 98%, Acros Organics) mediante RMN-H1 600 MHz (Ascend Bruker 600 MHz) con DMSO perdeuterado (d6-DMSO) como disolvente.

En cuanto al segundo grupo, Grupo HC se prepararon 5 muestras de una mezcla de 0.5 ml de NaOCl 5,25% (Receta magistral, Botica Sáenz) y 0.5 ml de clorhexidina 2% (Clorexil 2% MR Laboratorio Stein S.A.). Cada tubo se centrifugó por 10 minutos utilizando una centrífuga (Hamilton Bell modelo VanGuard V6500), a 25 °C; seguidamente, se eliminó el supernatante por aspiración y se mantuvieron las muestras en un secador al vacío por 72 horas. La muestra obtenida se depositó en un solo recipiente, para ser analizada por medio de RMN-H 600 MHz, utilizando DMSO perdeuterado (d6-DMSO) como disolvente.

Posteriormente se compararon los espectros obtenidos del Grupo 1 y 2 para de esta manera determinar la presencia o no de PCA.

## RESULTADOS

El análisis del Grupo 1 mostró un espectro caracterizado por la presencia de dos picos prominentes a y b que conforman un doblete con un desplazamiento de 7.03-7.02 ppm y 6.59-6.58 ppm. (Figura 1). Además, se encontró un pico c con un desplazamiento de 5.22 ppm. La integración de cada señal estudiada se acerca al valor absoluto de 2.

Al analizar la mezcla del Grupo 2, se observa la formación inmediata de un precipitado color naranja con alta saturación y consistencia (Figura 2a). En la Figura 2b se encuentra el espectro correspondiente a este precipitado, en el cual no es posible identificar señales claras en la región que corresponde a desplazamientos de hidrógenos dentro de anillos aromáticos, y no se observa el patrón de dobletes característicos para la muestra de PCA.

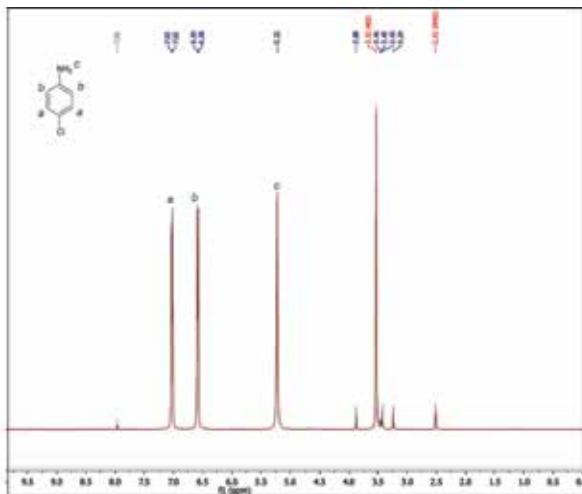
## DISCUSIÓN

El presente estudio analizó los productos obtenidos posteriores a realizar una mezcla

de NaOCl 5.25% y clorhexidina al 0.2% (CHX), mediante espectroscopía RMN-H1 de 600 MHz para determinar la presencia o no de PCA.

Anteriormente, se demostró que la clorhexidina puede hidrolizarse espontáneamente en presencia de calor y luz (10). Barbin et al. (11) detectaron la presencia de PCA en una solución acuosa de clorhexidina 0,2% a 36,5 °C después de 14 días. Así mismo, Basrani et al. (12) demostraron que el calentamiento de la clorhexidina 2% a 45 °C causa la formación inmediata de para-cloroanilina.

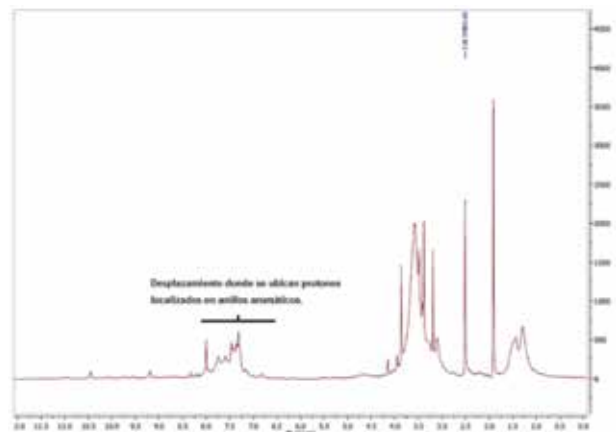
En la Figura 1 se muestra el espectro obtenido al analizar una muestra comercial de para-cloroanilina (GPCA), caracterizado por la presencia de dos picos prominentes a y b que conforman un doblete con un desplazamiento localizado entre el rango de 6.5 ppm y 8 ppm, característico de los protones que se encuentran dentro de un anillo de benceno. Por otro lado, la Figura 2 correspondiente al grupo 2 HC muestra el espectro obtenido en este precipitado, su espectro debería mostrar también un doblete en el rango donde aparecen los compuestos aromáticos, característico para el PCA; sin embargo, esto no sucede y en su lugar se observa una combinación compleja de picos, los cuales no corresponden a PCA.



**Figura 1.** Espectro de una muestra comercial de para-cloroanilina (4-Chloroanilina 98%, Acros Organics) mediante RMN-H1 a 600 MHz.



**Figura 2a.** Grupo HC : mezcla de hipoclorito de sodio 5.25% y clorhexidina 2%.



**Figura 2b.** Espectro mediante RMN-H1 a 600 MHz correspondiente al grupo HC que se obtiene de la mezcla de 0.5 ml de NaOCl 5,25% (Receta magistral, Botica Sáenz) y 0.5 ml de clorhexidina 2% (Clorexil 2% MR Laboratorio Stein S.A.).

Este hallazgo entra en conflicto con Basrani *et al.* (6), Basrani et al. (12) y Basrani et al. (7), quienes anteriormente reportaron que el precipitado producto de la interacción entre clorhexidina e hipoclorito de sodio contenía PCA.

Sin embargo, la espectrometría de masas utilizada en esos estudios como método para caracterizar el precipitado como PCA no es un método concluyente para determinar la presencia o degradación de productos, además uno de sus requerimientos es que la muestra a analizar, sea termoestable pues se debe elevar la temperatura de los compuestos hasta 500°, con el fin de convertir la muestra en una fase gaseosa (13) la

cual puede fragmentar los compuestos de manera que no habría forma de saber si la molécula de clorhexidina se rompió a través de la degradación química o debido al proceso de espectrometría de masa. Por otro lado, en cuanto a la cromatografía de gases también utilizada por Basraniet al. (2009), las muestras son sometidas a temperaturas muy altas (entre 60° y 400°), inclusive la cámara que contiene la muestra siempre se encuentra a 50° por encima del punto de ebullición del componente menos volátil de esta (13), temperatura a la cual también se hidrolizan las moléculas de la clorhexidina (8).

La espectroscopía de RMN-H1 analiza de manera no invasiva y no destructiva moléculas presentes en una muestra. Si una molécula está presente en la solución, el espectro de la mezcla puede ser comparado con una muestra estándar; en este caso, el PCA 98% y los picos resultantes aparecerán con el mismo patrón (singlete, doblete, triplete, etc.) en el mismo desplazamiento químico (8). Si un pico no comparte el mismo patrón y desplazamiento químico, la molécula correspondiente no está presente en la mezcla, como es el caso al comparar los espectros de la Figura 1, que analiza la muestra comercial de PCA 98%, con la Figura 2, en la cual se analiza el precipitado producto de la interacción de NaOCl 5,25% y CHX 2%. Por lo tanto, se concluye que no hay presencia de PCA, resultados que concuerdan con los obtenidos por Thomas et al. (8) así como Nowicki *et al.* (9).

Recientemente, Mortenson *et al.* (14) caracterizan y cuantifican también el precipitado producto de una mezcla de NaOCl 6% y CHX 2% en piezas dentales extraídas mediante cromatografía de gases y espectrometría de masas, con resultados positivos para la presencia

de PCA. A la vez, refutan los resultados obtenidos por Thomas et al. (8) y afirman que la técnica de espectroscopía RMN-H1 de 400MHz es un método poco sensible. Sin embargo, en el presente estudio se utilizó espectroscopía RMN-H1 de 600 MHz, la cual tiene una resolución mayor ya que a mayores campos magnéticos mayor dispersión de las señales en el espectro y mayor sensibilidad en los experimentos (13) siendo así una técnica más exacta y sensible para caracterizar compuestos.

Por lo tanto y de acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio se concluye que el espectro de RMN-H1 600 MHz del precipitado formado al mezclar hipoclorito de sodio 5.25% y clorexidina 2% presenta un patrón diferente al espectro correspondiente a la para-cloroanilina 98% comercial. se infiere que no hay presencia de para-cloroanilina en el precipitado formado y se recomienda la realización de estudios posteriores para determinar su composición.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Orstavik D, Ford TRP. Essential Endodontology: Prevention and Treatment of Apical Periodontitis: Wiley; 1998.
2. Zehnder M. Root canal irrigants. Journal of endodontics. 2006;32(5):389-98.
3. Peters OA, Schonenberger K, Laib A. Effects of four Ni-Ti preparation techniques on root canal geometry assessed by micro computed tomography. International endodontic journal. 2001;34(3):221-30.
4. Haapasalo M, Endal U, Zandi H, Coil JM. Eradication of endodontic infection by instrumentation and irrigation solutions. Endodontic Topics. 2005;10(1):77-102.
5. Kuruvilla JR, Kamath MP. Antimicrobial activity of 2.5% sodium hypochlorite and

- 0.2% chlorhexidine gluconate separately and combined, as endodontic irrigants. *Journal of endodontics*. 1998;24(7):472-6.
6. Basrani BR, Manek S, Sodhi RN, Fillery E, Manzur A. Interaction between sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate. *Journal of endodontics*. 2007;33(8):966-9.
  7. Basrani BR, Manek S, Mathers D, Fillery E, Sodhi RN. Determination of 4-chloroaniline and its derivatives formed in the interaction of sodium hypochlorite and chlorhexidine by using gas chromatography. *Journal of endodontics*. 2010;36(2):312-4.
  8. Thomas JE, Sem DS. An in vitro spectroscopic analysis to determine whether para-chloroaniline is produced from mixing sodium hypochlorite and chlorhexidine. *Journal of endodontics*. 2010;36(2):315-7.
  9. Nowicki JB, Sem DS. An in vitro spectroscopic analysis to determine the chemical composition of the precipitate formed by mixing sodium hypochlorite and chlorhexidine. *Journal of endodontics*. 2011;37(7):983-8.
  10. Van der Bijl P, Gelderblom WC, Thiel PG. On the mutagenicity of parachloroaniline, a breakdown product of chlorhexidine. *The Journal of the Dental Association of South Africa = Die Tydskrif van die Tandheelkundige Vereniging van Suid-Afrika*. 1984;39(8):535-7.
  11. Barbin LE, Saquy PC, Guedes DF, Sousa-Neto MD, Estrela C, Pecora JD. Determination of para-chloroaniline and reactive oxygen species in chlorhexidine and chlorhexidine associated with calcium hydroxide. *Journal of endodontics*. 2008;34(12):1508-14.
  12. Basrani BR, Manek S, Fillery E. Using diazotization to characterize the effect of heat or sodium hypochlorite on 2.0% chlorhexidine. *Journal of endodontics*. 2009;35(9):1296-9.
  13. Skoog DA, Crouch SR, Holler FJ, Anzures MB. *Principios de analisis instrumental / Principles of Instrumental Analysis*: Cengage Learning Latin America; 2008.
  14. Mortenson D, Sadilek M, Flake NM, Paranjpe A, Heling I, Johnson JD, et al. The effect of using an alternative irrigant between sodium hypochlorite and chlorhexidine to prevent the formation of para-chloroaniline within the root canal system. *International endodontic journal*. 2012;45(9):878-82.