

# Análisis espectroscópico del precipitado formado de la mezcla de Hipoclorito de Sodio y Clorhexidina . *Estudio In Vitro*. Parte II

## Spectroscopic Analysis of the Precipitate Formed by Mixing Sodium Hypochlorite and Chlorhexidine. *In Vitro Study*. Part II

Benavides G. Marianella DDS<sup>1</sup>; Hernández M. Erick DDS<sup>1</sup>; Víctor Hugo Soto Tellini PhD<sup>2</sup>

1. Especialista en Endodoncia.
2. Doctorado en Química.

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

Recibido: 12-I-2017

Aceptado: 27-VII-2017

Publicado Online First: 10-VIII-2017

DOI: <http://dx.doi.org/10.15517/ijds.v0i0.30131>

### RESUMEN

El objetivo de este estudio fue analizar el precipitado formado por la interacción de dos disoluciones acuosas: una de hipoclorito de sodio al 5.25% y otra de gluconato de clorhexidina al 2%, por medio de cromatografía de capa fina (TLC) y un análisis detallado de espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN-<sup>1</sup>H a 600 MHz y RMN-<sup>13</sup>C a 100 MHz) en una y dos dimensiones. Para esto, se establecieron 3 grupos de estudio: el Grupo A correspondiente a gluconato puro de clorhexidina que fue liofilizado y secado al vacío, el Grupo B: los precipitados obtenidos al combinar 2 ml de la disolución de gluconato de clorhexidina con 2 ml de la disolución de hipoclorito de sodio y el Grupo C, una muestra comercial de PCA (4-Cloroanilina 98%). El sólido correspondiente al grupo B, fue lavado, centrifugado y seco en estufa de vacío sin calentamiento por más de 72 horas. Una vez seco, se corrieron placas de capa fina (TLC) en diversas mezclas de elución, y se encontró que el precipitado consistía de una mezcla compleja de sustancias similares a la clorhexidina y que no poseía PCA. Los análisis de espectroscopia de resonancia magnética nuclear mostraron que la señal del carbono base del grupo amino de la PCA, a  $\delta/146.5$  ppm (grupo C), no se encontraba en el espectro de <sup>13</sup>C de las muestras del grupo B lo que implica, la ausencia de PCA en la muestra B. El análisis del grupo B por medio de la misma técnica, mostró una mezcla compleja de señales que corresponden probablemente, a estructuras similares a la clorhexidina y a potenciales derivados aromáticos con una estructura similar a esta, nuevamente, no se encuentran evidencias de PCA.

### PALABRAS CLAVE

Hipoclorito de sodio; Gluconato de clorhexidina; Precipitado;  
Resonancia magnética nuclear; Cromatografía de capa fina.

## ABSTRACT

The aim of this study was to analyze the precipitate formed by the mixture of 5,25% sodium hypochlorite (NaOCl) and 2% chlorhexidine (CHX) through thin layer chromatography and nuclear magnetic resonance spectroscopy (RMN-<sup>1</sup>H, 600 MHz and RMN-<sup>13</sup>C to 100 MHz) 1D and 2D spectra. Thus, the following groups were established: Group A corresponds to a pure freeze-dried chlorhexidine gluconate, Group B made-up by a combination of 2ml of chlorhexidine 2% and sodium hypochlorite 5.25% and Group C was a commercial sample of PCA (4-Chloroaniline 98%). The samples of group B were rinsed with distilled water and spinned during 15 minutes at 25°C, the supernatant was eliminated by vacuum and vacuum chamber for 72 hours without heating. Finally, the solid was grinded and dried in vacuum chamber for 24 hours without heating. Thin layer chromatography, shows that sample B were composed by more than one chemical substance and Chlorhexidine, the RMN-<sup>13</sup>C showed that the signal of the amino group characteristic of PCA appears down field ( $\delta/146.5$  ppm) in C group, meanwhile in group B appears up field ( $\delta/129$ ppm), which demonstrates the absence of PCA during the process. The analysis of Group B by RMN-<sup>13</sup>C results also, in different signals of low intensity that correspond to similar structures to chlorhexidine and potential aromatics derivatives with similar characteristics structures to chlorhexidine.

## KEYWORDS

Sodium hypochlorite; Chlorhexidine; Precipitate; Nuclear magnetic resonance;  
Thin layer chromatography; Mass spectrum.

## INTRODUCCIÓN

La terapia endodóntica tiene como objetivo principal eliminar los microorganismos del sistema de conductos radiculares y de esta manera prevenir la reinfección (1). La preparación del conducto radicular es uno de los procedimientos más importantes en el tratamiento radicular, así como, la desinfección y obturación del mismo (2).

Aunque la limpieza y la conformación biomecánica del conducto radicular reduce notoriamente la cantidad de bacterias (3), la completa desinfección del conducto es difícil de obtener debido a la complejidad de su anatomía interna (4) razón por la cual, se debe enfatizar en el uso de medios químicos de limpieza y desinfección del conducto (5).

Para reducir al máximo la carga bacteriana del conducto radicular a lo largo del tiempo se ha sugerido el uso e incluso la combinación de

diferentes sustancias desinfectantes, entre ellas el hipoclorito de sodio, el EDTA, la clorhexidina, el hidróxido de calcio, agua destilada, entre otros (6).

Kuruvilla & Kamath en 1998 (7) afirmaron que una combinación de hipoclorito de sodio al 2.5% y clorhexidina al 2% es más eficaz para la desinfección del conducto radicular pues se aprovecha la sustantividad de la clorhexidina y la capacidad de disolver el tejido orgánico del hipoclorito, esto comparado con el uso de cada solución por separado. Sin embargo estudios posteriores demuestran que la combinación de estas dos sustancias produce un precipitado café caracterizado como PCA y conocido por ser carcinogénico y mutagénico para el ser humano (8).

No obstante, estudios recientes han cuestionado esos hallazgos, entre ellos los realizados por Thomas y col. (9) donde analizaron la molécula del precipitado por medio de resonancia

magnética nuclear (RMN-<sup>1</sup>H) de 400 MHz y concluyeron que en este, no existe presencia de PCA. Nowicki y col. (10) 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).

De igual manera en la primera parte de esta investigación, se analizó el precipitado en cuestión, utilizando resonancia magnética nuclear (RMN-<sup>1</sup>H) de 600 MHz y se obtuvo un espectro que muestra una compleja combinación de señales, en las que parece no haber ninguna generada por la PCA (11).

En el 2008 Bui (12) estudió la interacción de hipoclorito de sodio 5.25% y clorhexidina 2%, así como su efecto en el conducto radicular, utilizando microscopía electrónica de barrido (MEB), observándose que el precipitado reduce significativamente la permeabilidad de los túbulos dentinarios a diferentes niveles del conducto. Este precipitado actúa como un barro dentinario químico reduciendo la permeabilidad en el tercio apical (13). En ambos estudios se refieren al precipitado marrón, pero no aportan información con respecto a la naturaleza o composición del mismo.

Por la sinergia lograda al utilizar en combinación NaOCl 5.25% y CHX 2% durante el tratamiento del conducto radicular, merece la utilización de ambas sustancias en el protocolo de irrigación, además de la aplicación de la clorhexidina como medicamento intraconducto entre citas. Sin embargo debido al desconocimiento preciso de la naturaleza del precipitado, así como de sus implicaciones en el tratamiento endodóntico, actualmente no se recomienda. Así este estudio tiene como objetivo analizar la estructura del precipitado formado de la interacción entre hipoclorito de sodio 5.25% y clorhexidina 2%, por medio de cromatografía de capa fina (analítica

y preparativa) y un análisis de los espectros de resonancia magnética nuclear RMN-<sup>1</sup>H 600 MHz y RMN-<sup>13</sup>C a 100 MHz en una y dos dimensiones.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Las muestras de estudio se distribuyeron en tres grupos, para el Grupo A. gluconato puro de clorhexidina: la disolución comercial fue inicialmente liofilizada en el Centro de Investigaciones en Productos Naturales (CIPRONA) de la Universidad de Costa Rica, posteriormente, el sólido obtenido, se secó en desecador de vacío (24 horas). El Grupo B: se obtuvo un sólido de color anaranjado al mezclar 2ml de Gluconato de Clorhexidina al 2% (Clorexil 2% MR Laboratorio Stein S.A.), con 2ml de hipoclorito de sodio al 5,25% (Receta Magistral, Botica Sáenz). El precipitado naranja, se obtuvo luego de centrifugar (Hamilton Bell, VanGuardV6500) 15 minutos. La mezcla se filtró al vacío y se lavó con tres porciones de 50 ml de agua destilada. El sólido se secó en una estufa de vacío sin calentamiento, por 72 horas. Luego de este tiempo, se trituró y se secó adicionalmente 24 horas más sin calentamiento. Grupo C: Muestra comercial de PCA (4-Cloroanilina 98% Acros Organics), se utilizó sin ningún tratamiento previo.

TLC: Se realizaron varios análisis de cromatografía de capa fina, con los siguientes eluentes: Mezcla de elución 1: Alcohol, acetato de etilo, hidróxido de amonio y agua destilada 5:1:1:3 respectivamente. Mezcla de elución 2: Acetato de etilo, isopropanol, amoníaco y agua destilada 2:3:4:0,3 respectivamente. Mezcla de elución 3: Metanol puro. Las placas fueron reveladas con tres disoluciones y calor: Disolución reveladora 1: Compuesta por 95ml de metanol y 5ml de ácido sulfúrico.

Disolución reveladora 2: se empleó ninhidrina en etanol al 2% como agente revelador.

Disolución reveladora 3: compuesta por 4% ácido sulfúrico concentrado, 16% de ácido acético concentrado y 80% de agua destilada. Para el revelado de las placas, se utilizó también, una lámpara ultravioleta.

Luego de la caracterización mediante TLC se separa mediante 4 folios de 20X20 cm., una muestra de 160 mg del precipitado, con el fin de caracterizar los componentes del precipitado. (TLC preparativo). Espectroscópicamente. Se aplicaron 40 mg de la muestra en cada placa cromatográfica y se secaron al aire. Las placas se corrieron en metanol puro. Luego se revelaron con la lámpara UV, se marcaron y rasparon de la placa las zonas que muestran compuestos. La silica se extrae con tres porciones de metanol, se filtró, evaporó al vacío y secó en desecador de vacío por 12 horas. Las muestras se emplearon para los análisis de RMN, sin mayor purificación.

Los análisis de RMN de protón ( $^1\text{H}$ -RMN) y carbono ( $^{13}\text{C}$ -RMN) en una y dos dimensiones, se realizaron en dimetil sulfóxido perdeuterado, en un equipo de 600 MHz de la marca Bruker modelo Ascend en el Centro de Investigación en productos naturales (CIPRONA) de la Universidad de Costa Rica.

## RESULTADOS

La cromatografía de capa fina mostró que a pesar de que se generan otras sustancias, gran parte del gluconato queda intacto. No se detectó mediante TLC, la presencia de PCA. Se lograron separar mediante TLC preparativo, dos bandas: una con una menor polaridad y la otra mayoritaria

más polar, correspondiente al gluconato de clorhexidina. La cantidad de material obtenido por este medio no fue suficiente para su análisis. Por lo tanto, se analizaron los precipitados obtenidos sin purificar por RMN.

Con respecto al análisis de Resonancia Magnética Nuclear de  $^{13}\text{C}$  a 100 MHz, se establece una señal a campo bajo de  $\delta$ : 148.1 ppm para la muestra del grupo C que corresponde al carbono base del grupo amino presente en el PCA (Figura 2).

Para el grupo A se demuestran los desplazamientos químicos de las señales aromáticas y no se aprecian señales a campo bajo (cerca de  $\delta$ : 150 ppm), la señal que presenta el carbono base del nitrógeno aromático sustituido aparece a  $\delta$ : 136.6 ppm (Figura 3). Con respecto al grupo B se determinó en la región aromática de la muestra señales en un ámbito de  $\delta$ : 127 a 129 ppm y tampoco se registraron señales cerca de  $\delta$ : 150 ppm (Figura 4).

La asignación de las señales del gluconato de clorhexidina se muestra en la Figura 4. Para esta asignación, se emplearon los espectros en una dimensión de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ . Así como los bidimensionales: COSY, HSQC-edited y HMBC.

En la figura 5 se muestra el espectro de  $^1\text{H}$  de una muestra correspondiente al grupo B y en la Figura 6, el espectro de  $^{13}\text{C}$  de la misma. Se aprecia de nuevo que esta muestra se compone básicamente de gluconato de clorhexidina y subproductos con características similares. Se emplean también.

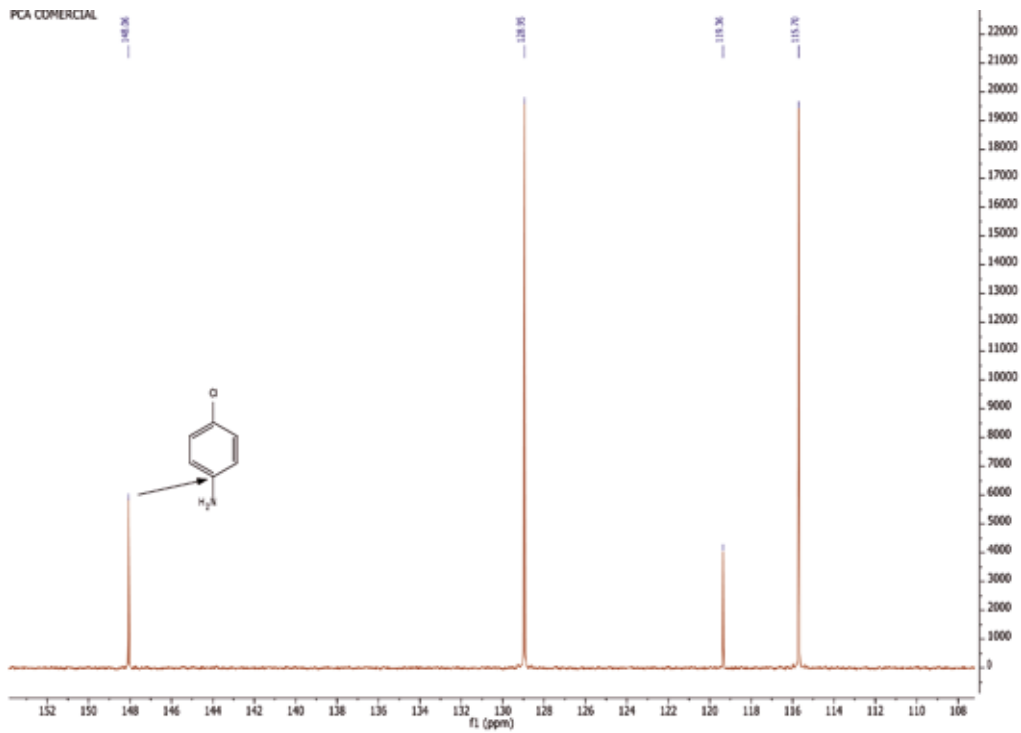


Figura 1. RMN<sup>13</sup>C para una muestra comercial de comercial de PCA 98%, Acros Organics.

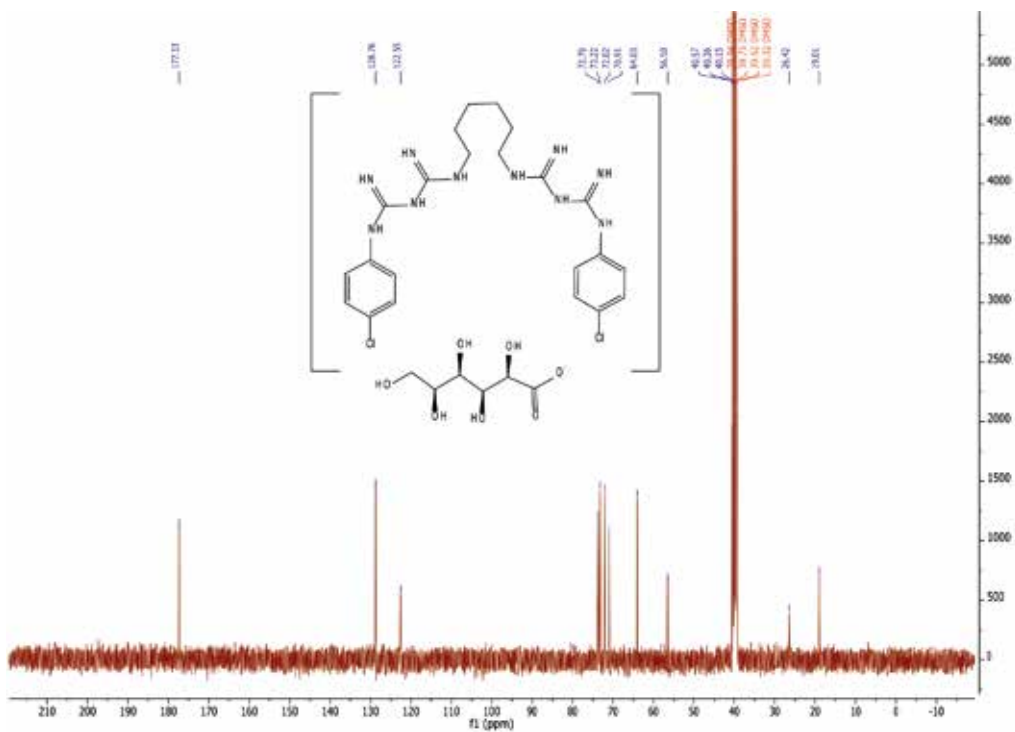
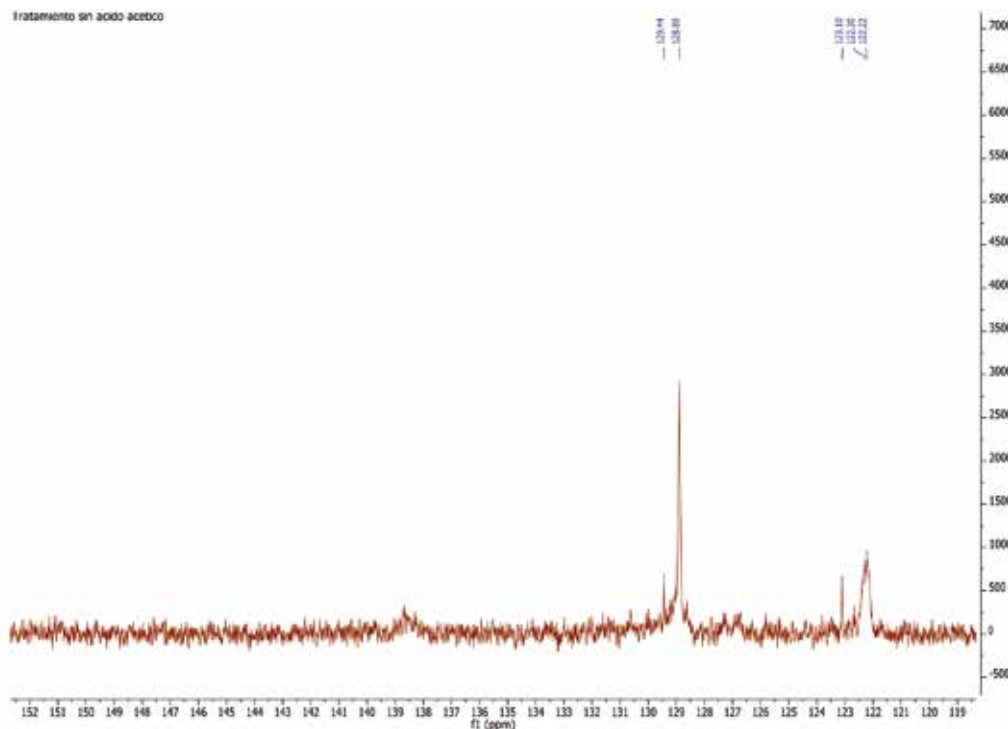
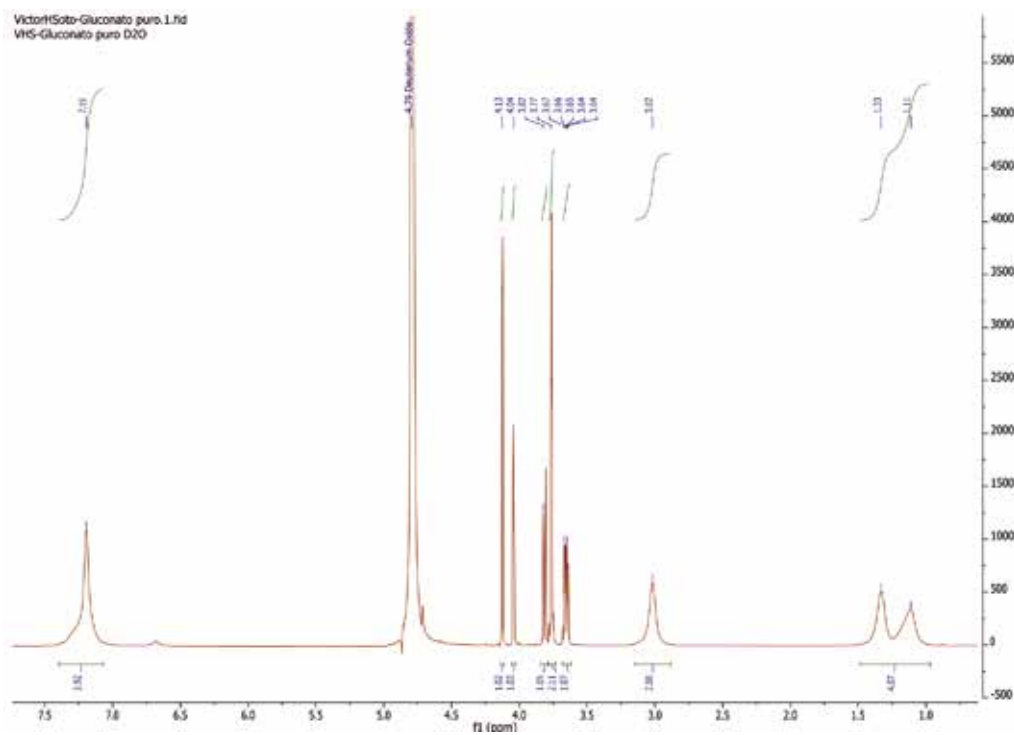


Figura 2. Espectro de <sup>13</sup>C de una muestra comercial de Gluconato de Clorhexidina.



**Figura 3.** Espectro de RMN<sup>13</sup>C de la muestra NaOCl 5,25% (Receta magistral, Botica Sáenz), y clorhexidina 2% (Clorexil 2% MR Laboratorio Stein S.A.).



**Figura 4.** Espectro de mediante RMN-<sup>1</sup>H a 100 MHz de una muestra comercial de gluconato de clorhexidina 100% (CIPRONA, Universidad de Costa Rica) en D<sub>2</sub>O.

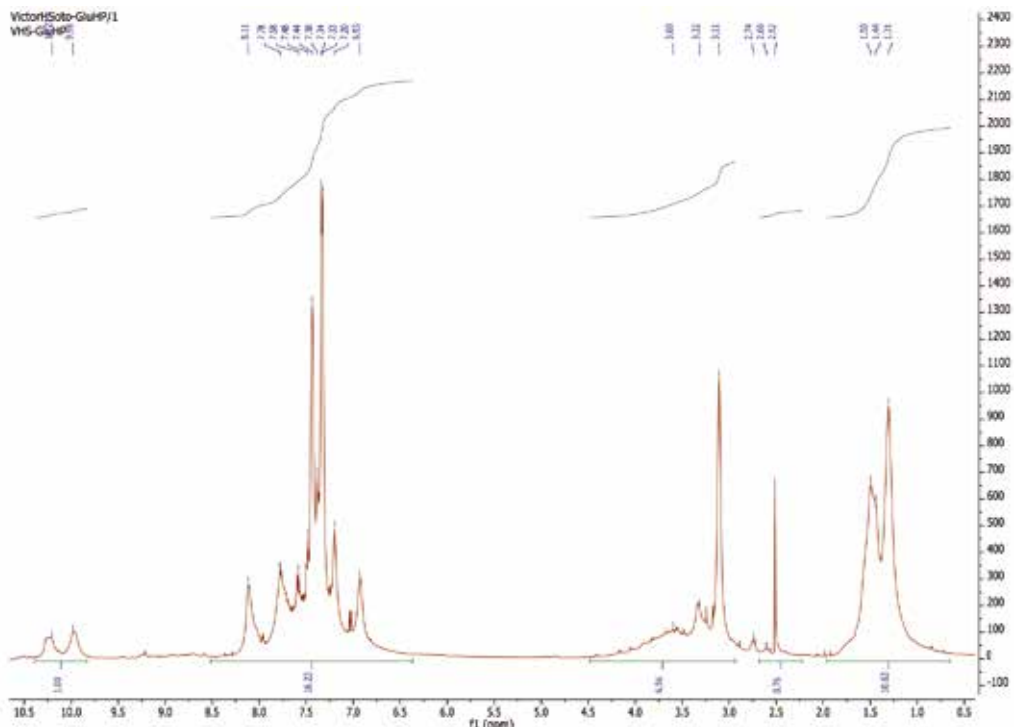


Figura 5. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H a400 MHz del Grupo 2.

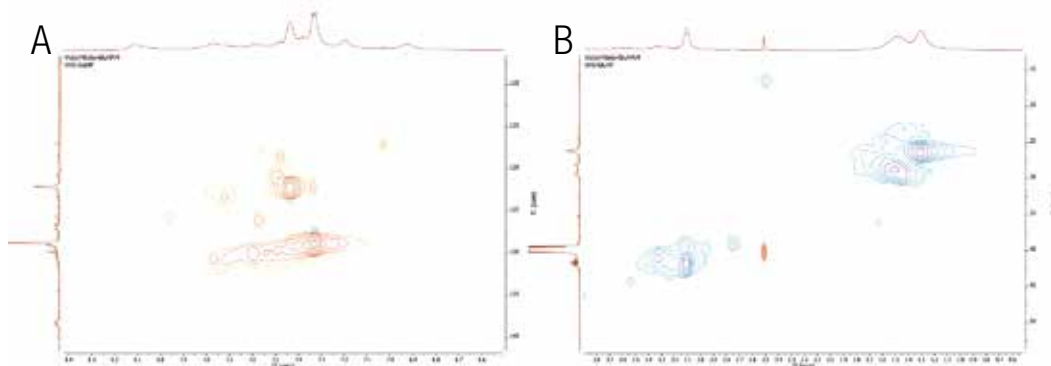


Figura 6. Sección del espectro HSQC editado para el Grupo B.

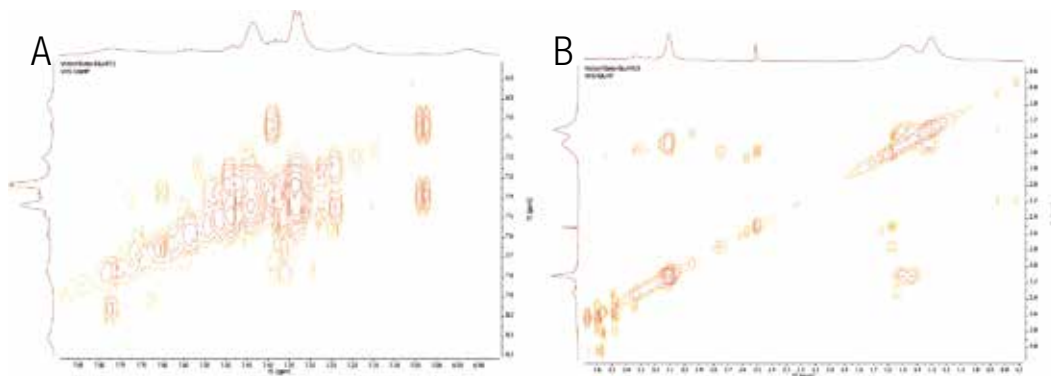


Figura 7. Espectro COSY del Grupo B, A) Detalle de la región aromática, B) Detalle de la región alifática.



## DISCUSIÓN

Las cromatografías desarrolladas en la presente investigación permitieron aislar 2 compuestos del grupo B que no pudieron ser analizados por su poca cantidad. Sin embargo, se determinó que después del tratamiento la mayor parte del gluconato se mantiene sin descomponerse.

De acuerdo a los análisis realizados a las diferentes muestras por medio de RMN de  $^{13}\text{C}$  a 100 MHz, se logra rescatar que en el espectro obtenido para una muestra de PCA comercial se marca claramente una señal a campo bajo correspondiente al grupo amino propio de la para cloroanilina. De la misma forma al analizar muestras de gluconato de clorhexidina se observaron señales en el espectro que coinciden con los grupos aromáticos propios y no se detectaron señales a campo bajo, lo que nos permite confirmar esta metodología como una manera factible para analizar esta sustancia sin alteraciones en su composición.

Lo anterior resulta relevante ya que, se ha demostrado que la clorhexidina puede hidrolizarse espontáneamente en presencia de calor y luz (14). Barbin y col. (15) detectaron la presencia de PCA en una solución acuosa de clorhexidina 0,2% a 36,5 °C después de 14 días. Así mismo, Basrani, Manek & Fillery (16) demostraron que el calentamiento de la clorhexidina 2% a 45 °C causa la formación inmediata de para-cloroanilina, por lo que una metodología que altere la propiedades físicas y químicas de la clorhexidina podría afectar directamente los resultados (7).

Metodologías anteriormente utilizadas como: la espectrometría de masas por Basrani, Manek & Sodhi (17) como método para caracterizar el precipitado como PCA implicó elevar la temperatura de los compuestos hasta 500° inclusive, con el fin de convertir la muestra en una fase gaseosa la cual puede fragmentar los compuestos de manera

que no habría forma de saber si la molécula de CHX se rompió a través de la degradación química o debido al proceso de espectrometría de masas afectando los resultados (17,18). Por otro lado, en cuanto a la cromatografía de gases también utilizada por Basrani, Manek & Fillery (16), las muestras también 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 temperatura provocando también que se hidrolizen las moléculas de la CHX (7, 18).

En el espectro observado en la figura 3 se destaca la región aromática de las muestras del precipitado formado por la interacción entre el NaOCl 5,25% y Gluconato de clorhexidina 2% (grupo B). Se puede determinar a partir de estos datos que en este precipitado no se encuentran señales a campo bajo, por lo tanto en definitiva podemos asegurar que el producto de dicha interacción no es PCA. Este hallazgo entra en conflicto con Basrani, Manek & Sodhi (17), Basrani, Manek & Fillery (16) y Basrani, Manek & Mathers (7), quienes anteriormente reportaron que el precipitado producto de la interacción entre CHX 2% y NaOCl 5,25% contenía PCA (7, 16-17) y apoya los resultados obtenidos recientemente por Thomas & Sem (9), Nowicki & Sem (10), así como Prado Maira y col. (19).

Otras señales del espectro correspondiente a la muestra del grupo 2 son: a  $\delta$ / ppm: 128.7 y 122.1 características del gluconato de clorhexidina así como las señales  $\delta$ /ppm: 26.3 a 29.3 correspondientes a los metilenos de la cadena interna. Se observan además las señales a  $\delta$ / ppm: 160.3 y 155.2 características de los enlaces C=NH de los grupos Guanidino (Figura 6).

En el espectro de HSQC editado para el grupo 2 (Figura 7) se observa nuevamente la solidez de la estructura de la clorhexidina para



el tratamiento efectuado ya que se aprecian muy claramente las señales de los dos tipos de protones aromáticos correlacionándose con los carbonos correspondientes. Asimismo, se observaron correlaciones con señales de muy baja intensidad que sugieren otros productos aromáticos presentes. En la región de campo alto (región saturada de la molécula) se demostraron también las señales clásicas de la cadena de metilenos central de la clorhexidina, así como una correlación en  $\delta$ /ppm: 2.49 con 16.7 que podría corresponder a alguna impureza.

El COSY (Figura 8) muestra que a  $\delta$ /ppm: 8.03 es posible que se encuentre el protón unido a la amina contigua al primer metileno de la cadena (correlaciona con la señal de 3.11). El resto de las correlaciones ( $\delta$ /ppm: 7.44 con 7.33; 3.11 con 1.50 y 1.50 con 1.32) se siguen apareciendo en los espectros de señales a baja intensidad que indican en todo caso que se ha obtenido en muy pequeña proporción uno o más compuestos con estructura similar a la clorhexidina.

Por lo tanto y de acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio se concluye que el precipitado producto de la interacción entre hipoclorito de sodio 5,25% y Clorhexidina 2% no corresponde a una sola sustancia y dentro de sus contenidos se descarta la presencia de PCA pues no se registraron señales a campo bajo.

Los análisis realizados mediante  $^{13}\text{C}$  demostraron que en este tipo de manipulación el gluconato de clorhexidina no genera PCA, comprobando ser un análisis confiable para su estudio.

## AGRADECIMIENTOS

Facultad de Química de la Universidad de Costa Rica, Centro de Investigaciones en Productos Naturales (CIPRONA), Carolina Céspedes Víquez, Gema Flores Cruz, Jesús Sánchez Benavides, Juan Ignacio Orozco Muñoz, Alexander Villalobos Montero.

## REFERENCIAS

1. Mortenson D., Sadilek M., Flake N. M., Paranjpe A., Heling I., Johnson J. D., 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.
2. Peters O. A., 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.
3. Basrani, B., Friedman, S., Paquette, L., Torneck, C. & Tervit, C. Proportion of Healed Teeth With Apical Periodontitis Medicated With Two Percent Chlorhexidine Gluconate Liquid: A Case-Series Study. *Journal Of Endodontics*. 2009, 1182-1185.
4. Krishnamurthy, S. & Sudhakaran, S. Evaluation and Prevention of the Precipitate Formed on Interaction between Sodium Hypochlorite and Chlorhexidine. *Journal Of Endodontics*. 2010, 1154-1157.
5. Haapasalo, M., Shen, Y., Qian, W. & Gao, Y. Irrigation in Endodontics. *Endodontic Topics*, 2010, 291-312.
6. Zehnder, M. Root Canal Irrigants. *Journal Of Endodontics*. 2006, 389-398.
7. Basrani, Manek, & Mathers. Determination Of 4-chloroaniline And Its Derivatives Formed In The Interaction Of Sodium Hypochlorite And Chlorhexidine And Using Gas Chromatography. *Journal Of Endodontics*. 2010, 131-134.
8. Kuruvilla, J. & Kamath, M. Antimicrobial activity of 2.5% sodium hypochlorite and 0.2% chlorhexidine gluconate separately and combined, as endodontic irrigants. *Journal Of Endodontics*. 2008, 472-476.
9. Thomas, J. & Sem, D. An In Vitro Spectroscopic Analysis to Determine Whether Para-Chloroaniline Is Produced from Mixing

- Sodium Hypochlorite and Chlorhexidine. *Journal Of Endodontics*. 2011, 1-10.
10. Nowicki, J. & Sem, D. An In Vitro Spectroscopic Analysis to Determine the Chemical Composition Of The Precipitate Formed By Mixing Sodium Hypochlorite And Chlorhexidine. *Journal Of Endodontics*. 2011, 983-988.
  11. Benavides, M. & Hernández, E. Análisis Espectroscópico del precipitado formado por la mezcla de hipoclorito de sodio y clorhexidina utilizando resonancia magnético nuclear. *Odovtos International Journal of Dental Sciences* 2015. Vol 17, Núm 13.
  12. Bui, T., Baumgartner, J. & Mitchell, J. Evaluation Of The Interaction Between Sodium Hypochlorite And Chlorhexidine Gluconate And Its Effect On Root Dentin. *Journal Of Endodontics*. 2008,181-185.
  13. Akisue, E., Gavini, G., Poli de Figueiredo, J., & Tomita, V. Effect Of The Combination Of Sodium Hypochlorite And Chlorhexidine On Dentinal Permeability And Scanning Electron Microscopy Precipitate Observation. *Journal Of Endodontics*. 2010, 847-850.
  14. Van der Bijl P, Gelderblom W, Thiel P. On the mutagenicity of parachloroaniline, a breakdown product of chlorhexidine. *J Dent assoc S Afr*. 1984, 39: 535-7.
  15. Barbin, L., Saquy, P., Sousa-Neto, M., Costa Guedes, D., Estrela, C. & Djalma Pécora, J. Determination of para-Chloroaniline and Reactive Oxygen Species in Chlorhexidine and Chlorhexidine Associated with Calcium Hydroxide. *Journal of Endodontics*. 2008, 1508-1514.
  16. 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.
  17. Basrani, B., Fillery, E., Manek, S., Manzur, A. & Sodhi, R. Interaction between Sodium Hypochlorite and Chlorhexidine Gluconate. *Journal Of Endodontics*. 2009, 966-969.
  18. Skoog, D. A., Crouch, S. R., & Holler, F. J. (Principles Of Instrumental Analysis). Mexico D.F. 2008.
  19. Prado, M., Santos Junior, H., Resende, C., Pinto, A., Faria, R., Simao, R. & Gomes, B. Interactions between Irrigants Commonly Used in Endodontic Practice: A Chemical Analysis. *Jornal Of Endodontics*. 2013, 505- 510.



Attribution (BY-NC) - (BY) You must give appropriate credit, provide a link to the license, and indicate if changes were made. You may do so in any reasonable manner, but not in any way that suggest the licensor endorses you or your use. (NC) You may not use the material for commercial purposes.