



**EVALUACIÓN DE LA FORMACIÓN DE PRECIPITADOS SÓLIDOS DE
PARACLOROANILINA AL REALIZAR UNA MEZCLA BINARIA DE
CLORHEXIDINA Y SALIVA**

**Trabajo de investigación
Requisito para optar al
Título de Cirujano Dentista**

Integrantes: Fernanda Mena Becerra.
Giampaolo Pallavicini Moreno.
Jearitza Rios Muñoz.

Docente Guía: Prof. Dr. Carlos Marchant Pizarro.
Cátedra de Endodoncia.

Valparaíso – Chile

2016

AGRADECIMIENTOS

A nuestras familias y pareja por el apoyo incondicional durante todos estos años de carrera, a nuestro docente guía Dr. Carlos Marchant por el empuje y perseverancia otorgado durante este proceso y a Luis Roa, espectrometrista laboratorios SGS colaborador en el análisis químico haciendo posible este estudio.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
MARCO TEÓRICO.....	2
1. SALIVA.....	2
1.1. Funciones de la saliva	2
1.2. Componentes de la saliva	3
1.3. Influencia de la edad en la composición salival	6
1.4. Influencia de la enfermedad periodontal en la composición salival	6
1.5. Influencia de la actividad Cariógena en la composición salival	7
1.6. Volumen y composición salival con respecto al ciclo circadiano	7
1.7. Influencia de la dieta alimenticia en la composición salival	8
1.8. Influencia del embarazo en la composición salival	8
1.9. Volumen y Composición salival en relación al estado sistémico del paciente.	8
1.10. Influencia del consumo de fármacos en la composición salival	9
1.11. Influencia del alcoholismo en la composición salival	9
1.12. Influencia del tabaquismo en la composición salival.....	10
2. CLORHEXIDINA	10
2.1. Mecanismo de acción	10
2.2. Concentraciones.....	11
2.3. Efectos Adversos.....	11
2.4. Indicaciones orales	12
2.5. Presentaciones	12
3. PARACLOROANILINA.....	13
3.1. Relación con Hipoclorito de Sodio	13
3.2. Efectos Adversos.....	13
3.3. Formación de PCA en presencia de Clorhexidina	14
4. QUÍMICA ANALÍTICA - ESPECTOMETRÍA DE MASAS	14
4.1. Funcionamiento del espectrómetro de masas	15
4.2. Componentes del Espectrómetro de masas	15

4.3.	Tipo de Espectrómetros de masas	15
4.4.	Espectros de Masa	17
OBJETIVOS E HIPÓTESIS		18
5.	OBJETIVOS GENERALES	18
6.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
7.	HIPÓTESIS	18
MATERIALES Y MÉTODO		19
8.	DISEÑO DEL ESTUDIO.....	19
9.	MUESTRA/UNIVERSO	19
10.	VARIABLES	20
11.	MATERIALES	21
12.	CRITERIOS DEL DONADOR	22
12.	OBTENCIÓN DE LA MUESTRA	22
13.	PROCEDIMIENTO METODOLÓGICO DE MUESTRAS.....	22
14.	INSTRUMENTO DE MEDICIÓN	23
15.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	23
16.	APROBACIÓN DEL COMITÉ DE BIOSEGURIDAD	23
RESULTADOS.....		24
DISCUSIÓN.....		29
CONCLUSIÓN.....		34
SUGERENCIAS.....		35
RESUMEN.....		36
BIBLIOGRAFIA.....		37

INTRODUCCIÓN

En la práctica clínica cotidiana, la utilización de sustancias químicas para complementar los tratamientos odontológicos es cada vez más frecuente y ha logrado controlar múltiples complicaciones que se generan por la falta de higiene y cuidados de parte de los pacientes, ya que, a través de estas sustancias se controla la carga bacteriana limitando dichas complicaciones. Las sustancias químicas actualmente se presentan en diferentes formatos, es así como se encuentran los dentífricos, geles y principalmente, los colutorios. Se han identificado una gran cantidad de estas sustancias, de las cuales, la que posee mayor evidencia sobre su utilización es la Clorhexidina. Esta se indica por su acción antibacteriana en diferentes especialidades como lo es en Periodoncia, Implantología, Prótesis Fija y Removable y Endodoncia.

La incorporación de la Clorhexidina como irrigante intraconducto en Endodoncia ha generado buenos resultados clínicos, pero, por otra parte se observa que dentro de sus reacciones de degradación, al utilizarse en combinación con otros irrigantes intraconducto, es capaz de hidrolizarse y generar un precipitado sólido de Paracloroanilina (PCA), el cual genera complicaciones para la terapia endodóntica, tales como, obliteración de los túbulos dentinarios, obstrucción en el sellado de la gutapercha, filtración hacia el periápice, además de su comprobado potencial tóxico, mutagénico y carcinógeno en animales. En base a lo anterior, es razonable esperar la posible degradación de la Clorhexidina al ser utilizado con un antiséptico en forma de colutorio, obteniendo así, este compuesto tóxico disponible en nuestro organismo.

La potencialidad de la formación de PCA debido a las interacciones químicas de la Clorhexidina, su normal e inherente degradación y posibles reacciones al interactuar con otras sustancias, ha sido comprobada en variados estudios previos, *in vitro*, los cuales demuestran que sólo es necesaria la hidrólisis de la molécula para que aparezca este elemento no deseado. De acuerdo a lo señalado anteriormente se puede afirmar que la Clorhexidina es un agente antiséptico ampliamente utilizado en la Odontología, el cual, al ser aplicado en la cavidad bucal, entra en relación con los diferentes componentes que posee la saliva, es por ello, que cabe preguntarse si: ¿La Clorhexidina generará el precipitado sólido de PCA al momento de mezclarse con la saliva?

En la actualidad, no existe evidencia científica que evalúe la generación de este precipitado al generar la mezcla binaria de Clorhexidina y saliva, por lo que dicha información será útil para contribuir con la salud general de los pacientes.

MARCO TEÓRICO

1. SALIVA

La saliva cumple un rol muy importante en la mantención de la salud oral. Se compone de un 99% de agua y sólo un 1% de moléculas orgánicas e inorgánicas¹.

Es una secreción compleja proveniente de las glándulas salivales mayores (parótida, sublingual y submandibular), en el 93% de su volumen y de las glándulas salivales menores en el 7% restante, las cuales se extienden por toda de la cavidad oral excepto en la encía y en la porción anterior del paladar duro.

La saliva es estéril al momento de abandonar las glándulas salivales, pero pierde esta propiedad al mezclarse con el fluido crevicular, detritus, microorganismos, células descamadas de la mucosa oral, etc.

La secreción diaria oscila entre 500 - 700 mL, con un volumen medio de 1,1L. Su producción está controlada por el sistema nervioso autónomo, en reposo, la secreción oscila entre 0,25 y 0,35 mL/min y procede sobre todo de las glándulas submandibulares y sublinguales. El mayor volumen salival se produce antes, durante y después de las comidas, alcanzando su máxima producción alrededor del mediodía y disminuye de forma considerable al anochecer, especialmente durante el sueño².

1.1. Funciones de la saliva incluyen³:

- Lubricar los tejidos orales.
- Potenciar el sentido del gusto, actúa como solvente para iones, y a través de la proteína gustina.
- Mantener la salud de la mucosa oral, mediante factores de crecimiento que fomentan la cicatrización de heridas, y cistatinas que inhiben las enzimas destructivas tales como las cisteína proteasas.
- Contribuir con la digestión, mediante amilasa y lipasa.
- Diluir y limpiar material de la cavidad oral.
- Amortiguar los ácidos de la placa dental y de los alimentos ingeridos, y previene erosiones causadas por la exposición prolongada a los ácidos débiles o exposición a corto plazo de ácidos fuertes.
- Almacenar iones (calcio, fósforo, y fluoruro) que contribuyen con la remineralización.
- Controlar la microflora oral, mediante mediadores inmunológicos (IgA), enzimáticos, pépticos y químicos.

1.2. Componentes de la saliva

La composición de la saliva varía según el sitio de la cavidad oral de cada individuo, y por lo general sus componentes son de carácter hidrofílicos con excepción, como la lipasa, que es de carácter hidrofóbico.

La saliva puede ser considerada como un filtrado del suero puesto que se deriva de la sangre, su proceso de producción está unido al equilibrio del fluido corporal y el flujo de sangre a través de las glándulas salivares, el cual tiene un efecto mayor sobre la producción de saliva. El 99% del volumen es agua, y sirve como solvente para otros componentes que la forman³.

La saliva parotídea (también llamada saliva serosa) es alta en iones de bicarbonato y amilasa, mientras que la secreción de la glándula submandibular (saliva mucinosa) es alta en mucina y calcio. En realidad, la concentración de calcio en la saliva submandibular (3.7 mmol/L) es bastante más alta que en el plasma (2.5 mmol/L) o en la saliva entera reunida (1.35 mmol/L)³.

1.2.1. *Componentes orgánicos proteicos totales en saliva*⁴

- Albúmina: produce enlaces aromáticos.
- Amilasa: función digestiva, puede descomponer féculas y glicógenos y restringe el crecimiento de algunas especies de bacteria.
- β -glucuronidasa: miembro de las glucosidasas familia de enzimas que rompen el complejo de carbohidratos, catalizan la hidrólisis de beta D ácido glucorónico, además útil como biomarcador frente al desarrollo de enfermedad periodontal.
- Carbohidrasas: se dividen en dos categorías; polisacaridasas siendo las más comunes las amilasas que hidrolizan todo excepto los enlaces glucosídicos terminales del almidón y glucógeno y las glucosidasas hidrolizan los enlaces glucosídicos de los carbohidratos de cadena larga.
- Cistatinas: inhiben la acción de algunas cisteínas proteasas.
- Factor de crecimiento epidermal: su función es mantener la integridad de los tejidos, actuando principalmente sobre los receptores de superficies celulares de epitelios.
- Esterasas: dentro de ellas la estaterina que produce remineralización.
- Fibronectina: glucoproteína presente en pequeñas cantidades induce agregación bacteriana y sus niveles se reducen cuando aumentan los niveles de bacterias cariogénicas o periodontopatógenas.
- Gustatinas o gustina: que agudiza el gusto.
- Histatinas: proteínas ricas que inhiben el crecimiento de *Candida albicans* y *Streptococo mutans*.
- Inmunoglobulinas A, G y M: capaz de aglutinar bacteria e impedir la adhesión y otras provenientes del surco gingival.

- Calicreínas: es una proteasa sérica que libera cininas, influyendo en la activación de los factores de coagulación, constituyendo así, un importante factor en la inflamación y coagulación sanguínea.
- Lactoferrina: une iones férricos y por eso impide que las bacterias obtengan el nutriente esencial de hierro. Puede ser degradada por algunas proteasas bacterianas.
- Lipasa: secreta de las glándulas de von Ebner, al ser hidrofóbica, puede introducir glóbulos de grasa en donde se descomponen los ácidos grasos.
- Deshidrogenasa láctica: enzimas capaces de catalizar la oxidación o reducción de un sustrato.
- Lisozima: descompone el peptidoglicano en la pared de la célula de algunas bacterias positivas Gram e inclusive de *Streptococo mutans*.
- Mucinas: son glicoproteínas, que existen forma de bajo y alto peso, las sulfomucinas de peso molecular bajo ayudan a limpiar la cavidad oral de bacterias al unirse con microorganismos y aglutinarlos. Los niveles de mucinas de peso molecular bajo (como MG2) en la saliva en reposo, disminuyen con la edad. Al unirse con el agua ayuda en la viscosidad de la saliva.
- Peptidasas: enzimas que rompen los enlaces peptídicos de las proteínas.
- Fosfatasas: enzima hidrolasa responsable de eliminar grupos de fosfatos de diferentes tipos de moléculas.
- Proteínas ricas en Prolina: constituyente principal de la película adquirida.
- Ribonucleasas: participan dentro de la función digestiva.
- Peroxidasa: cataliza la oxidación de tiocianato salival por peróxido de hidrógeno a la molécula tóxica hipotiocianato, que desactiva las enzimas bacterianas

1.2.2. Constituyentes no proteicos de la saliva⁴

- Úrea.
- Amonio.
- Aminoácidos.
- Factores de grupos sanguíneos.
- Glucosas.
- Lactato.
- Citratos.
- Algunos de los factores de coagulación.
- Factores fibrinolíticos o activadores de fibrinólisis.
- Creatinina.
- Lípidos.
- Nitrógeno.
- Ácido siálico.
- Ácido úrico.

1.2.3. Electrólitos salivales⁴

- Sodio: compone la saliva pero en concentraciones muy bajas, hipotónicas.
- Cloro: Permite el transporte de sodio y agua, favoreciendo la osmosis.
- Potasio: ayuda en la regulación del equilibrio ácido-básico.
- Calcio: función amortiguadora regulando el pH salival
- Bicarbonato: tampón biológico, se puede combinar con un protón (H⁺) para formar ácido carbónico (H₂CO₃), absorbiendo así protones de la disolución y elevando el pH. El ácido carbónico, que se puede formar a partir de CO₂ y agua, puede disociarse en H⁺ y HCO₃ para proporcionar H⁺ y bajar el pH.
- Fosfato inorgánico: Neutraliza el pH de los alimentos ácidos y de la corrosión bacteriana
- Yoduro inorgánico: estimulación salival, la cual oxida los alimentos que serán ingeridos al estómago.
- Fluoruros: en el cuerpo humano se encuentra en forma de fluorapatita o fluorhidroxiapatita, al secretarse por la saliva cumple con su función protectora dentro de la cavidad oral contra microorganismos.
- Magnesio: participa en el intercambio entre moléculas e iones.

Funciones	Componentes
Lubricación	Mucina, glicoproteínas ricas en prolina, agua
Antimicrobiana	lisocima, lactoferrina, lactoperoxidas, mucinas, cistinas, histatinas, inmunoglobulinas, proteínas ricas en prolina, Ig A
Mantenimiento de la integridad de la mucosa	Mucinas, electrolitos, agua
Limpieza	Agua
Capacidad tampón y remineralización	Bicarbonato, fosfato, calcio, staterina, proteínas aniónicas ricas en prolina, flúor
Preparación de los alimentos para la deglución	Agua, mucinas
Digestión	Amilasa, lipasa, ribonucleasas, proteasas, agua, mucinas
Sabor	Agua, gustina
Fonación	Agua, mucina

Tabla I: Se presentan las funciones de la saliva y los componentes responsables de esta función. Extraída de “La saliva en el mantenimiento de la salud oral y como ayuda en el diagnóstico de algunas patologías”²

Estos componentes salivales pueden ser modificados cuantitativa y cualitativamente, por diversos factores, los cuales serán mencionados a continuación, pero cabe destacar que, al controlarlos, un paciente podría obtener una saliva pura correspondiente con la fisiología y fisonomía normal de la saliva.

1.3. Influencia de la edad en la composición Salival

La saliva de los adultos mayores presenta un bajo porcentaje de proteínas, si bien, a la fecha se han descrito más de 1000 tipos diferentes de proteínas, sus propiedades bioquímicas de muchas de ellas están aún en estudio y se describe que el proceso de envejecimiento podría alterar el contenido proteico de la saliva. Según Castro y "cols.", 2012, al comparar la concentración total de proteínas salivales de adultos y adultos mayores, demostró que las características de las proteínas salivales de los jóvenes eran significativamente diferentes a las de los adultos.

Los adultos tuvieron una concentración de proteínas en la saliva no estimulada de $3.2 \pm 1.7 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, mientras que en los adultos mayores fue de $5.5 \pm 2.6 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, diferencia que resultó estadísticamente significativa ($p < 0.05$). Los resultados de esta investigación muestran que a medida que avanza la edad, aumenta el número de proteínas salivales totales, independientemente del sexo de las personas. En relación al número de proteínas salivales específicas y envejecimiento, algunos autores sostienen que hay una disminución en los niveles salivales de Inmunoglobulina M e inmunoglobulina G asociadas a este proceso, sin embargo, los valores para IgA se mantendrían estables conforme avanza la edad de los individuos¹.

1.4. Influencia de la enfermedad periodontal en la composición Salival

Basándose en los resultados del estudio de Tatjana Todorovic y cols, 2006, los cuales, confirmaron que la actividad de las enzimas salivales de los pacientes con enfermedad periodontal era significativamente más alta que la obtenida en el grupo control, concluyeron que las actividades de las enzimas están significativamente incrementadas en la saliva de los pacientes con enfermedad periodontal comparándolas con las de personas sanas. Esto es probablemente consecuencia de los procesos patológicos en los tejidos periodontales, de donde se liberan y se mezclan con la saliva circundante. Se ha establecido la correlación entre la actividad de las enzimas y de las Inmunoglobulinas. Después del tratamiento periodontal la actividad de las enzimas salivales examinadas ha disminuido como resultado de la reparación de los tejidos⁵.

Arnaud Alves Bezerra Júnior y cols, 2010 determinó que el pH de la saliva fue alto en los grupos con enfermedad periodontal⁶.

1.5. Influencia de la actividad Cariogénica en la composición Salival

La Caries dental, así como la obesidad, es un problema epidemiológico en aumento entre los adolescentes y existen muchos factores predisponentes para el proceso de Caries. Recientemente se encontró una asociación entre la producción de citoquinas proinflamatorias y Caries dental. La saliva contiene muchos de los componentes que participan en la protección de los tejidos de la cavidad oral (lisozimas, lactoferrina, inmunoglobulinas, etc.) dentro de los cuales la mucina tiene una función esencial en el mantenimiento de las defensas de la cavidad oral. El estudio de Bielawski K. y "cols.", 2014, indicó la secreción de una alta concentración de mucina (MUC5B) predominantemente en personas con Caries severas⁷.

Si bien es conocido que la Caries es multifactorial y depende en gran medida de las condiciones socioculturales, también resulta de gran importancia la influencia de la saliva en el inicio y la evolución de esta enfermedad. Lisa Susana Cornejo y cols., 2008 demostrará que las concentraciones de calcio, fosfato y la relación molar Ca/P en el estudio base se mostraron relacionadas con la presencia de nuevas Caries a los 12 y 24 meses ($p=0,036$)⁸.

1.6. Volumen y composición Salival con respecto al ciclo circadiano

El ciclo circadiano consta de dos estados, vigilia y sueño, el cual, representa un aumento del flujo salival durante las 17 horas de vigilia y un mínimo durante el sueño pudiendo llegar a cero. A su vez, durante la vigilia existen dos estados, uno en reposo, donde se genera un flujo normal continuo de entre 0,25 y 0,35mL/min, el estado de descanso, donde se produce alrededor de 0.4 mL de saliva total por minuto⁹.

La saliva permite estudiar las hormonas esteroidales en su fracción libre, como por ejemplo el cortisol. El cortisol, la llamada hormona del estrés, es una hormona esteroide que se segrega de la corteza suprarrenal. Su secreción afecta a diferentes sistemas corporales, y juega un importante papel en el sistema músculo-esquelético, el aparato circulatorio, el sistema inmunitario, el metabolismo de grasas, carbohidratos y proteínas y el sistema nervioso¹⁰.

Para la detección de patologías asociadas al ciclo circadiano y al cortisol, como el Síndrome de Cushing (SC), se realiza una medición del cortisol nocturno, ya que, en esta patología se pierde el ritmo circadiano, observándose valores elevados de cortisol a las 23:00 horas, a diferencia de los normales en que la concentración más elevada se alcanza al despertarse¹⁰. La evaluación del cortisol sérico nocturno es difícil de realizar por el inconveniente que implica una punción venosa en este horario, por esto, la determinación del cortisol libre en saliva ofrece ventajas sobre la medición en suero, por tanto, la toma de muestra salival se facilita porque puede recolectarse en la casa, no es invasivo, es indoloro y no produce estrés, además, el cortisol se mantiene estable por varias semanas en la saliva¹⁰.

1.7. Influencia de la dieta alimenticia en la composición salival

El estímulo gustativo es el más intenso y provoca incremento de hasta 10 veces, siendo el sabor ácido el más intenso, seguido del dulce, salado y amargo⁹.

La masticación de alimentos y chicle, es un fuerte estímulo para la secreción de bicarbonato sódico en la saliva desde la parótida. Los componentes salados, dulces y amargos son estimulantes de secreción salival menos efectivos que los ácidos. Mientras que el aumento del flujo salival como respuesta reflejo a los ácidos tiene una función protectora en individuos normales³.

Según el tipo de nutriente que se ingiere, la saliva puede verse levemente afectada, es así como una dieta rica en hidratos de carbono, provocan la acidificación de la saliva *per se*, lo que influye en el aumento de actividad de las bacterias responsable de las caries y enfermedad periodontal, además se aumenta la concentración de amilasa continua en boca. Por otro lado una alimentación a base de proteínas, genera una saliva más espesa y mucosa.

1.8. Influencia del embarazo en la composición salival

Se ha sugerido que el daño bucal durante el embarazo se debe a los cambios que ocurren en las secreciones salivales como causa de las variaciones hormonales, pero es claro también el papel de los estrógenos en la mejora de la secreción salivar¹¹, de tal manera que en la gestación no debe ocurrir un descenso en el volumen por cuanto los valores de los estrógenos están elevados. Estudios realizados por Kivelay cols. y Laine y cols., indican que la capacidad amortiguadora disminuye a finales del embarazo, al igual que Martínez y cols. 2014, los cuales, encontraron valores significativamente más bajos de la capacidad buffer durante el embarazo comparado con el posparto¹², por lo que durante el embarazo las hormonas salivales varían, modificando la composición normal, con respecto a una mujer que no se encuentra en gestación.

1.9. Volumen y Composición Salival en relación al estado sistémico del paciente.

Algunas enfermedades sistémicas producen destrucción progresiva de las glándulas salivales, así ocurre en algunas enfermedades autoinmunes como en el Síndrome de Sjögren, otras provocan alteraciones vasculares o neurológicas cuyas consecuencias con respecto a la producción de saliva son transitorias y reversibles, como ocurre en la hipertensión, depresión, desnutrición, deshidratación, diabetes, etc., algunas enfermedades neurológicas como la enfermedad de Parkinson, la epilepsia, la encefalitis o algunos tumores pueden ser causa de sialorrea, así como las intoxicaciones exógenas por plomo, bismuto, mercurio, plata, oro o arsénico y las endógenas como la uremia², provocando disminución tanto en la composición y volumen normal de la saliva con respecto a un individuo sano.

1.10. Influencia del consumo de fármacos en la composición salival

Puesto que el uso de múltiples medicamentos (polifarmacia) es común entre los pacientes comprometidos médicamente y pacientes ancianos, es prudente realizar en dichos pacientes un reconocimiento médico rutinario para detección de disfunción salival. La disfunción salival como efecto secundario de medicamentos es más común en los ancianos, debido a un metabolismo retardado y despeje de drogas por el hígado y el riñón respectivamente³.

Es importante destacar que hay más de 400 medicamentos, muchos de ellos muy utilizados, que inducen hipofunción de las glándulas salivales².

La radioterapia de cabeza y cuello, provoca hiposalivación irreversible derivada de la destrucción del parénquima glandular, los efectos adversos se inician a partir de los 4000 rads, siendo la reducción del flujo salival dependiente de la dosis².

Algunos grupos de medicamentos que pueden producir hiposalivación son: anoréxicos, ansiolíticos, anticonvulsivantes, antidepresivos tricíclicos, antieméticos, antihistamínicos, antipsicóticos, broncodilatadores, descongestionantes, diuréticos, relajantes musculares, analgésicos narcóticos, sedantes, antihipertensivos y antiartríticos².

1.11. Influencia del alcoholismo en la composición salival

La concentración de proteínas en saliva es de aproximadamente 300 mg por 100mL, siendo más significativa en la secreción parotídea. La ingesta crónica de alcohol se asocia a cambios significativos en la secreción de saliva parotídea y en su composición.

En un estudio de Actis y cols., 2006 se demostró que la concentración de proteínas salivales totales (g/L) presenta importantes diferencias entre los grupos de consumidores y no consumidores de alcohol ($p=0.04$). El consumo excesivo de alcohol produce una disminución en el flujo de saliva y, por lo tanto, existe también un menor contenido de proteínas basales, como, amilasa y electrolitos. Los individuos con un mayor consumo de alcohol presentan un cambio en su composición salival, ya que poseen una menor cantidad de proteínas de bajo peso molecular¹³.

1.12. Influencia del tabaquismo en la composición salival

Se ha demostrado en múltiples ocasiones que el pH salival en pacientes fumadores es más alto, provocando una alcalinización de la saliva, lo cual, beneficia la absorción de la nicotina y pudieran ser la causa de mayor acúmulo de placa y cálculo y, por ende, la aparición de enfermedad periodontal, contrariamente se han reportado valores significativamente disminuidos de pH en fumadores con respecto al pH de los no fumadores, esta disminución del pH fue asociada con otros factores que resultaron en el incremento de la concentración del ión de hidrógeno y la activación del sistema nervioso autónomo sobre la glándula salival.

Mayormente se cree que el uso del tabaco en un largo período de tiempo deprime o inactiva los receptores del gusto y el reflejo salival, presumiblemente, esto pueda llevar a unos receptores del gusto alterados y a cambios en la secreción salival.

Aunque la enfermedad periodontal es una entidad multifactorial, el pH salival debe ser considerado como uno de los factores que contribuye a la iniciación o el desarrollo de las lesiones periodontales en los pacientes fumadores, quizás mediante la promoción de la formación de cálculo dental o el incremento de la absorción de nicotina, o seguramente ambos¹⁴.

2. CLORHEXIDINA

La Clorhexidina (CHX) es un agente antimicrobiano de amplio espectro activo¹⁵. Pertenece a la familia de antibacterianos de polibiguanida, consistente en dos anillos simétricos de 4-clorofenil y dos grupos bisguanidinas conectados por una cadena central de hexametileno¹⁵, es una base fuerte y dicatiónica a niveles de pH mayores de 3.5, por lo que se vuelve insoluble en agua, es por esto, que para alcanzar la solubilidad y estabilidad deseada de este compuesto, a un pH cercano al fisiológico, es empleado en forma de sal (gluconato, acetato o clorhidrato).¹⁶

2.1. Mecanismo de acción

Dependiendo de su concentración, la CHX puede tener efecto bacteriostático y/o bactericida. En altas concentraciones actúa como un detergente, y al dañar la membrana celular causa precipitación del citoplasma y por tanto ejerce un efecto bactericida, en concentraciones bajas, la CHX es bacteriostática, produciendo la pérdida de sustancias de bajo peso molecular, como por ejemplo potasio y fósforo, lo que daña en forma reversible a la célula, también puede afectar el metabolismo celular de varias otras formas tal como el transporte de azúcar e inhibiendo la producción de ácidos en algunas bacterias.¹⁵

En boca se adsorbe rápidamente a las superficies, incluidos los dientes con película adquirida, proteínas salivales y a la hidroxiapatita. La Clorhexidina adsorbida se libera gradualmente en 8-12 horas en su forma activa, después de 24 horas aún pueden recuperarse concentraciones bajas de Clorhexidina, lo que evita la colonización bacteriana durante ese tiempo¹⁷, propiedad conocida como Sustantividad.

2.2. Concentraciones

La Clorhexidina suele presentarse en dos concentraciones, al 0,12% y al 0,2%, en la práctica clínica, pero, también puede obtenerse al 2% entre otros, observándose que los resultados en todas las formulaciones son igual de efectivos¹⁷.

2.3. Efectos Adversos

No se ha descrito toxicidad sistémica por aplicación tópica o ingestión de CHX, ni hay evidencias de teratogenia en el modelo animal. No se ha observado resistencia bacteriana, se han descrito en muy raras ocasiones ciertas sensibilizaciones al fármaco lo mismo que los efectos colaterales sistémicos por la ingestión del compuesto¹⁷.

2.4. Indicaciones orales

- 2.4.1. *Clorhexidina en Periodoncia* → Se utiliza en el control químico de la placa bacteriana en pacientes con enfermedad periodontal. Esto hace que la periodoncia sea la rama de la odontología que presenta mayores investigaciones sobre la utilización de este antiséptico¹⁸.
- 2.4.2. *Clorhexidina en Cirugía Oral* → Se utiliza como medicamento de acción local, tanto desde el punto de vista causal como sintomático. Generalmente se utiliza en los procedimientos de exodoncia, como antiséptico previo a la extracción, y en el tratamiento de la alveolitis.
- 2.4.3. *Clorhexidina en Implantología* → Los implantes dentales deben estar permanentemente en mantenimiento, por el riesgo de desarrollar mucositis o periimplantitis. La terapia básica periodontal, la irrigación local con Clorhexidina y una buena higiene, se utilizan como acción preventiva. También puede ser utilizada en cirugías de periimplantitis, como sustancia irrigante para descontaminar los implantes, y como medicamento postquirúrgico y de acción local pre-quirúrgico para disminuir los contaminantes bacterianos en cirugía de colocación de implantes e injerto autógeno para relleno óseo¹⁸.
- 2.4.4. *Clorhexidina en Prótesis* → El éxito de las prótesis parciales o totales, fijas o removibles, está basado en una excelente higiene tanto de la cavidad oral como de las prótesis removibles. La *Candida albicans* es el principal factor etiológico de la estomatitis en pacientes con prótesis totales¹⁸, en dicha patología, regularmente se utiliza la Clorhexidina, como control químico, mejorando la higiene bucal.

2.5. Presentaciones¹⁸

- Colutorios: Principalmente en dos concentraciones (0,12% Y 0,2%) que a dosis total similar tienen unos resultados muy parecidos.
- Gel: Al 0,2 % o al 0,12% para aplicación en localizaciones concretas.
- Sprays: Especialmente recomendados para discapacitados físicos.
- Barnices: Como prevención de la caries radicular.

Todas estas indicaciones fracasan en conseguir un buen control de placa y gingivitis cuando no se combinan con medidas de higiene mecánica, aunque se han demostrado eficaces en el control de las regiones interproximales y subgingivales, sin embargo han sido eficaces para reducir la inflamación periodontal y controlar la placa subgingival¹⁸.

3. PARACLOROANILINA

La Paracloroanilina (PCA o 4-cloroanilina), es una sal insoluble que conforma un precipitado, de color café-anaranjado, el cual, se genera por la hidrólisis de CHX en función del tiempo, pH alcalino y calor, adicionalmente, la presencia de PCA se ha detectado en soluciones de CHX¹⁷ y se observa generalmente como resultado de la interacción entre el Hipoclorito de Sodio y la Clorhexidina, al ser utilizadas ambas sustancias como irrigante intraconducto¹⁹.

3.1. Relación con Hipoclorito de Sodio

El Hipoclorito de Sodio se define por la asociación Americana de Endodoncistas, como un líquido claro, pálido, verde-amarillento, extremadamente alcalino y de fuerte olor clorino, que presenta una acción disolvente sobre el tejido necrótico y restos orgánicos, y además es un potente agente antimicrobiano²⁰.

Al interactuar con la Clorhexidina (CHX), se genera una reacción ácido-base, con una fórmula molecular $\text{NaC}_6\text{H}_4\text{Cl}$ al análisis por espectrometría de masa. Cuando ambos irrigantes se mezclan, moléculas de Hipoclorito de Sodio (NaOCl) hidrolizan la Clorhexidina (CHX) en pequeños fragmentos formando este subproducto¹⁹.

La CHX, un ácido dicatiónico que posee la capacidad de donar protones, mientras que el NaOCl es alcalino y puede aceptar protones de este ácido dicatiónico, que resulta en la generación de PCA²⁰.

Al evaluar la naturaleza química de este precipitado, se produce una reacción inmediata cuando se combinaba la CHX al 2% con NaOCl incluso en su menor concentración (0.023%). Al aumentar la concentración del NaOCl a 0.19% resultó en la formación de un precipitado que consistió mayoritariamente en Paracloroanilina (PCA). Esto ocurre por la sustitución del grupo guanidina en la molécula de CHX, además, la cantidad de PCA aumenta directamente con el aumento de la concentración del NaOCl.

3.2. Efectos Adversos

El PCA es tóxico en exposiciones de corto tiempo en humanos dando por resultado cianosis, lo que es una manifestación de la formación de metahemoglobina, además este precipitado insoluble es citotóxico en las ratas y adicionalmente puede degradarse en 1-cloro-4-nitrobenceno que es un cancerígeno y mutagénico en humanos.²⁰⁻²¹ Es de uso industrial en pesticidas y tintes y ha sido demostrado ser cancerígeno en animales²⁰.

La PCA ha sido clasificada por la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC, 2006) en su grupo 2B, como agente posiblemente cancerígeno para los seres humanos.²⁰

Al generarse en tratamientos endodónticos, este precipitado es difícil de remover del conducto y opaca los túbulos dentinarios impidiendo la penetración de los medicamentos intraconductos, comprometiendo el sellado de la obturación del conducto radicular y es una filtración potencial de la Paracloroanilina (PCA) en el periápice. Además, su presencia imparte color a la pared del conducto y causa en el diente una decoloración afectando la estética²¹.

3.3. Formación de PCA en presencia de Clorhexidina

No sólo se ha presentado la formación de PCA al generar mezclas ente el NaOCl y Clorhexidina, más bien, se ha comprobado que la interacción de otras sustancias utilizadas como irrigantes en endodoncia, pueden generar la aparición de este precipitado sólido, es así, como Marchant y cols, 2015, comprobaron la generación de PCA al realizar mezclas binarias de: - Clorhexidina 2% con EDTA 10%, y Clorhexidina 2% con Cloruro de Sodio 0,9%, observando que la hidrólisis de la Clorhexidina puede generarse en diferentes medios, independiente de su composición¹¹. Es por esta razón, que la presencia de electrolito de sodio en la saliva, podría causar la integración con la Clorhexidina, provocando su hidrólisis y la generación de Paracloroanilina.

4. QUIMICA ANALÍTICA - ESPECTOMETRÍA DE MASAS

La química analítica se ocupa de la caracterización química de la materia, logrando dilucidar qué es el compuesto analizado (aspecto cualitativo) y las cantidades en que éste se presenta (aspecto Cuantitativo)²², contribuyendo a la identificación de múltiples elementos presentes en el entorno (alimentos, tierra, el aire, el agua, gases de industrias, fármacos, etc), con esto se logra comprender lo que nos rodea, identificar compuestos potencialmente beneficiosos o tóxicos para los seres vivos.

La **Espectrometría de Masas** es uno de los métodos analíticos actuales más destacados por su gran sensibilidad en el análisis de moléculas. Para realizar el análisis requiere de muestras pequeñas y obtiene información característica de ellas, como el peso molecular y algunas veces la estructura del “analito” (compuesto, elemento o ión a estudiar). Cada compuesto es único, y cada uno de los compuestos se ionizará y/o se fragmentará de una determinada manera²³, estos iones obtenidos se separarán de acuerdo a su masa (m) y carga (z), y luego son detectados por un dispositivo adecuado²⁴.

4.1. Funcionamiento del espectrómetro de masas

El funcionamiento del espectrómetro de masas, se basa en la introducción al equipo de una muestra en estado gaseoso, la cual, puede ser originalmente gaseosa o líquida vaporizada a alta temperatura, respectivamente será ingresada de forma directa, indirecta o a partir de un cromatógrafo acoplado (líquido o de gases).

La muestra vaporizada es interceptada por un haz de electrones de alta energía provenientes de un filamento incandescente, originando moléculas ionizadas, las cuales, son aceleradas y separadas en función de su masa “m” y su carga “z” (m/z). Una vez separadas, estas son detectadas y analizadas a través de un software dependiente de cada equipo de detección de masas²⁴.

4.2. Componentes del Espectrómetro de masas²⁴

1. Sistema de inducción de muestras.
2. Fuente de iones.
3. Analizador, para separación de iones.
4. Sistema detector y registrador.

4.3. Tipo de Espectrómetros de masas

Existen diversos tipos de espectrómetros de masas, los cuales, se diferencian en cómo se separan las moléculas ionizadas obtenidas, antes de llegar al detector, o sea, según el analizador con que estos funcionen. El más básico de ello es el “Analizador Magnético”, el cual consta de un campo magnético para separar las moléculas ionizadas, pero el más utilizado actualmente es el “Analizador Cuadrupolar”, este no utiliza un campo magnético para la dispersión de las moléculas ionizadas, si no que se compone de cuatro barras metálicas de sección circular, sobre estas se aplica un potencial eléctrico generando dos campos eléctricos originando un movimiento lateral de las moléculas ionizadas. Los movimientos de los iones depende de su relación masa/carga (m/z), por lo que sólo unos iones tendrán trayectoria estable y los otros chocaran contra las barras metálicas, generando que el cuadrupolo los filtre y elimine, llevando hacia el detector sólo las moléculas ionizadas estables²⁴⁻²⁶.

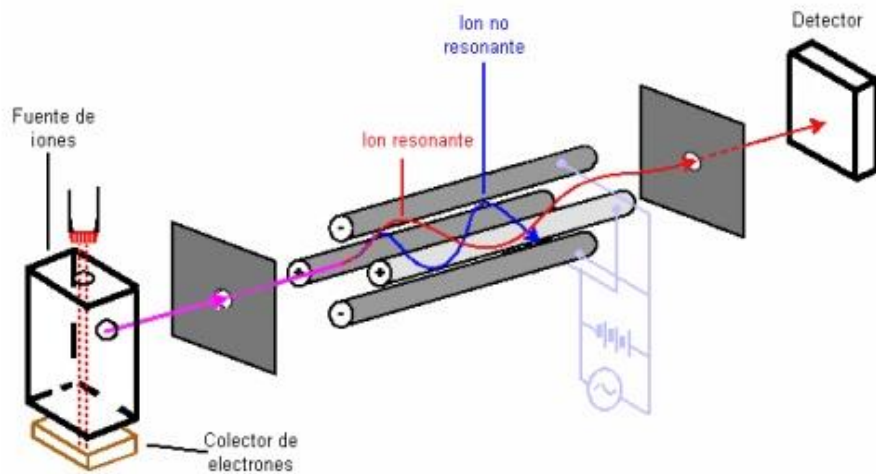


Figura 1: Esquema de Analizador de masas cuadrupolar. University of Bristol.²⁴

En Chile el Espectrómetro de masas Cuadrupolar más utilizado es el QTRAP LC MS/MS System 3200, el cual, consiste en un híbrido patentado de triple cuadrupolo/trampa de iones lineal. Posee una excelente sensibilidad, un rango dinámico superior y fiabilidad en una amplia gama de aplicaciones en identificación y cuantificación de moléculas²⁶.

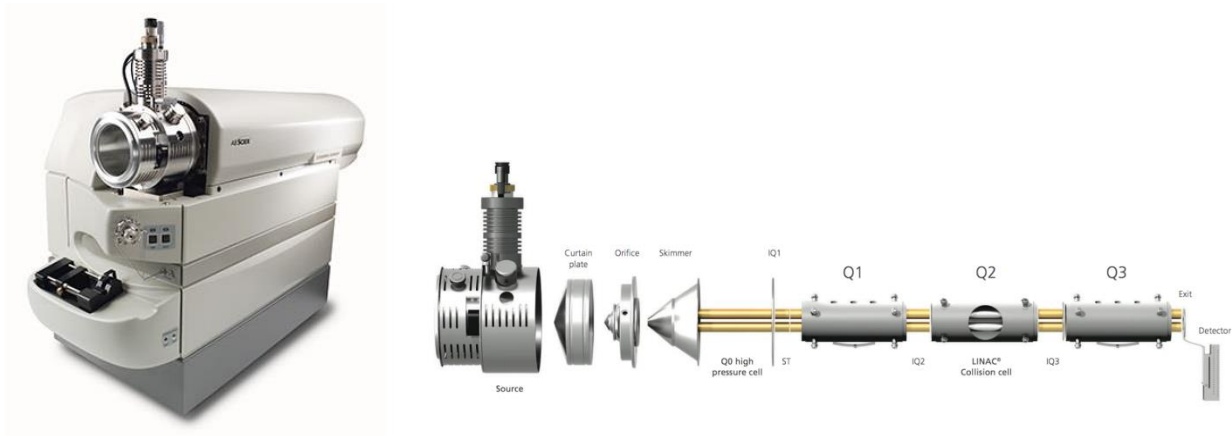


Figura 2: Espectrómetro de masas 3200 System QTRAP®

4.4. Espectros de Masa

Los resultados obtenidos de la detección de masas, son representados a través de espectros de masas, los cuales son “huellas químicas”. Cada molécula presenta espectro patrón, el cual se almacena en una biblioteca de patrones (base de datos), por lo que, el espectro obtenido se compara con el patrón para identificar las moléculas ionizadas²⁴.

Los espectros se representan como Gráficos, en los cuales, se forman “líneas espectrales”, que indican el peso molecular de la molécula ionizada en mayor abundancia en la muestra. Además pueden encontrarse impurezas de menor peso molecular que no afectan la detección de la molécula en estudio²⁴. En el gráfico, el eje “x” representa la relación masa carga de cada espectro de masa y es denominado “m/z”. El eje “y” corresponde a la intensidad de la carga, que representa la cantidad del ion presente en la muestra¹¹.

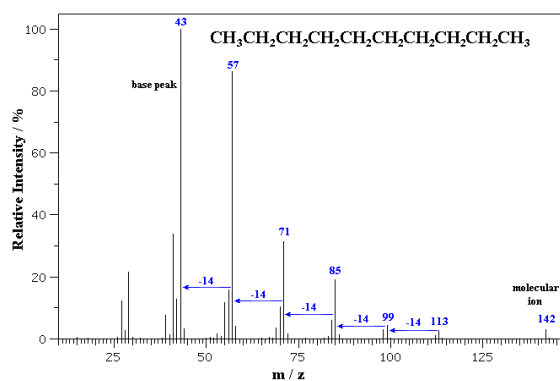


Figura 3: Espectro de Masas¹¹.

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

5. OBJETIVOS GENERALES

Evaluar la presencia de precipitados sólidos de Paracloroanilina (PCA) en mezclas binarias activadas mediante Ultrasonido, entre Clorhexidina en dos concentraciones, (2 % y al 0,12 %), con saliva humana, in vitro.

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detectar la presencia de componentes precipitados en ambas mezclas binarias.
- Cuantificar la presencia de los componentes precipitados en ambas mezclas binarias.
- Detectar, mediante espectrometría de masas, la presencia de PCA en las mezclas binarias de CHX al 0,12 % con saliva.
- Detectar, mediante espectrometría de masas, la presencia de PCA en las mezclas binarias de CHX al 2% con saliva.

7. HIPÓTESIS

Al realizar la mezcla binaria de Clorhexidina con saliva humana, se producirán precipitados sólidos de Paracloroanilina, o cualquier otro tipo de precipitados, dependiente de la concentración de Clorhexidina utilizada.

MATERIALES Y MÉTODO

8. DISEÑO DEL ESTUDIO

En esta investigación el diseño es experimental *in vitro*, para poder realizar la mezcla binaria de saliva con la sustancia química (Clorhexidina 0,12% y 2%) y observar la presencia o no de subproductos (PCA).

9. MUESTRA/UNIVERSO

El objetivo del estudio es observar la formación de precipitados sólidos de PCA en una mezcla binaria de saliva y Clorhexidina, es por ello, que sólo necesitamos un donador de saliva que cumpla nuestros criterios de inclusión.

En este estudio experimental descriptivo *in vitro*, donde los conceptos de universo, población y muestra no aplican de igual forma que en los estudios poblacionales, para efectos de este trabajo, entenderemos Universo como toda la saliva que el donante puede generar, la población será toda la saliva que el donante expectore luego de pasados 5 minutos de recolectar saliva en boca, mientras que las muestras corresponderán a mezclas binarias de saliva y clorhexidina.

El conjunto de muestras serán divididas en 5 grupos, uno de ellos es el grupo control; mientras las muestras estarán compuestas por 300 ul saliva con 300 ul de clorhexidina al 0,12% (IB y IIB) y 300 ul saliva con 300 ul de clorhexidina al 2% (IC y IIC), además se encontrarán en una proporción 1:1 (IB y IC) y 1:2 (IIB y IIC) (saliva:Clorhexidina). En la tabla N°1 se indican las mezclas ensayadas.

Tabla II. Mezclas binarias de saliva con Clorhexidina.

Mezcla	Componente 1	Componente 2	Observaciones
IA	Saliva	No aplica	Control
IB	Saliva	Clorhexidina 0,12 %	Proporción 1:1
IC	Saliva	Clorhexidina 2 %	Proporción 1:1
IIB	Saliva	Clorhexidina 0,12 %	Proporción 1:2
IIC	Saliva	Clorhexidina 2 %	Proporción 1:2

10. VARIABLES

Solución binaria: cualitativa, dicotómica e independiente

- *Definición conceptual:* Combinación de dos sustancias donde ambas conservan sus propiedades características, no tienen una composición constante, es decir, pueden ser homogéneas o heterogéneas, e independiente de esto, pueden ser separadas en sus componentes a través de medios físicos sin cambiar la identidad de dichos componentes²⁷.
- *Definición operacional:* Muestra homogénea determinada por dos componentes: saliva y Clorhexidina. Existirán dos tipos, según la concentración de Clorhexidina que posean (CHX al 0,12% y 2%). Se codificarán como muestra A y muestra B.

Formación de precipitado sólido: cualitativa, dicotómica y dependiente

- *Definición conceptual:* Sólido insoluble que se separa de la disolución²⁷.
- *Definición operacional:* cualquier subproducto sólido que decante separándose de la mezcla binaria, luego de activarla por ultrasonido y que sea apreciado como cualquier cambio de coloración en la muestra o como partícula decantando, esto será procesado y registrado a través del espectrómetro de masas para detectar la cantidad y el tipo del precipitado.

Presencia de Paracloroanilina según su peso: cualitativa, dicotómica y dependiente

- *Definición conceptual:* detección del compuesto de $\text{NaC}_6\text{H}_4\text{Cl}$, causado por la hidrólisis de la Clorhexidina²⁸.
- *Definición operacional:* Aparición de moléculas correspondientes al valor 128,3 m/z en el espectrómetro de masas.

Presencia de otros precipitados dentro de la solución: cualitativa, dicotómica y dependiente

- *Definición conceptual:* Sólido insoluble que se separa de la disolución distinta a Paracloroanilina²⁹.
- *Definición operacional:* Toda molécula que no se coincida con el valor de 128,3 m/z en el espectrómetro de masas.

11. MATERIALES Y EQUIPOS

1. Espectrómetro 3200 Q trap LC MS/MS System equipado con una sonda electrospray (ESI) y bomba de infusión
2. Jeringa de vidrio de 1 ml para infusión.
3. Procesador de datos (PC con software)
4. Balanza macro analítica mínima división 0.0001g.
5. Balanza carga superior mínima división 0.001g.
6. Vórtex Digital.
7. incubador
8. Matraces aforados de 10 mL, 25 mL, 250 mL y 500 mL.
9. Micropipeta de 100-1000 μL y puntas desechables.
10. Micropipeta de 20-200 μL y puntas desechables.
11. Micropipeta de 0.5-5 mL y puntas desechables.
12. Tubos de centrifuga de plástico de 15 mL.
13. Jeringas de 1 ml desechables
14. Centrifuga
15. Baño ultrasonido.
16. Filtros de membrana PVDF de 0.22 μm de poro, 13 mm de diámetro.
17. Ácido formico LC-MS.
18. Agua calidad HPLC.
19. Acetonitrilo HPLC.

12. CRITERIOS DEL DONADOR

El donador de saliva debe tener entre 20 y 40 años de edad, presentar más de 20 dientes en boca, sin antecedentes sistémicos relevantes, como: síndrome de Sjögren, enfermedades vasculares o neurológicas, hipertensión, depresión, desnutrición, diabetes, enfermedad periodontal y Caries activas, estar dispuestos a entregar la muestra entre las 9:00 y 11:00 h del día. No ser fumador, consumir algún medicamento, estar embarazada, no haber consumido alimentos sólidos en las últimas 12 horas y no haber consumido líquidos en las últimas 2 horas, antes de la toma de muestra.

13. OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

El donador es aquel que cumpla los criterios de inclusión, el cual, deberá recolectar saliva en la boca durante 5 minutos, evitando deglutir, luego permanecerá sentado y con la cabeza inclinada hacia adelante para expectorar en un tubo de centrifuga de 15 ml. toda la saliva reunida, tardando alrededor de 10 minutos.

La saliva una vez recolectada fue centrifugada a 14.000 rpm por 10 minutos a 8 °C, se separó el sobrenadante y éste se conservó refrigerado hasta el análisis.

14. PROCEDIMIENTO METODOLÓGICO DE MUESTRAS

Una vez realizadas las mezclas de saliva con Clorhexidina, se llevaron a agitación horizontal en una incubadora a 37 °C por dos minutos. Cada mezcla fue agitada en un vórtex digital por 5 minutos, se dejó reposar por otros 5 minutos y se observó la presencia de precipitados en cada uno de los tubos, a continuación los tubos fueron centrifugados por 5 minutos a 5.000 rpm.

En los tubos donde se observó la presencia de precipitado se descartó el sobrenadante y se solubilizó cada precipitado en 2 mL de una solución de acetonitrilo+ agua con 0,1 % de ácido fórmico (vehículo para ingresar las muestras líquidas al espectrómetro de masas).

Se llevó a baño de ultrasonido continuo por 5 minutos para optimizar y completar el proceso de disolución, a continuación se centrifugaron las muestras a 5.000 rpm, cada sobrenadante se filtró por membrana de 0,22 µm y se procedió a su análisis instrumental por espectrometría de masas. En forma paralela se agregó el vehículo donde se solubilizaron las muestras como control negativo.

15. INSTRUMENTO DE MEDICIÓN

Cada una de las muestras donde se observó la presencia de precipitado e independientemente si pudo ser solubilizado fue analizado el sobrenadante (vehículo de infusión) por espectrometría de masas. Las condiciones de la fuente de iones del espectrómetro de masas fueron: un voltaje de capilar de 3500 Volt, una temperatura de 100 ° C, gases auxiliares GS1 y GS2 ambos en 20 unidades arbitrarias. La bomba de infusión se fijó a un flujo de 25 µL/ min. La colección de datos fue realizada en el intervalo de masas de entre 90 a 1000 m/z, en modo MCA colectando 10 espectros de masas sucesivos.

Al principio del análisis se realizó una infusión solo con la solución del vehículo para descartar la presencia de interferentes y contaminantes en la zona de monitoreo de masas propuesto en el párrafo anterior. A continuación se infundieron cada una de las muestras y entre muestras fue lavado el sistema con la solución del vehículo de infusión.

El estudio se llevó a cabo por el químico analítico Sr. Luis Roa Marín, en el laboratorio de cromatografía avanzada SGS.

16. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Este fue realizado por el software Analyst 1.5 propio del instrumento (Espectrómetro de masas 3200 Qtrap LC-MS/MS), que procesa e interpreta los datos cualitativa y cuantitativamente de manera simultánea. Tiene la facultad de transformar las intensidades de las moléculas ionizadas en estudio a datos que pueden ser analizados, tabulados y visualizados en espectros de masas (gráficos) para cada muestra ingresada.

17. APROBACIÓN DEL COMITÉ DE BIOSEGURIDAD

El presente estudio fue aprobado por el comité de bioseguridad de la Universidad de Valparaíso.

RESULTADOS

En cada una de las muestras binarias incubadas, se observó si existían cambios en la solución formada, en todas las mezclas hubo formación de un precipitado coloidal blanquecino, pero este fue más evidente en las mezclas IIB y II C, donde la proporción de la solución de clorhexidina es el doble de volumen con respecto a la saliva, en especial en la mezcla IIC se obtiene la mayor cantidad de precipitado, esta mezcla es la que posee la mayor concentración y volumen de clorhexidina (2%). En la figura 1 se observa la formación de precipitado de las mezclas IIB y II C.

En cada una de las muestras se obtuvieron los espectros de primer orden, bajo condiciones instrumentales descritas anteriormente, paralelamente a las cuatro mezclas ensayadas que corresponden a IB, IC, IIB y IIC, se obtuvieron los espectros de primer orden de control del vehículo de inyección y saliva para observar la presencia de interferentes.

En la zona donde se midieron los espectros de primer orden (90 a 1000 m/z), tanto en el vehículo de inyección como en la muestra de saliva es posible observar que no se detectan interferentes debido a especies moleculares propios de la clorhexidina o productos de reacción con la saliva. En la figura 2 se observa los espectros de primer orden de control del vehículo de inyección y en la figura 3 el espectro de primer orden de la saliva muestra de saliva.

Las especies moleculares correspondientes a clorhexidina detectadas, son 254, 505 y 701 m/z y corresponden a las especies ionizadas de clorhexidina (donde M simboliza a la molécula de clorhexidina) de $[M+2H]^+$, $[M+H]^+$ y $[M+H]^+$ en esta última M corresponde a clorhexidina gluconato. Las formulas moleculares de los tres compuestos detectados de clorhexidina son $C_{22}H_{32}Cl_2N_{10}^{2+}$, $C_{22}H_{31}Cl_2N_{10}^{2+}$ y $C_{28}H_{43}Cl_2N_{10}^+$

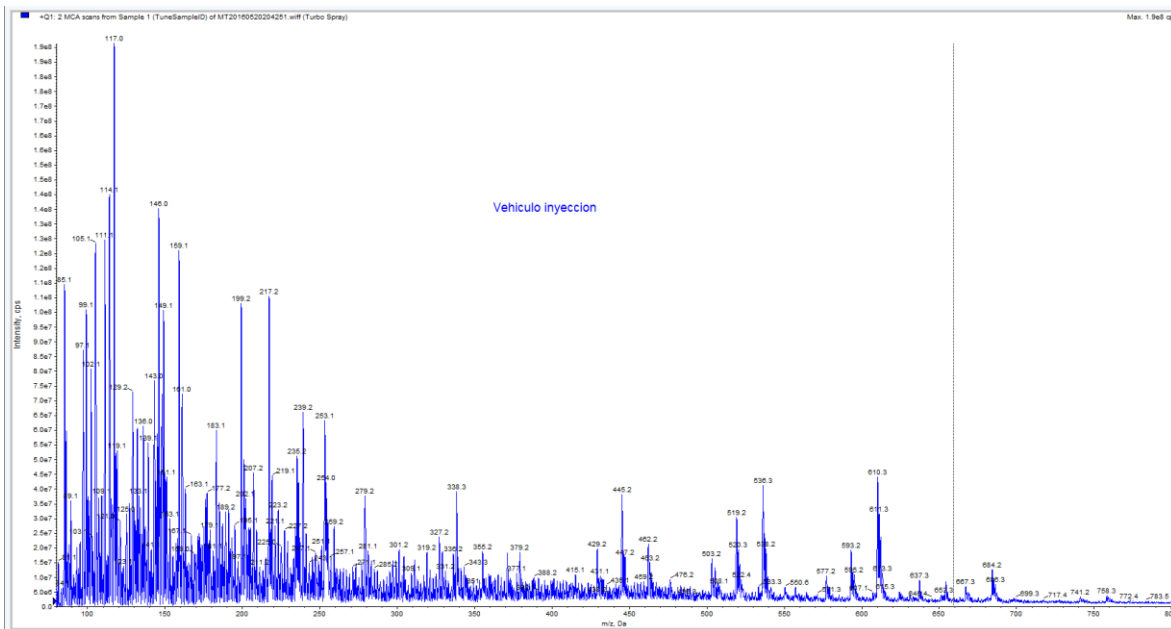


Figura 4: Espectro de primer orden de vehículo de infusión, mezcla acetonitrilo+agua 1:1 con 0,1 % de ácido fórmico.

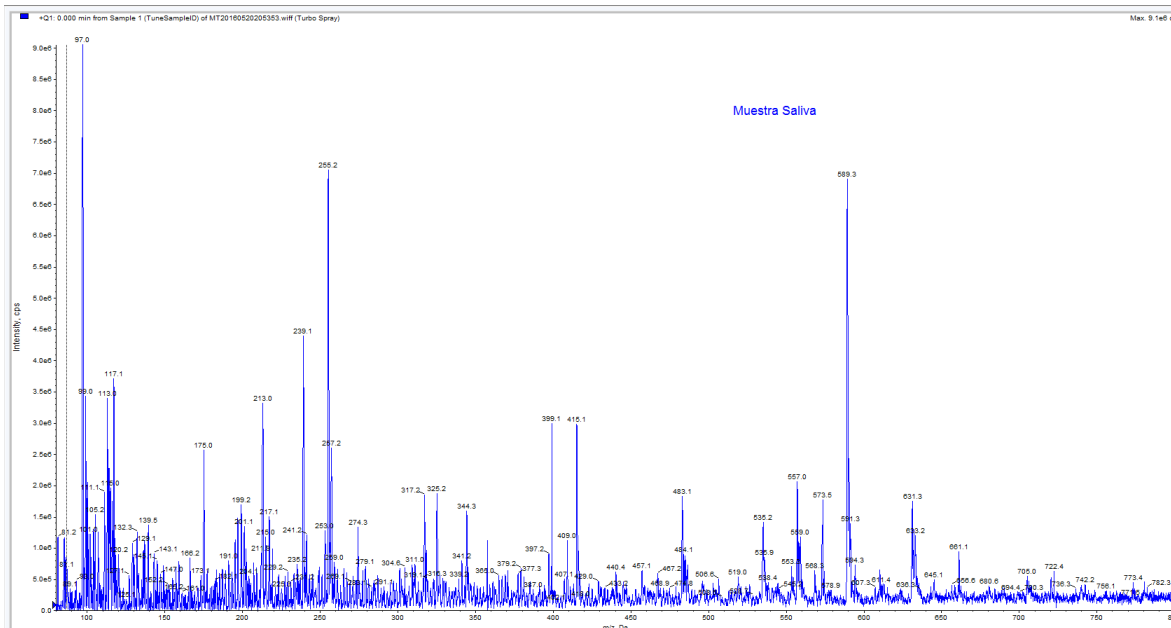


Figura 5: Espectro de primer orden de muestra de saliva, disuelta en vehículo de infusión.

En las figuras 6, 7, 8 y 9 se observan los espectros de primer orden de la mezclas correspondientes a mezclas IB (clorhexidina 0,12 % + saliva, 1:1), IC (clorhexidina 2 % + saliva,1:1),IIB (clorhexidina 0,12 % + saliva,2:1) y IIC (clorhexidina 2 % + saliva,2:1).

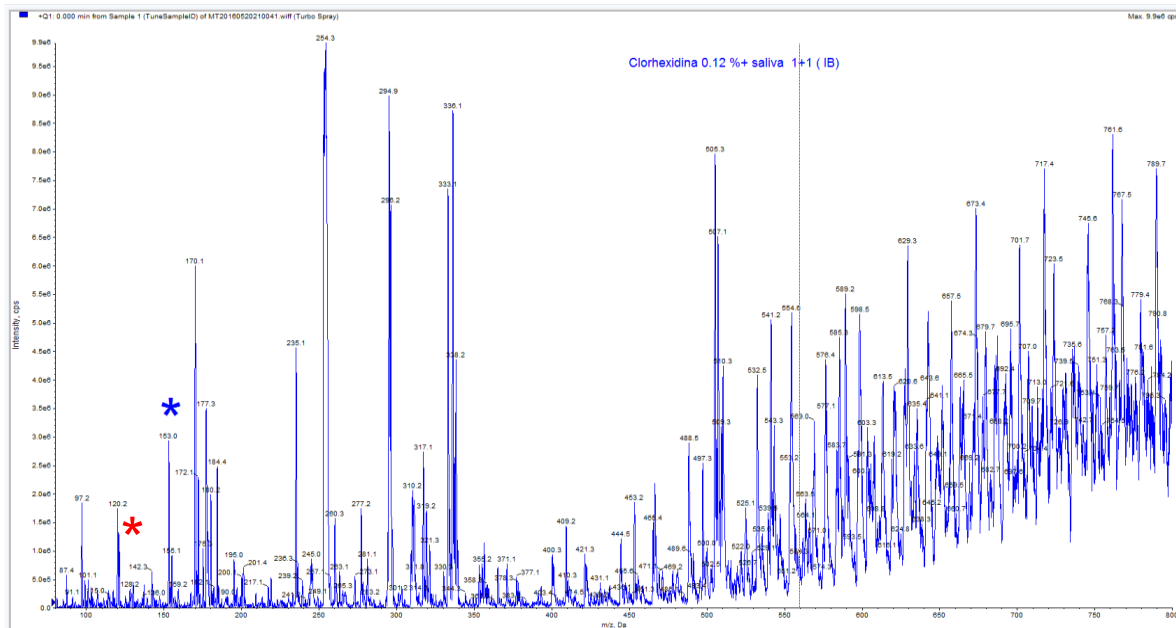


Figura 6: Espectro de primer orden mezcla I B, clorhexidina 0,12 %+saliva (1:1).

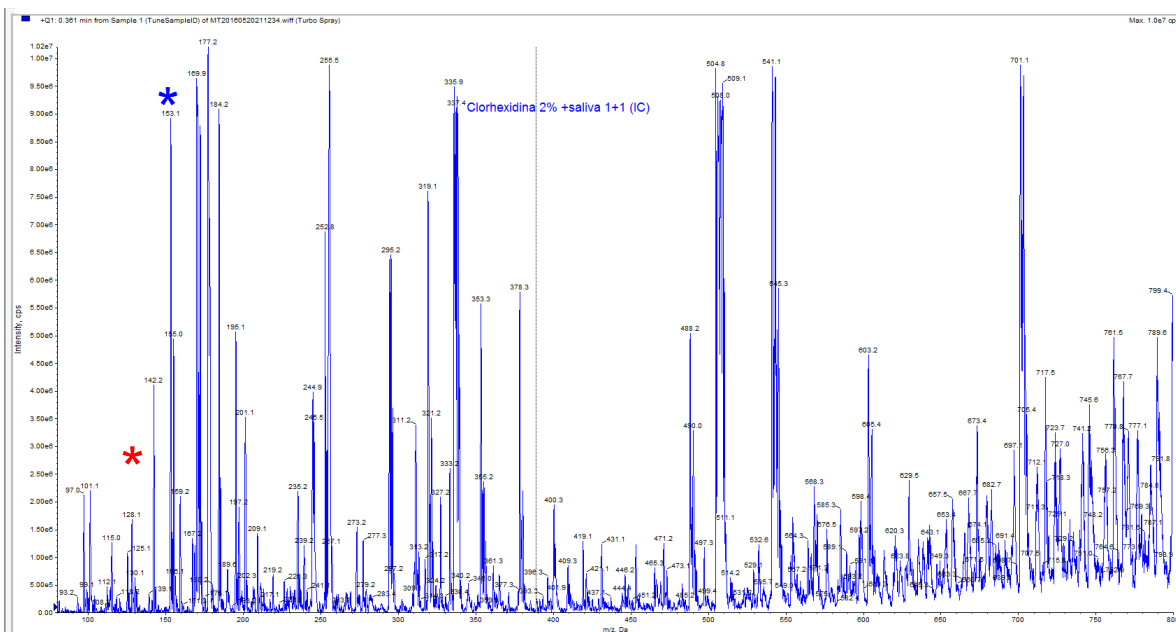


Figura 7: Espectro de primer orden mezcla I C, clorhexidina 2 %+saliva (1:1).

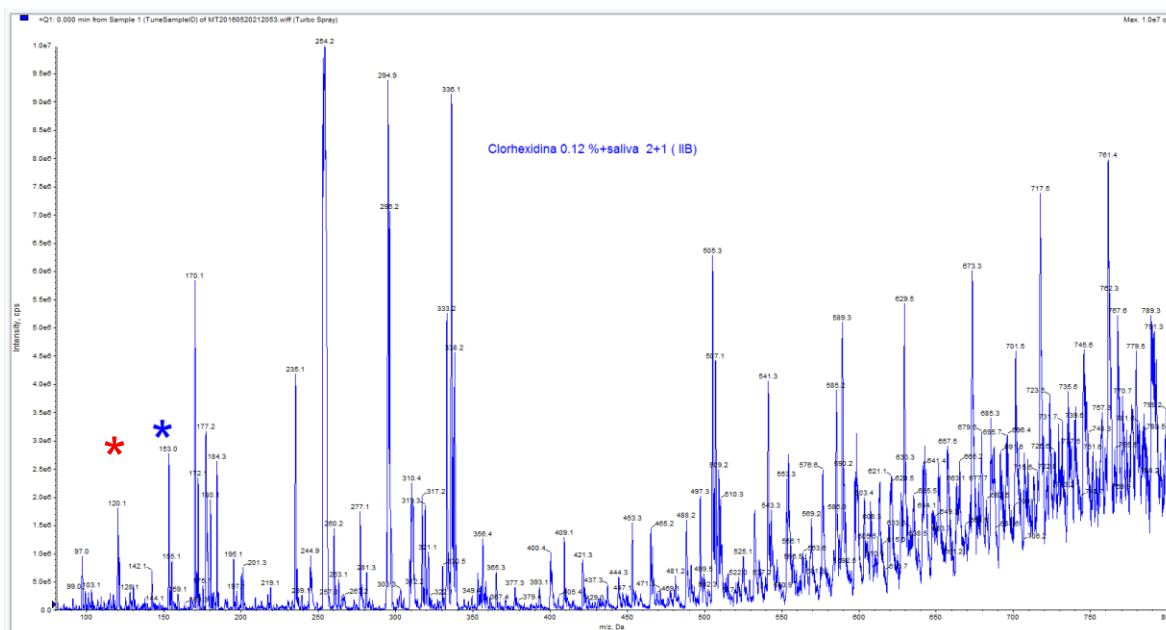


Figura 8: Espectro de primer orden mezcla II B, clorhexidina 0,12 %+saliva (2:1).

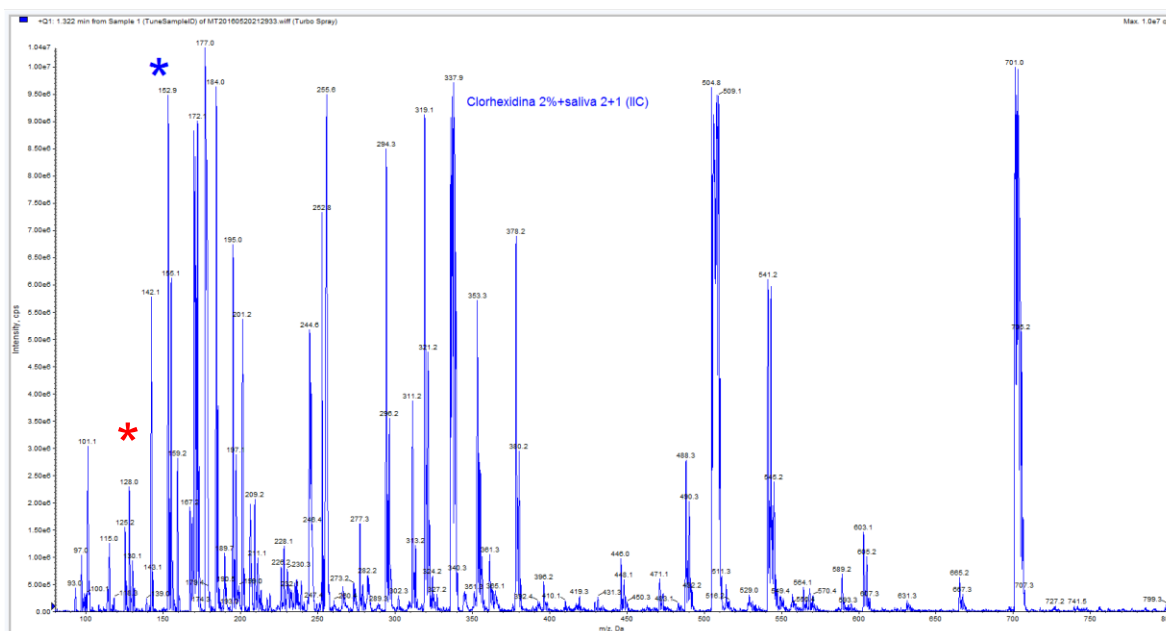


Figura 9: Espectro de primer orden mezcla II C, clorhexidina 2 %+saliva (2:1).

Existe presencia de para-cloroanilina (C_6H_6ClN), en las cuatro mezclas de clorhexidina con saliva con una m/z de 128 uma correspondiente a la especie $[M+H]^+$, podemos observar en las figuras 6, 7, 8 y 9 marcado con un asterisco rojo (*) en la parte superior donde arroja el valor 128 uma. Además la paracloroanilina forma un aducto con el ion sodio presentando una especie molecular de la forma $[M+Na]^+$ con una m/z de 153 uma, marcado con un asterisco azul (*) en la parte superior con una m/z 153uma, en las figuras 6, 7, 8 y 9.

Se detectó la adición de cloro en la molécula de clorhexidina, dando lugar a especies moleculares detectadas en el espectro de masas de primer orden. Las especies moleculares detectadas en todas las mezclas son descritas en la tabla II.

m/z (uma)	Especie molecular	Fórmula	Cl en la molécula
270	$[M+2H]^{+2}$	$C_{22}H_{30}Cl_4N_{10}^{+2}$	2
539	$[M+H]^+$	$C_{22}H_{30}Cl_3N_{10}^+$	1
287	$[M+2H]^{+2}$	$C_{22}H_{31}Cl_4N_{10}^{+2}$	2
573	$[M+H]^+$	$C_{22}H_{29}Cl_4N_{10}^+$	2
607	$[M+H]^+$	$C_{22}H_{28}Cl_5N_{10}^+$	3
321	$[M+2H]^{+2}$	$C_{22}H_{28}Cl_6N_{10}^+$	4
338	$[M+2H]^{+2}$	$C_{22}H_{27}Cl_7N_{10}^{+2}$	5
355	$[M+2H]^{+2}$	$C_{22}H_{26}Cl_8N_{10}^{+2}$	6

Tabla III: Especies moleculares cloradas de clorhexidina detectadas en las mezclas IB, IC, IIB y IIC.

DISCUSIÓN

El objetivo de este estudio fue determinar la presencia de precipitados sólidos de PCA en una mezcla binaria de saliva y clorhexidina en dos diferentes concentraciones (0,12% y 2%) y proporciones (1:1 y 1:2), cabe destacar la importancia de este conocimiento, ya que la molécula de PCA es conocida como un subproducto tóxico de la clorhexidina de carácter potencialmente carcinogénico.

Por medio de espectrometría de masas, se detectó la presencia de precipitados sólidos visibles en las mezclas binarias, siendo la mezcla IIC en donde se aprecia una importante formación de precipitado, recordemos que en esa mezcla en particular la concentración de clorhexidina era de 2% en una proporción 1:2, por lo tanto mientras mayores son las concentraciones y proporciones de las mezclas, las líneas espectrales fueron cada vez más notorias, corroborando los principios de la química básica, en donde el sistema siempre tiende al equilibrio, por lo que al aumentar las concentraciones y proporciones de los sustratos, en este caso aumentando el sustrato 2 (Clorhexidina), se tiende a un aumento en la formación del producto (Paracloroanilina). Si bien, en la práctica un paciente que utiliza esta sustancia a diario o como parte de un tratamiento, no podría aumentar la concentración de la clorhexidina que administra, ya que en el mercado no hay disponibilidad de otras concentraciones, este si podría modificar sus proporciones de uso, a través de la cantidad (días) y frecuencia (número de veces por día) en que aplica la dosis, aumentando la probabilidad de generar PCA. En base a lo anterior, resalta la importancia de generar estudios *in vivo*, en humanos, con dosis rutinarias de tratamiento, es decir, Clorhexidina al 0,12% y al 0,2%, para comprobar la cantidad que puede llegar a generarse en el paciente al utilizar CHX, descartamos la utilización de Clorhexidina al 2%, ya que no está disponible en el mercado para su comercialización individual, solo se distribuye a profesionales de la salud para uso como antiséptico de superficies y desinfección.

Basados principalmente en un trabajo realizado por Prado et. al. (2013), confirmamos en las mezclas la presencia de una diversidad de especies moleculares, debido principalmente a las formas ionizadas de clorhexidina y productos de reacción formados por la adición de cloro en la misma molécula de clorhexidina, además de compuestos potencialmente tóxicos descritos en la literatura. La molécula de clorhexidina es capaz de aceptar iones cloruro, Prado et al, describe compuestos con adición desde 1 a 6 átomos de cloro, el sitio más probable para la adición de cloruro a la molécula de clorhexidina ($C_{22}H_{30}Cl_2N_{10}$) ocurre en el nitrógeno del grupo guanidino³⁰, lo anterior concuerda con nuestros resultados como se puede apreciar en los espectros de primer orden donde se aprecian diferentes especies moleculares.

En este estudio la mezcla entre saliva y clorhexidina generó la reacción descrita en el párrafo anterior, en donde los iones cloruro fueron proporcionados por la saliva. En todas las mezclas es posible observar la presencia de moléculas de clorhexidina con diferente cantidad de adición de átomos de cloro, con intensidades proporcionales a la cantidad y concentración de clorhexidina.

Por otro lado es importante destacar que la presencia de para-cloroanilina (C_6H_7ClN), ha sido descrita en la literatura por trabajos de esta misma índole, como C. Carpo y C. Rodríguez (2015) al asociar clorhexidina con irrigantes endodónticos¹¹, a través de su metodología basada en la química analítica, se comprobó que la CHX con agua destilada no produce el precipitado de PCA, lo cual les permitió demostrar que es la mezcla la causante de la producción de PCA y no que la CHX espontáneamente genera este compuesto, por otra parte, en nuestro estudio, utilizando similar metodología fue obtenida PCA en las cuatro mezclas con saliva, con una m/z de 128 uma, pero además la paracloroanilina formó un aducto con el ion sodio con una m/z de 153 uma.

La presencia normal de cloro en saliva es de 16 mEq/L mientras que la de sodio es de 7,6 mEq/L ($\pm 3,2$) formando parte del 1% de sustancias inorgánicas de la saliva. Llena Puy et. al (2006), menciona algunas enfermedades por las cuales podría aumentar la cantidad de electrolitos, entre ellos cloro y sodio, en la saliva, dentro de estas encontramos enfermedades hereditarias como la fibrosis quística, donde hay una alteración del transporte de electrolitos en las células epiteliales, también se encuentra asociación con el aumento de electrolitos en el Síndrome de Sjögren³¹. Así mismo, Téllez M. (2011) relata un aumento de la concentración de sodio en saliva en procesos de inflamaciones agudas. La importancia de que todas estas enfermedades produzcan un incremento de los electrolitos cloro y sodio en saliva, es que aumenta la probabilidad de generar en mayores cantidades PCA en este tipo de pacientes, por lo tanto en la práctica clínica se deberán tener ciertas consideraciones con ellos, tales como recetar concentraciones más baja de CHX 0,2% o 0,12% ya que sabemos que la formación de PCA es directamente proporcional a las concentraciones de CHX, también es recomendable ajustar la duración del tratamiento, si bien no se recomienda su uso por más de 14 días, en estos casos sería suficiente con 7 días y luego evaluar nuevamente al paciente, como medida de prevención. Por esto se recalca la vital importancia de realizar estudios *in vivo*, en humanos durante un tratamiento habitual con CHX.

Además con base en el estudio de Correa F. et.al (2013), debemos destacar la particular condición hormonal de las mujeres, ya que debido a su ciclo menstrual éstas presentan un aumento de las concentraciones de los electrolitos sodio, cloro y potasio en el período preovulatorio³³. Por lo tanto no sería una exageración por parte del clínico tener en consideración para todas sus pacientes, que en primer momento a las adolescentes entre 10 y 15 años confirmará que se encuentran en etapa fértil y posteriormente antes de instaurar un tratamiento con CHX se indagará durante la anamnesis en qué etapa del ciclo ovulatorio se encuentra.

Por lo tanto en todas las situaciones anteriormente descritas podría considerarse contraindicar la clorhexidina o utilizar las medidas preventivas indicadas anteriormente, ya que frente a mayores concentraciones de cloro y sodio en saliva existiría una mayor probabilidad de generar PCA en cantidades potencialmente dañinas para el ser humano.

La Clorhexidina se presenta como el “*Gold Estándar*” de los colutorios orales que se utilizan hoy en día, debido a múltiples factores, principalmente por su gran potencial antibacterial y su característica de sustantividad. Gómez et. al (2013) explica la sustantividad como la capacidad de permanecer en las superficies bucales de carga negativa (dientes, mucosa y restauraciones) y de ser liberado lentamente, por lo tanto de esta manera mantiene una prolongada actividad antimicrobiana que según diferentes estudios en base a la forma de presentación (líquida o gel) se encuentra entre las 48 hrs, 7 a 21 días, incluso 4 hasta 12 semanas³⁴.

Según García et. al. (2013) la viabilidad bacteriana media en la saliva en condiciones basales fue significativamente mayor que la detectada en biofilm. A los 30 segundos después de la aplicación de CHX al 0.2%, los niveles de bacterias viables detectadas en saliva fueron significativamente inferiores a los observados en biofilm. A las 1 y 3 horas después los niveles detectados en la saliva y biofilm eran similares. La diferencia en el porcentaje de bacterias viables detectado en la saliva fue significativamente mayor que la observada en biofilm a las 5 horas y a las 7 horas después de CHX al 0.2 %³⁵.

Esta propiedad guarda relación con las moléculas de CHX disponibles para interactuar³⁴, por lo tanto cabe preguntarse si esta propiedad juega un rol en la generación de PCA, ya que según el párrafo anterior la sustantividad en saliva es mayor que en biofilm, es posible que debido a esta capacidad, el tiempo durante el cual la CHX y la saliva están en interacción generaría una mayor y continua formación de PCA, frente a lo mismo, las complicaciones que podría traer al paciente la cantidad generada o incluso aún, estar expuesto por tanto tiempo a una sustancia que se conoce como teratogénica y mutagénica, es por esto que se enfatiza en la importancia de generar estudios en humanos durante un tratamiento con CHX e incluso ya que algunos autores comprobaron que el tiempo de sustantividad podría ser hasta 12 semanas, estos estudio propuestos deberían tener una duración mínima de 3 meses para encontrar respuesta a esta interrogante.

Desde otro punto, los efectos y reacciones adversas de la Clorhexidina han sido ampliamente investigados. Es así como Bascones A. et.al. (2006), se refieren a la toxicidad y efectos adversos que puede provocar el uso de la clorhexidina, en donde no se reconoce toxicidad sistémica por la aplicación tópica o ingestión de esta, ni hay evidencia teratogénica en modelos animales¹⁷. No obstante, la hidrólisis de la clorhexidina y su consecuente generación de PCA, podría ir en contra de esta aseveración, debido al ampliamente conocido potencial mutagénico del PCA. Una sustancia con capacidad mutagénica es aquella que provoca cambios o alteraciones en la información genética (ADN) de un organismo, por lo que la acumulación de PCA en la etapa de gestación de un individuo, provocado por el constante y prolongado uso de la clorhexidina por parte de la madre, podría aumentar la probabilidad de generar mutaciones en el feto y proporcionarle a la Clorhexidina efectos teratogénicos, los cuales serían inherentes a ella, al no controlar su proceso de hidrólisis al contactarse con la saliva.

Corroborando esta idea, Riberiro et. al. (2004), demostró en un modelo experimental animal en ratas, que el uso de clorhexidina es capaz de inducir un daño primario en el ADN de leucocitos y en las células la mucosa oral de ellas¹⁷, lo cual podría estar en directa relación con la generación de PCA.

Actualmente, la clorhexidina es indicada para las mujeres embarazadas en diferentes concentraciones y proporciones para prevenir la enfermedades periodontales que se pueden presentar en ese periodo, por lo que, sería favorable, indagar si estas concentraciones y proporciones, son capaces de generar una cantidades de PCA nocivas, que podrían provocar mutaciones en sus descendientes.

Coincidiendo con Basrani, et al. (2010), se reconoce el potencial tóxico de la paracloroanilina, ya que se describen isómeros con diferentes acciones tóxicas, sin embargo es imposible discriminar entre los isómeros³⁶. Por otra parte, Boehncke A. et.al. (2003), la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la International Agency for Research on Cancer (IACR) categorizan la paracloroanilina en el Grupo 2B, que significa que este agente es potencialmente carcinogénico para los humanos, esto basado en la escasa evidencia en humanos y en la suficiente evidencia existente en animales experimentales sobre su efecto carcinogénico. Se trata de un compuesto tóxico, ya sea por inhalación, digestión o contacto con la piel, ojos o mucosas. El nivel máximo tolerable de exposición humana a PCA para producir efectos en el organismo como por ejemplo metahemoglobinemia está en el orden de 2µg/kg de peso/día. La exposición accidental aguda a concentraciones altas de PCA puede ser mortal³⁷.

Estudios toxicológicos en animales han demostrado que la exposición repetida a PCA produce cianosis y metahemoglobinemia, seguidas de efectos en el hígado, bazo y riñón, que se manifiestan como cambios en los parámetros hematológicos, esplenomegalia y hemosiderosis de moderada a grave en el bazo, el hígado y el riñón, parcialmente acompañada de hematopoyesis extramedular. Estos efectos se producen tras una hemólisis excesiva inducida por el compuesto y son coherentes con una anemia hemolítica³⁷.

El mismo estudio menciona otros nombres con los que se conoce el compuesto de PCA, los cuales son: p-cloroanilina, 1-cloro-4-aminobenceno, 4-cloro-1-aminobenceno, 4-clorobenzenoamino, 4-cloroaminobenceno, y 4-clorofenilamina, dependiendo de la pureza del producto³⁷.

En base a todo lo antes mencionado es importante tener claro la toxicidad real del compuesto de PCA, que si bien las cantidades que se generan al mezclar saliva con clorhexidina no son probablemente cercanas al valor 2µg/kg de peso/día que podrían generar efectos no tolerables al organismo, no existen estudios en relación a la acumulación de PCA en el organismo a través de los años.

Este estudio, al ser una investigación experimental *in vitro*, posee la limitación de no representar en su totalidad las condiciones del medio bucal, y además al poseer solo un donante de saliva con condiciones favorables de salud oral y general, no es posible extrapolar en su totalidad los resultados obtenidos, a las diversas patologías descritas anteriormente.

CONCLUSIÓN

A través de los resultados encontrados al realizar la mezcla binaria de Clorhexidina con saliva humana, se confirma la hipótesis inicial, pues se presentaron precipitados sólidos de paracloroanilina en todas las mezclas realizadas, independiente de la concentración de Clorhexidina utilizada, es por esto que se verifica la inherente reacción de hidrólisis que sufre esta sustancia química, inclusive en un medio universal, como es la saliva.

Además, se observa la presencia de componentes precipitados en las diferentes mezclas binarias, sin embargo, no fue posible cuantificar estos, pues este estudio tuvo carácter cualitativo, si se quisiera determinar cuantitativamente el espectrómetro de masas, debiese acoplarse a un cromatografía líquido y la técnica de medición sería LC-MSMS. Dentro de todos los componentes se pudo detectar con precisión 8 especies moleculares cloradas de clorhexidina.

A través de espectrometría de masas, se detectó la presencia de PCA en las mezclas binarias de saliva con CHX al 0,12 %, en proporción 1:1 y 1:2, siendo esta última donde la intensidad de la línea espectral fue mayor.

Mediante la misma espectrometría de masas, también se detectó la presencia de PCA en las mezclas binarias de saliva y CHX al 2% en proporción 1:1 y 1:2, siendo esta última donde la intensidad de la línea espectral fue mayor.

SUGERENCIAS

Se sugiere la realización de nuevos estudios para cuantificar la cantidad de PCA que se genera al mezclar la saliva con la clorhexidina, si bien en primera instancia estos estudios se realizan in vitro, se recomienda realizar estudios in vivo en humanos que permitan determinar la presencia de PCA en situaciones clínicas reales de tratamiento odontológico, su cuantificación y su posible acumulación en el organismo al paso del tiempo.

Así también se recomienda determinar la cantidad de clorhexidina que queda disponible en la mucosa luego de realizar un enjuague bucal de rutina durante un tratamiento.

RESUMEN

Background: La Clorhexidina (CHX) se utiliza ampliamente en la práctica odontológica, sin embargo se conoce la generación del subproducto paracloroanilina (PCA) tóxico, mutagénico y carcinogénico del cual no existe evidencia científica que evalúe su formación en una mezcla de CHX y saliva, tal información contribuiría con la salud de los pacientes.

Objetivo: Evaluar la presencia de precipitados sólidos de PCA en mezclas binarias activadas mediante Ultrasonido, entre CHX en dos concentraciones, (2 % y al 0.12 %), con saliva humana, in vitro.

Materiales y método: Estudio experimental descriptivo in vitro, se recolectó saliva no estimulada por 5 minutos, las muestras serán divididas en cinco grupos compuestas por 300 ul saliva con 300 ul de CHX al 0,12% y al 2%, en proporción 1:1 y 1:2 (saliva:CHX). Cada muestra fue agitada por 5 minutos a 37°C y centrifugada a 5.000 rpm. La presencia de precipitado se descartó el sobrenadante y se solubilizó cada precipitado en 2 mL de una solución de acetonitrilo+ agua con 0,1 % de ácido fórmico. El sobrenadante fue analizado en el espectrómetro de masas 3200 Qtrap LC-MS/MS por el software Analyst 1.5 propio del instrumento.

Resultados: En todas las mezclas hubo formación de un precipitado coloidal blanquecino, más evidente en las mezclas IIB y IIC. Las especies moleculares correspondientes a CHX detectadas, son 254, 505 y 701 m/z, representadas por $[M+2H]^+$, $[M+H]^+$ y $[M+H]^+$, corresponden a las especies ionizadas de CHX. Existe presencia de para-cloroanilina (C_6H_6ClN), en las cuatro mezclas de CHX con saliva con una m/z de 128 una correspondiente a la especie $[M+H]^+$, la PCA forma un aducto con el ion sodio presentando una especie molecular de la forma $[M+Na]^+$ con una m/z de 153 una y un aducto con el ion cloro.

Discusión: Según Prado et. al (2013) la formación de PCA se debe a la incorporación de iones cloro en la molécula de CHX, ahora bien C.Carpo y C. Rodríguez (2015) demostraron que tal reacción no se produce de manera espontánea, al igual que en nuestro estudio se necesitó de iones de cloro y sodio. Diferentes estudios corroboran que la composición salival varía según enfermedades, embarazo, género, etc. Riberiro et.al (2004) y Basrani et. al (2010) reconocieron el potencial tóxico de la PCA, por lo que en base a los resultados sugerimos más estudios.

Conclusión: Se presentaron precipitados sólidos de PCA en todas las mezclas, independiente la concentración de CHX utilizada, se verifica la inherente reacción de hidrólisis que sufre esta sustancia química, inclusive en un medio universal, como es la saliva.

BIBLIOGRAFÍA

1. Castro R, Guzmán G, Giacaman R. Comparación de la concentración total de proteínas salivales de adultos y adultos mayores. *Rev Clin Periodoncia Implantol Rehabil Oral*. 2012;5 (1):25-28.
2. Llena Puy C. La saliva en el mantenimiento de la salud oral y como ayuda en el diagnóstico de algunas patologías. *Med. oral patol. oral cir.bucal*. 2006; 11(5): 449-455.
3. Walsh L. Aspectos clínicos de biología salival para el clínico dental. *Revista de mínima intervención en Odontología*. *Int Dent S Afric* 2007; 9:22-41
4. Romero M, Rojas Morales T, Morón Medina A, Navas R, Álvarez C J. Flujo salival, pH y capacidad amortiguadora en niños y adolescentes cardiopatas: factor de riesgo para caries dental y enfermedad periodontal. *Estudio preliminar*. *Ciencia Odontológica* 2008; 517-26.
5. Todorovic T, Dozic I, Barrero M V, Ljuskovic B, Pejovic J, Marjanovic M, et al. Enzimas salivales y enfermedad periodontal. *Med. oral patol. oral cir.bucal*. 2006;11 (2): 115-119.
6. Bezerra Júnior A, Pallos D, Cortelli J, Saraceni C, Queiroz C. Evaluation of organic and inorganic compounds in the saliva of patients with chronic periodontal disease. *Rev odonto ciênc (Online)*. 2010;25(3):234-238.
7. Bielawski K. Mucin levels in saliva of adolescents with dental caries. *Med Sci Monit*. 2014;20:72-77.
8. Cornejo L, Brunotto M, Hilas E. Factores salivales asociados a prevalencia e incremento de caries dental en escolares rurales. *Revista de Saúde Pública*. 2008;42(1):19-25.
9. Caridad C. El pH, flujo salival y capacidad buffer en relación a la formación de la placa dental. *Odous Científica Vol IX No 1*; 2008.
10. Lépéz Macarena, Caamaño Egardo, Romero Carmen, Fieldler Jenny, Araya Verónica. Determinación de los niveles de cortisol salival en una muestra de sujetos de Santiago de Chile. *Rev. méd. Chile*. Feb 2010; pág. 168-174.
11. C. Carpo, C. Rodríguez. Detección IN VITRO de Paracloroanilina en el precipitado formado por la interacción química de mezclas binarias activadas de distintos irrigantes utilizados en la cátedra de Endodoncia de la Universidad de Valparaíso. Valparaíso, Chile, 2015.
12. Martínez-Pabón M, Martínez C, López-Palacio A, Patiño-Gómez L, Arango-Pérez E. Características fisicoquímicas y microbiológicas de la saliva durante y después del embarazo. *Rev. salud pública*. 16 (1): 128-138, 2014.
13. Actis AB; Simbrón, A; Brunotto, M; Gómez de Ferraris ME. Concentración de proteínas totales en saliva de jóvenes consumidores sociales de alcohol. *Acta odontol. venez v.44 n.2 Caracas ago*. 2006.
14. Osorio González A, Bascones Martínez A, Villarroel-Dorrego M. Alteración del pH salival en pacientes fumadores con enfermedad periodontal. *Avances en Periodoncia*. 2009;21(2).

15. Basrani B. Update en Clorhexidina. Revista de la Sociedad de Endodoncia de Chile. Canal Abierto. N°29, Sept. 2009, pág. 6.
16. Saldaña J. Efectividad antibacteriana del uso alternado de dos soluciones de gluconato de clorhexidina al 0.12% y 2% con hipoclorito de sodio al 5.25% en el tratamiento de conductos radiculares. 2008.
17. Bascones A, Morante S. Antisépticos orales. Revisión de la literatura y perspectiva actual. Av Periodon Implantol. 2006; 18, 1: 31-59.
18. Torres Lopez Mileydi, Diaz Alvarez Marcial, Acosta Morales Alina. Chlorhexidin: Structural bases and applications in stomatology. Revisión bibliográfica. Gaceta Médica Espirituana 2009; 11(1).
19. Basrani B, Manek S, Sodhi R, Fillery E, Manzur A. Interaction Between Sodium Hypochlorite And Chlorhexidine Gluconate, J Endod 33:966, 2007.
20. Basrani B, Manek, S, Sodhi R, Filler E, Manzur A. Interaction between sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate. J Endod, 33 (2007), pp. 966–969.
21. Onetto D, Correa V, Araya P, Yévenes I, Neira M. Efecto del ultrasonido endodóntico sobre clorhexidina al 2% en la formación de paracloroanilina. Estudio in vitro. Rev Clin Periodoncia Implantol Rehabil Oral. 2015.
22. Gary D. Christian Química analítica, Sexta Edición. Capitulo n°1. Editorial McGraw Hill.
23. Sparkman O, Penton Z, Kitson F. Gas Chromatography and Mass Spectroetry a Practical Guide, 2011.
24. Espectrometría de masas. Portal del Museo nacional ciencias naturales, España. Disponible desde:
http://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es_ES/investigacion/cromatografia/e_spectrometria_de_masas.pdf
25. Corral A. Fundamentos y Funciones de la espectrometría de masas. Universidad de Valencia, Facultad de Farmacia, departamento de química analítica. Valencia, Mayo, 2006.
26. Productos 3200 QTRAP System. Sciex, Answers for Science. Knowledge for Life. Disponible desde: <http://sciex.com/products/mass-spectrometers/qtrap-systems/3200-qtrap-system>
27. Chang R, Collage W. Química Séptima Edición. ISBN 976-10-3894-0. Capítulo 4: Reacciones en disolución acuosa, 4.2 Reacciones de precipitación, página 108.
28. Bilbao M. Influencia del suero fisiológico en la formación de paracloroanilina, estudio in vitro. Tesis Universidad de Chile. 2013.
29. Chang R, Collage W. Química Séptima Edición. ISBN 976-10-3894-0. Capítulo 1: Química: El estudio de los cambios, 1.4 Clasificación de la materia, Sustancias y mezclas, página 8.
30. Prado M¹, Santos Júnior HM, Rezende CM, Pinto AC, Faria RB, Simão RA, Gomes BP. Interactions between irrigants commonly used in endodontic practice: a chemical analysis. J Endod. 2013 Apr;39(4):505-10.
31. Llena Puy Carmen. La saliva en el mantenimiento de la salud oral y como ayuda en el diagnóstico de algunas patologías. Med. Oral Patol. Oral Cir.bucal (internet) [internet] 2006 Sep [citado 2016 Jun 19]; 11 (5):449-455.

32. Téllez M. Ph salival y su capacidad amortiguadora como factor de riesgo de Caries en niños de la escuela primaria federal "Ignacio Ramirez". Universidad de Veracruz, Región Poza Rica-Tuxpan, Nov 2011.
33. Correa F. et.al. Cambios en las concentraciones de Na⁺, K⁺ y Cl⁻ en la saliva humana inducidas por el ciclo ovárico. Avances en ciencias de la Salud (2):25-29. Dic 2012 – May 2013. ISSN 2244-809.
34. Gomes Brenda PFA, Vianna Morgana E., Zaia Alejandro A., A. Almeida José Flávio, Souza Filho-Francisco J., Caio Ferraz CR. Clorhexidina en endodoncia. Braz. Mella. J. 2013 May; 24 (2): 89-102.
35. García Caballero L., Quintas V., Prada López I., Seoane J., Donos N., Tomás I. Chlorhexidine Substantivity on Salivary Flora and Plaque-Like Biofilm: An In Situ Model. PLOS ONE 8(12); December 27, 2013.
36. Basrani Bettina R., Manek S., Mathers D et.al. Determination of 4-chloroaniline and its derivatives formed in the interaction of sodium hypochlorite and chlorhexidine by using gas chromatography. JOE Volume 36, Number 2, Feb 2010.
37. Boehncke A. et.al. Concise international Chemical Assessment Document 48. 4-Chloroaniline. First draft prepared by Drs A. Boehncke, J. Kielhorn, G. Könecker, C. Pohlenz-Michel, and I. Mangelsdorf, Fraunhofer Institute of Toxicology and Aerosol Research, Drug Research and Clinical Inhalation, Hanover, Germany. World Health Organization 2003.