



MARC
7/11

R 17419

T
N584E
2011



Universidad de Valparaíso
Facultad de Odontología
Escuela de Graduados
Especialidad de Periodoncia e Implantología

Evaluación *in vitro* de las tinciones provocadas por dos marcas comerciales de té asociadas a clorhexidina

**Trabajo de Investigación
Requisito para optar a la
Especialidad de Periodoncia e Implantología**

Alumno: Dr. Enzo Niccoli Merello
Directora de Programa: Dra. Gianina Caneppa Martin
Docente guía: Dr. Jorge Godoy Olave

Valparaíso
2011

Dedicatoria

Este trabajo está dedicado a quienes con su incondicional apoyo han hecho posible este logro.

Agradecimientos

A mi familia, profesores, compañeros y amigos ya que sin su ayuda esta tarea no habría sido posible.

INDICE

Introducción	1
Marco teórico	2
I. Color dentario y su percepción	2
o Color dentario	2
o Cambios en el color dentario	3
II. Rol de la película adquirida en la tinción dentaria extrínseca	6
III. Elementos que inducen tinción dentaria extrínseca	8
o Efectos de la dieta	8
o Agentes catiónicos. Clorhexidina	11
o Efecto provocado por el uso combinado del té negro con la CHX en la tinción dentaria extrínseca	13
IV. Métodos de medición del grado de tinción dentaria extrínseca	14
o Métodos de medición subjetivos	14
o Determinación del color con la ayuda de instrumentos digitales	14
Objetivo	17
Hipótesis	18
Materiales y métodos	18
Resultados	24
Discusión	35
Conclusiones	38
Sugerencias	39
Resumen	40
Bibliografía	41
Anexos	45
I. Tabla de registro de datos	46

INTRODUCCIÓN

La clorhexidina (CHX) es el antiséptico más utilizado en periodoncia debido a sus propiedades antisépticas y limitados efectos adversos. En Chile suele utilizarse en concentraciones de 0.05% o 0.12% en colutorios bucales, aunque también puede encontrarse en diferentes concentraciones y presentaciones comerciales, tales como: dentífricos (0.12%), geles (1%), etc., los que se encuentran al alcance de la población debido a su amplia disponibilidad y relativamente bajo costo. Entre los efectos adversos del uso prolongado de CHX se cuenta la tinción extrínseca de dientes y lengua como los más comunes e importantes, aunque se consideran de baja gravedad.

Además de la CHX, la tinción dentaria también puede ser inducida por compuestos cromógenos presentes en la dieta, tales como el café, vino tinto y particularmente el té. En el mercado existen dos variedades principales de té: el negro y el verde. Ambos se obtienen a partir de una misma planta (*Camellia Sinensis*), sin embargo, tanto su modo de fabricación como el producto final obtenido varían en su sabor, color, aroma y composición. Durante largos años en Chile se comercializó principalmente el té negro, estando disponible en supermercados y almacenes para la venta del público en general, sin embargo, en el último tiempo se ha masificado el consumo de té verde.

El uso de CHX en combinación con la ingesta de té puede incrementar aún más el riesgo de tinción dentaria. Los cambios en el color dentario generan problemas estéticos, lo que conlleva a que tanto el profesional como los pacientes ocupen considerables cantidades de tiempo y dinero en intentos por mejorar su apariencia.

De acuerdo con estos antecedentes, consideramos importante poder conocer ¿cuál es el potencial de decoloración dentaria de los elementos presentes en nuestra dieta habitual?, de modo de poder prevenir posibles efectos adversos de importancia.

MARCO TEÓRICO

I. EL COLOR DENTARIO Y SU PERCEPCIÓN

Color dentario

Se puede percibir que un diente posee numerosos colores graduados desde el margen gingival hasta el borde incisal. El margen gingival a menudo tiene una apariencia más oscura, comparado con el resto de la corona dentaria, debido a su cercana aproximación a la dentina bajo esmalte. En la mayoría de las personas el diente canino es más oscuro que los incisivos, y las personas más jóvenes generalmente tienen dientes más claros, particularmente en la dentición primaria. Los dientes se oscurecen por cambios fisiológicos de la edad, como por ejemplo: aposición de dentina secundaria, incorporación de tinciones extrínsecas y un desgaste gradual del esmalte que permite la influencia en el color en la dentina subyacente. Además, el desgaste dentario y las recesiones gingivales pueden afectar directamente o indirectamente el color dentario (Watts y Addy, 2001).

Tanto para la percepción del color como para su descripción, las condiciones en que se observa son muy importantes y variables, pudiendo afectar el color aparente del diente. Estas son: la fuente de luz, las condiciones del día, las condiciones del entorno y el ángulo desde el cual se mira. La luz está compuesta de distintas longitudes de onda y el mismo diente visto desde diferentes condiciones puede exhibir un color diferente, fenómeno conocido como metamerismo (Watts y Addy, 2001).

Dado que el color no es una magnitud física, sólo es posible referirlo a través de sus propiedades: Tono, valor y croma.

Tonalidad o matiz: Corresponde a un intervalo de longitud de onda en que se descompone la luz blanca. En términos descriptivos, permite distinguir entre diferentes familias de colores, por ejemplo: rojos, azules o verdes (Henostroza y cols., 2006; Watts y Addy, 2001).

Valor, brillo o luminosidad: Es la propiedad que distingue los colores claros de los oscuros. El blanco es el color de mayor brillo, el negro es el opuesto y entre medio existe una gama de grises cuyo valor dependerá de la proporción de su combinación. En otras palabras corresponde a la relativa claridad u oscuridad de un color en una escala desde el negro al blanco. Cuanto más gris es un color menor será su valor; por el contrario, cuanto más se aproxime al blanco será más brillante, reflejando más luz, mayor valor (Henostroza y cols., 2006; Watts y Addy, 2001).

Croma: Es el grado de saturación o intensidad del tono, por ejemplo: de rosado a carmesí. La pureza de un tono expresa la vivacidad o palidez del mismo. También se define por la cantidad de gris que contiene un color. Más gris en su proporción menos saturado es el croma (Henostroza y cols., 2006; Watts y Addy, 2001).

Millar y cols., 1987, sugirieron la adición de una cuarta dimensión para este sistema de color de tres dimensiones, en la forma de opacidad/translucidez (Watts y Addy, 2001).

La percepción del color y sus propiedades varían si el objeto se observa a través de un elemento transparente, traslúcido con o sin opalescencia. Las superficies con distinto grado de textura y pulido también generan diferencias en la apreciación del color. En particular, lo que se refiere al esmalte dental, la luz incidente lo atraviesa como un elemento traslúcido, dispersándose parcialmente en su espesor y reflejando el resto en la dentina que actúa como elemento opaco de reflexión (Henostroza y cols., 2006).

Los dientes, y en especial el esmalte, son elementos fluorescentes que responden adecuadamente a estímulos de las luces con componentes ultravioletas (Henostroza y cols., 2006).

Cuando la luz atraviesa el esmalte natural y encuentra un obstáculo de menor longitud de onda como los cristales de hidroxiapatita (16um x 0.04um) produce tonos azulados similares al ópalo (Henostroza y cols., 2006).

Tres factores pueden influenciar la percepción del color: la fuente de luz, el objeto que se está viendo y el observador que mira el objeto. La fuente de luz puede emitir energía radiante en un rango de longitudes de onda y esta se caracteriza por una cantidad relativa de energía emitida en cada longitud de onda del espectro visible. El reflectante espectral de un objeto determina el color característico del diente. El sistema visual del observador final del ojo y el cerebro finalmente afecta la percepción del color en su forma completa (Joiner, 2004).

La porción coronal de un diente consiste de esmalte, dentina y pulpa. Cualquier cambio de estas estructuras seguramente causará una alteración en la apariencia externa del diente ocasionada por sus propiedades de transmisión y reflejo de luz. La apariencia del color dentario es dependiente de la cualidad de la luz reflejada y es, también, como una consecuencia dependiente de la luz incidente (Watts y Addy, 2001).

El color de un diente está determinado por una combinación de sus propiedades ópticas. Cuando la luz se encuentra con un diente, se pueden describir cuatro fenómenos asociados con la interacción del diente con el flujo de luz: a) Transmisión especular de la luz a través del diente, b) reflexión especular, c) reflexión difusa de la luz en la superficie y d) absorción y dispersión de la luz dentro de los tejidos dentales (Joiner, 2004).

Cambios en el color dentario

- Clasificación

Históricamente la decoloración dentaria ha sido clasificada de acuerdo a la localización de la tinción, la cual puede ser intrínseca o extrínseca. También se puede incluir en esta clasificación si la tinción está internalizada (Watts y Addy, 2001).

a.- Tinción intrínseca

Ocurre a continuación de un cambio en la composición estructural o grosor de la dentina. El color normal de un diente está determinado por los tintes: azul, verde y rosado del esmalte, que son reforzados por un fondo que va entre el amarillo y el café de la dentina subyacente. Se sabe que enfermedades metabólicas y factores sistémicos afectan el desarrollo de la dentición y causan decoloración como consecuencia. Además, factores locales e injurias también pueden provocar este efecto (Watts y Addy, 2001).

La formación de decoloración dentaria intrínseca ocurre durante el desarrollo que resulta en una alteración de las propiedades de transmisión de la luz de la estructura dentaria. Numerosas alteraciones metabólicas pueden afectar la dentición durante su formación, entre estos encontramos: alcapnórea, porfiria eritropoyética congénita, hiperbilirrubinemia congénita, amelogénesis imperfecta, dentinogénesis imperfecta, tinción por tetraciclina, fluorosis, hipoplasia de esmalte, productos hemorrágicos pulpares, reabsorción radicular y envejecimiento (Watts y Addy, 2001).

b.- Tinción extrínseca

Son sustancias pigmentadas que se pueden depositar sobre la película adquirida (del esmalte) sin afectar la composición estructural de el o los dientes afectados. Se ha asociado a la absorción de materiales tales como: té, vino tinto, clorhexidina y sales de hierro (Joiner, 2004).

La película adquirida tiene una tendencia a desarrollar tinciones, particularmente en aquellas áreas de la dentición que son inaccesibles para el cepillado y la acción abrasiva de los dentífricos (Forward, 1991; Joiner y cols., 2003).

Las causas de tinción extrínseca pueden ser divididas en dos categorías: 1) directas: producidas por aquellos compuestos que son incorporados en la película adquirida y producen tinción como resultado de su color de base y 2) indirectas: aquellos que producen una tinción provocada por una interacción química en la superficie del diente (Watts y Addy, 2001).

b.1- Tinción dentaria directa

La tinción dentaria directa tiene una etiología multifactorial con cromógenos derivados de fuentes dietéticas o habitualmente puestos en boca. Los cromógenos orgánicos son captados por la película adquirida y el color obtenido está determinado por el color natural del cromógeno. Se sabe que fumar y/o mascar tabaco causan tinción, así como bebidas particulares tales como té y café. Se piensa que los cambios de color que se observan en los dientes derivan de los compuestos polifenólicos presentes en la dieta (Watts y Addy, 2001).

b.2- Tinción dentaria indirecta

La tinción dentaria indirecta se asocia a cationes antisépticos y sales metálicas. El agente no posee color o posee un color diferente a la tinción que produce sobre la superficie dentaria (Watts y Addy, 2001).

Por otra parte, las tinciones dentarias extrínsecas se pueden clasificar de acuerdo a su origen en: 3) metálicas y 4) no metálicas.

b.3- Tinciones no metálicas

Las tinciones extrínsecas no metálicas son adsorbidos en sobre depósitos de la superficie dentaria tales como placa o película adquirida. Los posibles agentes etiológicos incluyen componentes dietéticos y medicamentos. Se ha observado que ciertas tinciones están asociadas con determinados hábitos, por ejemplo: tinciones verde y naranja en niños con higiene oral deficiente y tinciones negro/café en niños con buena higiene oral y baja experiencia de caries. No se ha reportado evidencia conclusiva acerca del mecanismo cromógeno de las bacterias (Watts y Addy, 2001).

b.4- Tinciones metálicas

Este tipo de tinciones dentarias extrínsecas pueden asociarse a ciertas terapias ocupacionales relacionadas con sales metálicas, por ejemplo: trabajadores en fundiciones de hierro presentan regularmente tinciones dentarias negras características. También se pueden asociar a medicamentos que contengan sales metálicas. Algunos metales tienen colores asociados, por ejemplo: el permanganato de potasio produce un color que va del violeta a negro cuando es usado en colutorios; sales de nitrato de plata usada en odontología causan un color gris y el fluoruro de estaño causa una decoloración café/dorada (Watts y Addy, 2001).

Dado que las tinciones extrínsecas están en la superficie del diente, estas pueden ser removidas por la acción abrasiva de pastas profilácticas y controladas por el uso regular de ciertas pastas dentales (Joiner, 2004).

c.- Tinción internalizada

Las tinciones que se producen dentro del cuerpo del esmalte o dentina son las mismas que aquellas que causan la decoloración extrínseca, incluyendo en particular los cromógenos dietarios, entre otros (Watts y Addy, 2001).

Los defectos dentarios que permiten la entrada de material cromógeno pueden ser clasificados de acuerdo a si son desarrollados o adquiridos.

c.1- Defectos del desarrollo

Los defectos del desarrollo crean un cambio en el color causado por la influencia en la transmisión de la luz a través de la dentina y el esmalte. Estas se producen una vez erupcionado el diente ya sea por un aumento en la porosidad o presencia de defectos de esmalte, por lo tanto las tinciones pueden penetrar dentro de éste. Un ejemplo puede corresponder a la fluorosis y otras condiciones del esmalte que resulten en una hipoplasia o hipocalcificación. Además, estos defectos pueden exponer dentina tanto en forma directa como tardía causada por la pérdida temprana de esmalte como por ejemplo en la dentinogénesis imperfecta. Los cromógenos son por lo tanto capaces de entrar en la dentina directamente o a través de su sistema de túbulos (Watts y Addy, 2001).

c.2- Defectos adquiridos

Con el transcurso de los años, el uso, desgaste y lesiones de los dientes y tejido periodontal, pueden provocar directa o indirectamente tinción dentaria. Además las restauraciones, desgaste dentario, recesiones gingivales, caries, amalgamas, etc., pueden influenciar el color dentario (Watts y Addy, 2001).

II. ROL DE LA PELÍCULA ADQUIRIDA EN LA TINCIÓN DENTARIA EXTRÍNSECA

La película adquirida salival es una biopelícula, libre de bacterias, que cubre los tejidos bucales, tanto blandos como duros. Sus componentes más abundantes son: proteínas, glicoproteínas, enzimas (amilasa, lisozima, anhidrasa carbónica, glucosiltransferasa y fructosiltransferasa) y mucinas o sus derivados. Lubrica las superficies dentarias para prevenir el desgaste, forma una barrera anti-erosiva y buffer, sirve como reservorio de electrolitos para la remineralización y exhibe propiedades antimicrobianas. Además, la película adquirida juega un rol en la colonización bacteriana de las superficies dentarias, mediante la adherencia no específica y selectiva de microorganismos. La película adquirida es, como cualquier biofilm presente en la cavidad oral, una unidad ecológica vital, siempre cambiante y dinámica, en la que se aprecia una constante absorción y desorción de biomoléculas (Hannig y cols., 2005; Hannig y Hannig, 2009).

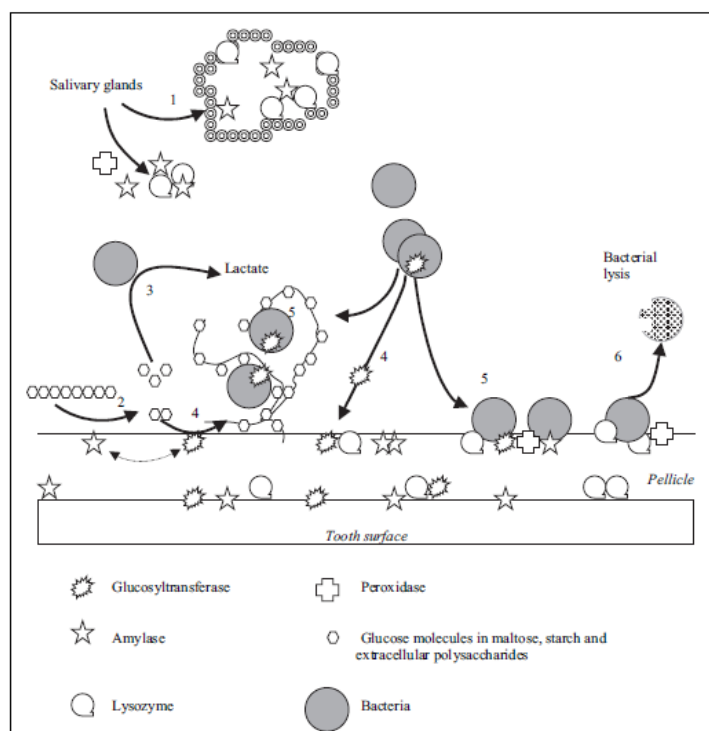


Figura 1. Esquema de la película adquirida. (Hannig y cols., 2005). Absorción de amilasa, lisozima, peroxidasa y glucosiltrasnferasa a la película adquirida y su interacción con bacterias y carbohidratos. 1- Saliva y sus enzimas son secretadas a la cavidad oral en estructuras globulares similares a micelas. 2- Almidón es hidrolizado por la amilasa liberando glucosa para el metabolismo bacteriano y maltosa para la síntesis de polisacáridos extracelulares. 3- La glucosa es metabolizada por bacterias y se libera lactato. 4- Síntesis de polisacáridos extracelulares por la glucosiltrasnferasa liberada a a partir de bacterias. 5- Todas las enzimas facilitan la adherencia bacteriana a la superficie dentaria- 6- Lisosimas y peroxidasa ejercen efecto antibacteriano.

Se cree que ciertos tipos de proteínas salivales que forman parte de la película adquirida pueden influenciar el proceso de tinción dentaria. Dentro de éstas se destacan: proteínas ricas en prolina ácidas, estaterinas, histatinas y cistatinas (Carpenter y cols., 2005; Jensen y cols., 1992; Proctor y cols., 2005).

La saliva contiene elevadas proporciones (más de un 70%) de proteínas ricas en prolina. Las proteínas ricas en prolina ácidas, junto con las estaterinas y las histatinas, tienen una alta afinidad por la hidroxiapatita y son importantes componentes de la película adquirida. Por otra parte, las proteínas ricas en prolina básicas, tienen una alta afinidad por los polifenoles de la dieta, así como las histatinas (Bennik y Yan, 1995; Hagerman y Butler, 1981; Lamkin y cols., 1996; Proctor y cols., 2005).

Es sabido que proteínas salivales específicas se unen a la hidroxiapatita, el mayor componente mineral del esmalte. Sin embargo, si los polifenoles que se unen a las

proteínas, también se unen al diente, por lo tanto, existe un potencial para que se produzca tinción. Se ha determinado *in vitro* que la hidroxiapatita se une específicamente con estaterinas, proteínas ricas en prolina y algunas histatinas, por lo tanto se piensa que algunas proteínas salivales, incluyendo las proteínas ricas en prolina, pueden mediar un incrementando en la tinción de esmalte por polifenoles (Proctor y cols., 2005).

Los polifenoles son metabolitos secundarios de plantas y se combinan rápidamente con proteínas y pueden inactivar enzimas (Bennick, 2002; Carpenter y cols., 2005).

Inicialmente se pensaba que sólo las proteínas ricas en prolina, las cuales forman más de un 70% del total de proteínas de la saliva de parótida, eran los captadores de alta afinidad de los polifenoles debido a su contenido rico en prolina. Sin embargo, se ha demostrado que las histatinas también captan fuertemente a los polifenoles (Carpenter y cols., 2005; Yan y Bennick, 1995).

Por lo tanto la película adquirida, además de jugar un importante rol en la mantención de la integridad dentaria, mediante la oposición a su descalcificación y la protección al diente de la abrasión, puede mediar en la tinción dentaria extrínseca por polifenoles.

III. ELEMENTOS QUE INDUCEN LA TINCIÓN DENTARIA EXTRÍNSECA

Como se mencionó anteriormente, es aceptado que la presencia de elementos externos que toman contacto y se unen al esmalte dentario sean capaces de inducir un cambio en su coloración.

Las tinciones extrínsecas a menudo son promovidas por (Addy y Moran, 1995; Joiner y cols., 2003; Joines, 2004; Watts y Addy, 2001):

- a.- Ingesta dietética de comidas ricas en taninos, como por ejemplo té, vino tinto, etc.
- b.- Uso de ciertos agentes catiónicos. Ejemplo: clorhexidina
- c.- Otros. Ejemplo: fumar tabaco, higiene oral deficiente.

Efectos de la dieta en la tinción dentaria

Algunos individuos son más susceptibles que otros a las tinciones dentarias extrínsecas, sin embargo las razones para tales diferencias no están del todo claras (Watts y Addy, 2001).

Es sabido que la dieta juega un importante rol en la tinción dentaria. Se piensa que el té, café, vino tinto, y otras comidas ricas en polifenoles son responsables de la tinción dentaria inducida por la dieta (Proctor y cols., 2005).

Los polifenoles son un diverso grupo de sustancias comúnmente encontrado en plantas. Varían desde pequeños flavonoides, tales como las catequinas de té verde y antocianinas de la cáscara de uva, a estructuras altamente polimerizadas que contienen más de 50 moléculas de flavonol, tales como las teaflavinas (1 kDa) y tearubiginas (> 1 kDa) (Bennick, 2002; Proctor y cols., 2005).

Dentro de los elementos presentes en la dieta se destaca el té como una bebida que posee un elevado potencial de tinción dentaria. Se ha determinado que en la composición del té negro se encuentra uno de los mayores grupos de polifenoles – teaflavinas (Amarillo) and tearubiginas (café), las cuales le otorgan su olor y sabor característico (Addy y cols., 2005; Carpenter y cols., 2005). Las teaflavinas forman una pequeña fracción (2%) del peso en seco del té y son estructuras muy pequeñas (300 a 500 MW), mientras que las tearubiginas forman entre el 10 – 15% del peso en seco del té y su estructura es muy variable y generalmente mucho más larga (aproximadamente 3000 MW) (Carpenter y cols., 2005; Haslam, 2003)

El té es capaz de interactuar con muchas proteínas salivales, en particular con proteínas ricas en prolina e histatinas (Carpenter y cols., 2005).

a.- Té

En su estado silvestre, el té es un pequeño árbol de 5 a 10 metros de alto, del género *Thea*. Es originario del sudeste asiático: India, sur de China, Birmania, Vietnam, Tailandia. Se le introdujo en Ceilán a fines del siglo XIX, hacia 1900 en Rusia (Cáucaso), África tropical (Kenia) y más reciente medio oriente (Pradeau, 1998; Schmidt-Hebbel, 1990).

Dentro de sus variedades las más importantes son el té verde y el negro (Schmidt-Hebbel, 1990).

El té verde se prepara exponiendo las hojas recién cortadas a la acción rápida del vapor de agua para inactivar sus enzimas (oxidadas), luego se desecan y se enrollan. Finalmente se obtiene una infusión verdosa de sabor astringente, un poco amarga y de olor aromático (Pradeau, 1998; Schmidt-Hebbel, 1990).

El té negro experimenta fenómenos de oxidación enzimática y su preparación consta de varias etapas, estas son: marchitamiento, arrollamiento, fermentación, desecación y selección (Schmidt-Hebbel, 1990):

- *Marchitamiento* Las hojas son dejadas al aire durante un período de tiempo de entre 12 a 24 horas, a no más de 30°C, para volverlas blandas y flexibles. Hay pérdida de humedad, glúcidos, y a la vez hay liberación de aminoácidos (Schmidt-Hebbel, 1990).

- *Arrollamiento*: Se realiza en máquinas giratorias durante media a una hora. En esta etapa se destruyen las células, se mezclan sus componentes y se produce el contacto de la polifenoloxidasa con sus substratos. Una vez que las hojas se han secado al tacto, éstas se someten a la fermentación (Schmidt-Hebbel, 1990).

- *Fermentación*: A una temperatura de entre 25-40°C, en cámaras cerradas. Parte de los componentes astringentes se vuelve hidrosoluble, eliminándose su sabor acre y liberándose la esencia. El proceso dura entre 2 y 3 horas, hasta que las hojas toman un color rojo cúprico, pues los componentes polifenólicos como los ácidos clorogénico y gálico y sus ésteres, especialmente el galato de galacatequina, son transformados primeramente en quinonas de este color por acción de las polifenolixidas. Pero las quinonas son inestables y generan con el O₂ del aire productos condensados de oxidación, de color negruzco, de propiedades semejantes a los taninos y de carácter polifenólico, con alto peso molecular, formándose así un complejo sistema redox. A la vez se forman, por nuevas oxidaciones, otros pigmentos como la teaflavina (Schmidt-Hebbel, 1990).

- *Desecación*: Se realiza a una temperatura de 95°C, con aire caliente hasta que las hojas negras ya no se doblan sino que se quiebran. Así la fermentación es detenida, y en cierto modo, fijada la composición química (Schmidt-Hebbel, 1990).

- *Selección*: Por tamices o grosor. Las hojas se aromatizan dejándolas 24 horas en recipientes cerrados, en capas superpuestas, con flores partidas de gardenia, jazmín, rosa, magnolia; después se separan por tamización (Schmidt-Hebbel, 1990).

Finalmente se obtiene una infusión rojo castaño, olor aromático y sabor astringente (Schmidt-Hebbel, 1990).

En la composición química del té, el constituyente activo es la cafeína, que se encuentra en un 1.5 a 4%, pero comparado con el café, la acción fisiológica de este último es mayor, por su tostado y también el estado de combinación de la cafeína es distinto. En el té casi la totalidad de la cafeína se encuentra combinada a polifenoles y a tanatos insolubles en los ácidos diluidos y sólo solubles en aclálisis; de tal modo que al ingerirse el infuso de té, en el estómago no es absorbido por haber reacción ácida, haciéndolo únicamente en el intestino (Schmidt-Hebbel, 1990).

El extracto etéreo está constituido por cera vegetal, resina, clorofila y aceites esenciales con más de 20 componentes aromáticos, como diversos alcoholes y aldehídos. Existen, además: proteína vegetal, pequeña cantidad de azúcares reductores, celulosa y sustancias pécticas. Las cenizas son ricas en potasio y manganeso, por lo cual son frecuentemente de color verdoso (Schmidt-Hebbel, 1990).

En la literatura existen reportes que indican que el té negro induce tinción dentaria extrínseca. Un estudio *in vivo* determinó que la cantidad de tinción extrínseca formada en un período de más de 6 semanas con un cepillado normal, se correlacionaba con la cantidad de consumo de té, entregando evidencia de que componentes del té están involucrados en la formación de tinciones extrínsecas (MacPherson y cols., 2000).

En un estudio más reciente (Joiner y cols., 2003), se determinó que deposiciones de componentes del té negro se adsorben en la película adquirida y que esta produce un incremento en la tinción dentaria. En este mismo estudio se determinó que componentes del té negro producen un profundo efecto en la maduración de la película adquirida *in vitro*,

provocando la acumulación de capas de materiales de tinción de mayor espesor, la cual no se remueve rápidamente.

b.- Clorhexidina (CHX)

El antiséptico bucal más utilizado en odontología en la actualidad es el digluconato de clorhexidina, a veces citado también como gluconato de clorhexidina y comúnmente llamado como clorhexidina.

La CHX es el antiséptico que posee el estándar más alto para cumplir con esta función (Jones, 1997). Su fórmula química ($C_{22} H_{30} Cl_2 N_{10}$) consiste de dos anillos simétricos de 4-clorfenil y dos grupos biguanidas conectados por una cadena central hexametileno. La CHX es una base fuerte y dicatiónica a niveles de pH por sobre 3.5 (Lindhe y cols., 2009). A pH fisiológico es una larga molécula dicatiónica con la carga positiva distribuida sobre los átomos de nitrógeno en cualquiera de los dos lados del puente de hexametileno, por lo que tiene la capacidad de adsorberse sobre superficies cargadas negativamente en la cavidad bucal tales como: saliva, mucosa, película adquirida, superficies de paredes bacterianas y dientes para luego ser liberada lentamente, de modo que se mantiene en la saliva en niveles de efectividad por a lo menos 8 horas (Jones, 1997). Dada su naturaleza dicatiónica, a través de una de sus cargas terminales interactúa con la superficie dentaria y la otra remanente queda disponible para interactuar con la membrana celular bacteriana y alterarla (Jones, 1997). El efecto antiséptico de la CHX es de amplio espectro e incluye: bacterias gram positivo y negativo, hongos y levaduras (Emilson, 1997) e inactiva algunos virus lipofílicos, por ejemplo: virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) (Harbison y Hammer, 1989).

La CHX, un catión, es químicamente incompatible con jabones y otros materiales aniónicos. Es sabido que al interactuar con aniones forma sales de baja solubilidad (Barkvoll y cols., 1988; Kirkegaard y cols., 1974), por lo tanto la interacción entre la CHX y materiales aniónicos presentes en dentífricos tales como monofluorofosfato sódico (Na_2FPO_3) (MFP) y lauril sulfato de sodio ($C_{12}H_{25}NaO_4S$ - SLS, detergente sintético) podrían producir inactivación o reducción de su efecto antibacteriano, aparentemente debido a atracciones iónicas de aniones y cationes (Kolahi y Soolari, 2006).

Dada su función y mecanismos de acción, se ha investigado un gran número de posibles indicaciones para este componente: 1) prevención secundaria a continuación de procedimientos quirúrgicos que incluyen terapia periodontal, 2) uso en implantología, 3) manejo de la caries dental 4) pacientes con fijaciones intermaxilares, 5) pacientes comprometidos médicamente, 6) úlceras aftosas recurrentes menores, 7) pacientes con tratamiento de ortodoncia, 8) control de bacteriemia y contaminación operatoria por bacterias orales (Addy y Moran, 1997).

A pesar de sus excelentes propiedades antisépticas, la CHX presenta limitaciones en su uso clínico debido a la posibilidad de efectos adversos que incluyen: 1) tinción extrínseca de dientes y lengua, 2) perturbación transitoria del gusto, 3) descamación de la mucosa oral 4) formación de cálculo supragingival y 5) tumefacción parotídea (Flotra y cols., 1971).

Por otra parte, a nivel celular se han realizado estudios *in vitro* que sugieren que la CHX puede tener efectos adversos en el tejido oral, en concentraciones usadas clínicamente. Se ha reportado que: 1) posee actividad citotóxica en cultivos de células de hueso alveolar (Cabral y Fernández, 2007), osteoblastos, células endoteliales y fibroblastos gingivales (Gianelli y cols., 2008), 2) induce una reducción dosis dependiente de la proliferación de fibroblastos gingivales humanos y de la síntesis de proteínas tanto colágenas como no colágenas en concentraciones que tienen poco efecto en la proliferación celular (Mariotti y Rumpf, 1999; Pucher y Daniel, 1992), 3) previene la adherencia de fibroblastos a las superficies radiculares e interfiere con la regeneración periodontal (Alleyn y cols., 1991), 4) es capaz de inducir daño al DNA en leucocitos y células de la mucosa oral de ratas tratadas diariamente con el compuesto (Ribeiro y cols., 2004).

Además se ha demostrado que: exhibe efectos genotóxicos en células epiteliales y sanguíneas cuando es usado como colutorio bucal en pruebas clínicas (Eren y cols., 2002) y que en modelo de ratón posee un marcado efecto antiinflamatorio (Hourri-Haddad y cols., 2008).

En odontología se suele usar en forma de digluconato en solución alcohólica o acuosa. Es soluble en agua a pH fisiológico (7,4 +/- 0,2) y se disocia rápidamente liberando su carga positiva. De aplicación tópica se utiliza como agente activo en colutorios en concentraciones al 0.05% y 0.12%. También se utiliza en endodoncia como solución para irrigación intraconductos al 2% y en cirugía para la formulación de jabones de mano para lavados quirúrgicos al 4%.

o *Mecanismos de tinción propuestos*

Tras el uso prolongado de CHX pueden aparecer tinciones dentarias extrínsecas de color marrón amarillento tanto en dientes como restauraciones, prótesis e incluso la lengua. Se ha demostrado que la ubicación habitual de este tipo de tinciones son: surcos, fisuras y márgenes gingivales, con una coloración que va del amarillo al marrón, existiendo un aumento en dicha coloración estadísticamente significativo tras un período de empleo de 4 semanas, en forma independiente a la concentración que se use (CHX al 0,1% o el 0,2%) (Ernst y cols., 1999).

También se ha podido determinar que este tipo de pigmentaciones extrínsecas aumentan exponencialmente con el número de ciclos al que el paciente es sometido, además de depender directamente de la composición concreta de la saliva de cada individuo (Sheen y cols., 2001).

Las tinciones producidas por la CHX se pueden clasificar como tinciones indirectas, ya que no es el producto en sí el que provoca la tinción, sino una reacción química de la molécula de CHX al contacto con productos ricos en taninos (café, té o vino tinto) o la reacción entre las proteínas desnaturalizadas del biofilm y la CHX, formándose compuestos pigmentados (Nathoo, 1997).

Se han propuesto diversos mecanismos de tinción de la CHX, algunos de ellos son discutibles.

- **Degradación de la molécula de CHX para liberar paracloranilina.**

Esta reacción no parece ocurrir en el producto almacenado ni como resultado de procesos metabólicos. Asimismo, la alexidina (bisbiguanida relacionada) no posee grupos paracloranilina pero produce una coloración idéntica a la CHX (Lindhe y cols., 2009).

- **Catálisis de reacciones de Maillard.**

La reacción entre un azúcar y una proteína es conocida como reacción de Maillard o “browning” no enzimático (Watts y Addy, 2001). Las reacciones no enzimáticas que provocan un color pardo, potencialmente catalizadas por la CHX representan una posibilidad teórica; sin embargo, las pruebas son indirectas, circunstanciales o no concluyentes. La teoría no considera el hecho de que otros antisépticos y metales como el estaño, el hierro y el cobre también producen manchas en los dientes (Lindhe y cols., 2009).

- **Desnaturalización de las proteínas con formación de sulfuros de metales.**

La desnaturalización de las proteínas producida por la CHX con la interacción entre iones metálicos y radicales sulfuro expuestos también es teóricamente posible pero no existen pruebas directas que sustenten este concepto. Tampoco se toma en cuenta las tinciones similares producidas por otros iones metálicos y antisépticos. Este proceso tampoco pudo ser reproducido en estudios clínicos y de laboratorio (Lindhe y cols., 2009).

- **Precipitación de cromógenos aniónicos de los alimentos.**

Esta precipitación producida por antisépticos catiónicos, entre ellos la CHX, como explicación al proceso de tinción está avalada por estudios clínicos y de laboratorio. Los antisépticos o iones metálicos unidos a la mucosa o a los dientes pueden reaccionar con polifenoles en componentes de la dieta para producir pigmentaciones. Las bebidas como el té, café y vino tinto son particularmente cromógenas (Lindhe y cols., 2009).

c.- Efecto provocado por el uso combinado del té negro con la CHX en la tinción dentaria extrínseca.

Se ha demostrado *in vitro* que muchos de los componentes de la dieta, entre los cuales se incluye el té, producen una tinción más rápida y marcada sobre bloques acrílicos (perspex) bañados previamente con CHX, que los que solo fueron bañados con el antiséptico (control) (Addy y cols., 1979).

Otro estudio *in vitro* demostró que el té y la CHX por separado se unen en pequeñas cantidades a la hidroxiapatita. Sin embargo, cuando fueron testeadas en forma combinada, la captación de ambos a la hidroxiapatita fue mayor. Por otra parte la película adquirida

redujo la captación de té en combinación con CHX a la hidroxiapatita, pero por el contrario incrementó la captación de tanto el té como la CHX en forma aislada. Se concluyó que las proteínas salivales juegan un rol importante en el proceso de tinción dentaria y la combinación de té con CHX aparentemente es un factor muy potente de tinción (Carpenter y cols., 2005).

IV. MÉTODOS DE MEDICIÓN DE MEDICIÓN DEL COLOR DENTARIO

El color dentario puede ser medido tanto en forma subjetiva como con la ayuda de instrumentos digitales.

a.- Métodos de medición subjetivos

Los cambios de color dentario han sido investigados utilizando una variedad de métodos de medición clínica, entre los que se cuentan: la utilización de guías de colores y/o índices de tinción dentaria como el propuesto por Lobene en 1968.

a.1- Guías de colores.

Este es el método más usado en odontología clínica, dado que el ojo humano tiene la capacidad de discriminar diferencias sutiles en el color de los objetos (Paul y cols., 2002). Se debe controlar estrictamente ciertas variables, tales como: la fuente de luz, metamerismo, experiencia, edad, fatiga y ceguera para obtener resultados consistentes (Lee y cols., 2008; Watts y Addy, 2001). Sin embargo, también se describen desventajas en relación a este método. La percepción del color es muy subjetiva y a menudo conlleva a variaciones individuales. La evaluación de varios colores debe ser obtenida a diferentes tiempos, incluso con el mismo operador. Además, las guías de color no son sistemáticas y no abarcan la totalidad de los colores dentarios (O'Brien y cols., 1990; Lee y cols., 2008).

a.2- Índice de Lobene. El índice de Lobene es un método comúnmente usado para medir la tinción dentaria en estudios que examinan diferentes métodos de higiene oral (Axelsson y Lindhe, 1987; Van Strydonck y cols., 2004). De la misma forma, el Índice de Lobene es usado para medir el grado de tinciones dentarias (Duss y cols., 2010).

En éste índice la intensidad y extensión de la tinción dentaria puede ser registrar usando una escala de cuatro puntos (Duss y cols., 2010):

- 0: no se observa tinción
- 1: Tinción leve
- 2: tinción moderada
- 3: tinción severa

b.- Determinación del color con ayuda de instrumentos digitales

Existen instrumentos digitales de última generación que permiten tomar el color con independencia de las variables de la fuente de luz y la subjetividad del observador en su interpretación. Estos instrumentos se basan también en los parámetros: claridad, tono e intensidad, a los cuales les asigna valores numéricos. De esta forma se puede registrar el

color dentario en forma total o por sectores. El principio de funcionamiento, consiste en tratar el color como una función de tres variables independientes y su modelación espacial. La Comisión Internationale d'Eclairage (CIE) es una organización internacional para normas en el ámbito de la medición y de la evaluación de colores. Esta propone un espacio cromático formado por un eje vertical y dos horizontales conocida con la abreviatura de CIE $L^* a^* b^*$ (Henostroza y cols., 2006).

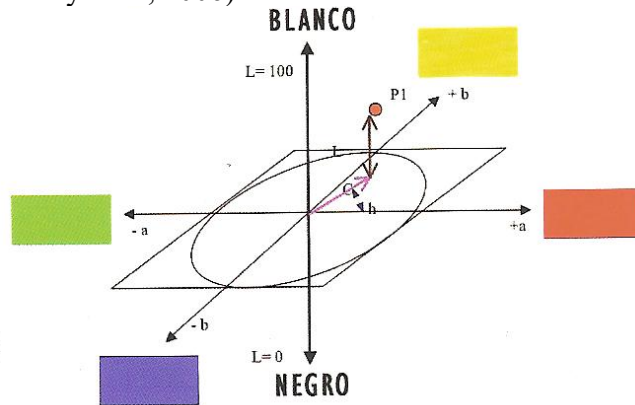


Figura 2. Esquema del espacio cromático CIE Lab. formado por 3 ejes: uno vertical (L^*) que representa el valor y dos horizontales, uno representan al color rojo/verde (a^*) y otro al amarillo/azul (b^*). Los valores en conjunto de los tres ejes determinan un punto que señala la ubicación de un color en el espacio cromático (Henostroza y cols., 2006).

En ésta el eje vertical (L^*) que representa el valor o claridad, tiene en su extremo inferior el valor de 0, equivalente al negro y su extremo superior el valor de 100, equivalente al blanco; entre ambos existe toda una diversidad continua de tonalidades de grises. Los ejes del plano horizontal representan al color rojo/verde (a^*) acotados entre $-a$ y $+a$ y en el amarillo/azul (b^*) acotado entre $+b$ $-b$. Una vez obtenidos los valores para los tres ejes se puede obtener un punto en el espacio cromático (ver figura 2) (Henostroza y cols., 2006).

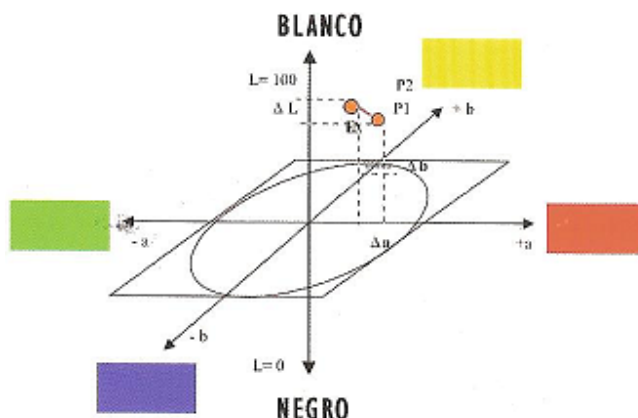


Figura 3. Esquema del espacio cromático CIE Lab. Se aprecian dos puntos que señalan la ubicación de dos colores diferentes en el espacio cromático. La distancia entre los puntos se denomina Delta E (Henostroza y cols., 2006).

La diferencia entre 2 colores en el espacio cromático CIE Lab, se determina como la distancia entre 2 puntos del espacio euclidiano en una terna ortonormal, a la que se designa como delta E (ΔE). Con la letra Δ se indica que se trata de una diferencia y con E la inicial de Empfindung (percepción en alemán) (Henostroza y cols., 2006).

Se obtiene entonces que:

$$\Delta E = \sqrt{\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2}$$

Por la forma de cálculo de ΔE , este será siempre un valor positivo que corresponde al módulo definido por el vector P1P2 (Figura 3) y por tanto no arroja información sobre la dirección y sentido de la variación buscada. En otras palabras no se puede determinar si la variación está en el valor, cromata o tonalidad. La diferencia con un ΔE inferior a 2 es difícilmente apreciable por el ojo humano (Henostroza y cols., 2006).

Los espectrofotómetros digitales como el Easyshade de la casa VITA Zahnfabrik, miden el ΔE con un grado de exactitud elevado. Permiten la determinación cuantitativa del color. Es un instrumento para la medición de los componentes de reflexión espectrales de un color y su conversión a un valor numérico internacionalmente reconocido (Henostroza y cols., 2006). Ha demostrado una alta precisión y reproductibilidad similar a la del colorímetro, y un mejor desempeño que la medición con guías de color (Lee y cols., 2008; Paul y cols., 2002). La mayor desventaja es que el espectrofotómetro es relativamente caro.



Figura 4. Espectrofotómetro digital Easyshade Compact de la casa VITA Zahnfabrik.

Además, existen otros métodos de medición de color, entre los que destacan las técnicas de análisis de imágenes. El color dentario se analiza computacionalmente mediante imágenes obtenidas a partir de un microscopio digital estereoscópico. Las imágenes son

tomadas con una cámara fotográfica digital y procesadas, de modo que se transforman en valores numéricos (Lee y cols., 2008).

OBJETIVO GENERAL

Comparar *in vitro* el cambio de color en el esmalte dentario que producen dos tipos de té en combinación con saliva humana y clorhexidina al 0.12%.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Determinar *in vitro* los cambios en el color del esmalte dentario que produce una preparación comercial de té negro (Lipton Yellow Label), contrastado a un control, al ser testeado con saliva humana y CHX al 0.12%, durante 2, 4 y 8 horas, medido con un espectrofotómetro, utilizando valores del espacio cromático CIE Lab.
- 2) Determinar *in vitro* los cambios en el color del esmalte dentario que produce una preparación comercial de té verde (Lipton Clear Green), contrastado a un control, al ser testeado con saliva humana y CHX al 0.12%, durante 2, 4 y 8 horas, medido con un espectrofotómetro, utilizando valores del espacio cromático CIE Lab.
- 3) Comparar *in vitro* los cambios en el color del esmalte dentario que producen las preparaciones comerciales de té negro (Lipton Yellow Label) y verde (Lipton Clear Green), contrastado a un control, al ser testeados con saliva humana y CHX al 0.12%, durante 2, 4 y 8 horas, medido con un espectrofotómetro, utilizando valores del espacio cromático CIE Lab.
- 4) Determinar *in vitro* el grado de severidad y extensión de las tinciones en el esmalte dentario que produce una preparación comercial de té negro (Lipton Yellow Label), contrastado a un control, al ser testeado con saliva humana y CHX al 0.12%, durante 2, 4 y 8 horas.
- 5) Determinar *in vitro* el grado de severidad y extensión de las tinciones en el esmalte dentario que produce una preparación comercial de té verde (Lipton Clear Green), contrastado a un control, al ser testeado con saliva humana y CHX al 0.12%, durante 2, 4 y 8 horas.
- 6) Comparar *in vitro* el grado de severidad y extensión de las tinciones en el esmalte dentario que producen las preparaciones comerciales de té negro (Lipton Yellow Label) y verde (Lipton Clear Green), contrastado a un control, al ser testeados con saliva humana y CHX al 0.12%, durante 2, 4 y 8 horas.

7) Determinar en qué momento (2, 4 u 8 horas) se produce el mayor grado de cambio de color en el esmalte dentario, medido con un espectrofotómetro, utilizando valores del espacio cromático CIE Lab.

8) Determinar en qué momento (2, 4 u 8 horas) se produce el mayor grado de severidad y extensión de cambio de color en el esmalte dentario.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Qué cambios en el color del esmalte dentario producen dos variedades comerciales diferentes de té: negro y verde, al ser testeado *in vitro*, junto con saliva humana y CHX al 0.12%?

HIPÓTESIS: Dado que ambos tipos de té contienen elevados niveles de polifenoles en su composición que pueden interactuar con la CHX y/o influir de manera relevante en la tinción dentaria, tanto el té negro como el verde inducirán un cambio de color perceptible en el esmalte, al ser testeados con saliva humana y CHX al 0.12%, de un color similar al de su preparación y que guarda relación con el tiempo de exposición.

OBJETIVO GENERAL

Comparar *in vitro* el cambio de color en el esmalte dentario que producen dos tipos de té en combinación con saliva humana y clorhexidina al 0.12%.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1) Determinar *in vitro* los cambios en el color del esmalte dentario que produce una preparación comercial de té negro (Lipton Yellow Label), contrastado a un control, al ser testeado con saliva humana y CHX al 0.12%, durante 2, 4 y 8 horas, medido con un espectrofotómetro, utilizando valores del espacio cromático CIE Lab.

2) Determinar *in vitro* los cambios en el color del esmalte dentario que produce una preparación comercial de té verde (Lipton Clear Green), contrastado a un control, al ser testeado con saliva humana y CHX al 0.12%, durante 2, 4 y 8 horas, medido con un espectrofotómetro, utilizando valores del espacio cromático CIE Lab.

3) Comparar *in vitro* los cambios en el color del esmalte dentario que producen las preparaciones comerciales de té negro (Lipton Yellow Label) y verde (Lipton Clear Green), contrastado a un control, al ser testeados con saliva humana y CHX al 0.12%, durante 2, 4 y 8 horas, medido con un espectrofotómetro, utilizando valores del espacio cromático CIE Lab.

4) Determinar *in vitro* el grado de severidad y extensión de las tinciones en el esmalte dentario que produce una preparación comercial de té negro (Lipton Yellow Label), contrastado a un control, al ser testeado con saliva humana y CHX al 0.12%, durante 2, 4 y 8 horas.

5) Determinar *in vitro* el grado de severidad y extensión de las tinciones en el esmalte dentario que produce una preparación comercial de té verde (Lipton Clear Green), contrastado a un control, al ser testeado con saliva humana y CHX al 0.12%, durante 2, 4 y 8 horas.

6) Comparar *in vitro* el grado de severidad y extensión de las tinciones en el esmalte dentario que producen las preparaciones comerciales de té negro (Lipton Yellow Label) y verde (Lipton Clear Green), contrastado a un control, al ser testeados con saliva humana y CHX al 0.12%, durante 2, 4 y 8 horas.

7) Determinar en qué momento (2, 4 u 8 horas) se produce el mayor grado de cambio de color en el esmalte dentario, medido con un espectrofotómetro, utilizando valores del espacio cromático CIE Lab.

8) Determinar en qué momento (2, 4 u 8 horas) se produce el mayor grado de severidad y extensión de cambio de color en el esmalte dentario.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Qué cambios en el color del esmalte dentario producen dos variedades comerciales diferentes de té: negro y verde, al ser testeado *in vitro*, junto con saliva humana y CHX al 0.12%?

HIPÓTESIS: Dado que ambos tipos de té contienen elevados niveles de polifenoles en su composición que pueden interactuar con la CHX y/o influir de manera relevante en la tinción dentaria, tanto el té negro como el verde inducirán un cambio de color perceptible en el esmalte, al ser testeados con saliva humana y CHX al 0.12%, de un color similar al de su preparación y que guarda relación con el tiempo de exposición.

MATERIALES Y MÉTODO

Tipo de estudio

El presente estudio es de tipo experimental *in vitro* longitudinal, con distribución aleatorizada en tres grupos a ciego simple.

Universo y Muestra

Universo. Dientes premolares humanos extraídos, tanto en centros de salud públicos como privados de las ciudades de Viña del mar y Valparaíso durante el año 2011

Muestra. 60 premolares extraídos por indicación de ortodoncia, cuyos remanentes de tejidos orgánicos fueron removidos con ultrasonido y/o gasa humedecida con agua, en forma previa a ser almacenados en una solución alcohólica refrigerada que contenía timol al 0.2% para inhibir el crecimiento microbiano hasta el momento de su utilización.

Determinación del tamaño de la muestra. Debido a que no se posee referencia de valores en estudios previos para poder calcular un tamaño de muestra, se calculó la diferencia máxima entre dos tratamientos cualquiera para un tamaño de muestra fijo utilizando el método análisis de varianza a un factor fijo determinando como variable dependiente el cambio entre la observación inicial y final (ΔE entre las 0 y 8 hrs.), para esto se considera la probabilidad de error tipo II que es:

$$\beta = 1 - P(\text{Rechazar } H_0 / H_0 \text{ es falsa})$$

Donde H_0 es la hipótesis nula de igualdad entre todos los tratamientos medios a nivel poblacional

Para evaluar la probabilidad descrita anteriormente se utilizan las curvas características de operación que se presentan en el anexo de análisis estadístico. En estas curvas se grafica la probabilidad de la ecuación (1.1) contra un parámetro Φ , donde:

$$\Phi^2 = \frac{n \cdot D^2}{a \cdot \sigma^2}$$

σ : Es la varianza de la variable ΔE entre las 0 y 8 hrs a nivel poblacional.

a = Es el número de grupos a comparar (3 grupos o tratamientos).

n = Es el tamaño de la muestra por grupo.

D = Es la diferencia máxima entre dos tratamientos cualesquiera.

Puesto que no se tiene algún valor de la varianza poblacional como referencia, se estimó la varianza a partir de las observaciones obtenidas en este estudio, cuyo valor obtenido fue de 58,869 unidades, determinándose así la diferencia máxima de detección según un tamaño de muestra fijo ($n=20$) y una potencia del test del 85%, la diferencia máxima obtenida fue de 8,2352 unidades.

Criterios de exclusión

1. Presencia de caries
2. Presencia de restauraciones
3. Alteraciones del desarrollo dentario que resulten en modificaciones notorias del color dentario.
4. Defectos en el esmalte dentario producidos a partir del procedimiento quirúrgico de exodoncia.
5. Premolares con tratamiento de endodoncia.

Aleatorización de la muestra. Para el proceso de aleatorización de tratamientos (grupos) se utilizó metodología de muestreo aleatorio simple sin reposición.

Los grupos de tratamiento fueron:

- Control ($n=20$). Tratados con saliva humana, digluconato de clorhexidina al 0.12% y agua destilada.
- Negro ($n=20$). Tratados con saliva humana, digluconato de clorhexidina al 0.12% y una preparación de té negro de marca Lipton Yellow Label.
- Verde ($n=20$). Tratados con saliva humana, digluconato de clorhexidina al 0.12% y una preparación de té verde de marca Lipton Clear Green.

Materiales

- Muestra de saliva humana.
- Preparaciones de dos diferentes variedades de té comerciales: negro (Lipton Yellow Label) y verde (Lipton Clear Green).
- Digluconato de clorhexidina al 0.12% en solución acuosa. (Preparada en Farmacia Salcobrand).

Cambio de color en el esmalte dentario. “Delta E” (ΔE): variable cuantitativa continua, medida en escala de razón.

Definición conceptual. Determinación de los cambios de color en la superficie del esmalte, en dientes tratados con: té (negro o verde), saliva humana y CHX al 0.12%, contrastado a un control, a diferentes intervalos de tiempo, utilizando valores de las variables que conforman del espacio cromático CIE Lab, estas son (ver figuras 2 y 3):

- Eje vertical que expresa la claridad u oscuridad relativa (cuantitativa, continua – intervalar)
- Eje horizontal que refleja los componentes rojo/verde (cuantitativa, continua – intervalar)
- Eje horizontal que refleja los componentes amarillo/azul (cuantitativa, continua – intervalar)

Definición operacional. Determinación de un punto que señala la posición del color dentario en el espacio cromático CIE Lab, utilizando los valores obtenidos a partir de los tres ejes que componen el sistema, medidos con un espectrofotómetro. Estas mediciones se realizaron en los premolares de estudio, tanto en la medición basal como a las 2, 4 y 8 horas transcurridas, obteniéndose un punto para cada medición. La distancia entre los dos puntos se denomina “Delta E” (ΔE) y determina el cambio del color dentario.

Se calcula:

$$\Delta E = \sqrt{\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2}$$

Nombre de la Variable	Valores	Tipo	Escala de Medición
Cambio de color (ΔE)	Desde > o hasta ∞	Cuantitativa, continua	Escala de razón
Parámetros de la Variable	Valores	Tipo	Escala de Medición
Componente claridad/oscuridad	Desde 0= negro hasta 100= blanco.	Cuantitativa, continua	Intercalar

Componente Rojo/Verde	Rojo ($a > 0$) o Verde ($a < 0$).	Cuantitativa, continua	Intercalar
Componente Amarillo/Azul	Amarillo ($b > 0$) o Azul ($b < 0$).	Cuantitativa, continua	Intercalar

Tabla I. Clasificación de variable “cambio de color el en esmalte dentario, “Delta E” (ΔE)”.

Severidad de la tinción en el esmalte dentario. Variable cualitativa, tetracotómica - ordinal.

Definición conceptual. Medición de los diferentes grados de tinción que se producen en la cara vestibular de la superficie del esmalte, en dientes tratados con: té (negro o verde), saliva humana y CHX al 0.12%, contrastado a un control, a diferentes intervalos de tiempo, utilizando una escala de severidad de tinciones.

Definición operacional. Cuantificación de las tinciones dentarias mediante una asignación numérica, de 0 a 3, a determinados términos que definen el grado de severidad de la tinción de esmalte. Dichos valores corresponden a:

0= Sin tinción. No se aprecia cambio de color sobre la superficie del esmalte.

1= Tinción leve. Se aprecia cambio en el color del esmalte dentario que consiste en una tinción homogénea en su superficie.

2= Tinción moderada. Se aprecia cambio en el color del esmalte dentario que consiste en dos tinciones de diferente intensidad. La tinción de mayor intensidad no supera el 50% de la superficie del esmalte.

3= Tinción severa. Se aprecia cambio en el color del esmalte dentario que consiste en dos tinciones de diferente intensidad. La tinción de mayor intensidad supera el 50% de la superficie del esmalte.

Nombre de la Variable	Valores de la Variable	Tipo de Variable	Escala de Medición
Severidad de la tinción	0=Sin tinción	Cualitativa, tetracotómica	Ordinal
	1=Tinción leve		
	2=Tinción moderada		
	3=Tinción severa		

Tabla II. Clasificación de la variable “severidad de la tinción en el esmalte dentario”.

Extensión de la tinción en el esmalte dentario. Variable cualitativa, tetracotómica - ordinal.

a. *Definición conceptual.* Medición de la extensión de las tinciones dentarias de mayor intensidad, en la cara vestibular de la superficie del esmalte, en dientes tratados con: té (negro o verde), saliva humana y CHX al 0.12%, contrastado a un control, a diferentes intervalos de tiempo, utilizando una escala de extensión de tinciones.

b. *Definición operacional.* Cuantificación de la extensión de las tinciones dentarias de mayor intensidad, mediante una escala alfabética que asigna letras, que van desde la “a” hasta la “d”, a determinados términos que definen el grado de tinción dentaria. Dichas letras corresponden a:

a= Sin tinción. No se aprecia cambio de color sobre la superficie del esmalte o solo se aprecia cambio en el color del esmalte dentario que consiste en una tinción homogénea en su superficie.

b= Tinción leve. Se aprecia cambio en el color del esmalte dentario que consiste en dos tinciones de diferente intensidad. La tinción de mayor intensidad no supera 1/3 de la superficie del esmalte.

c= Tinción moderada. Se aprecia cambio en el color del esmalte dentario que consiste en dos tinciones de diferente intensidad. La tinción de mayor intensidad no supera 2/3 de la superficie del esmalte

d= Tinción severa. Se aprecia cambio en el color del esmalte dentario que consiste en dos tinciones de diferente intensidad. La tinción de mayor intensidad supera 2/3 de la superficie del esmalte.

Nombre de la Variable	Valores de la Variable	Tipo de Variable	Escala de Medición
Extensión de la tinción	a=Ausencia de tinción o tinción en forma homogénea	Cualitativa, tetracotómica	Ordinal
	b=Tinción leve		
	c=Tinción moderada		
	d=Tinción severa		

Tabla III. Clasificación de la variable “extensión de la tinción en el esmalte dentario”.

PROCEDIMIENTO

Obtención de la muestra de saliva. La muestra de saliva fue obtenida a partir de un sujeto de 32 años de edad, hombre, aparentemente sano y que no presentaba signos clínicos de

enfermedades orales. La saliva obtenida, sin el empleo de un agente estimulante, fue colectada en un recipiente de vidrio. El primer turno de este procedimiento se llevó a cabo el día previo al experimento, con una duración aproximada de una hora. Se repitió el proceso 3 veces hasta almacenar un total de alrededor de 3 horas. No se permitió la ingesta de comida ni bebidas dos horas antes de la colección. La muestra de saliva fue mantenida refrigerada en forma previa a su utilización, sin que a esta se le realizara ningún tipo de tratamiento.

Preparación del té. Se hicieron preparaciones de té negro y verde. Estas se realizaron sumergiendo cinco bolsas de te en 1 litro de agua destilada, a 25°C durante 5 minutos.

Procedimiento de tinción dentaria. Los forámenes apicales de los dientes seleccionados fueron grabados con ácido ortofosfórico al 36% y posteriormente sellados con un primer adhesivo (Prime&bond, Dentsply) de acuerdo a las instrucciones del fabricante, de modo de impedir que las soluciones utilizadas en el estudio ingresaran tanto a los conductos radiculares como a la cámara pulpar. A continuación los dientes fueron empapados en saliva humana durante 1 minuto y posteriormente sumergidos en CHX al 0.12% en solución acuosa durante 1 minuto. Luego fueron expuestos al medio ambiente hasta que las muestras se secaran. A continuación fueron sumergidos en las preparaciones de té (control, negro y verde) durante 2 horas, al cabo de lo cual fueron expuestos nuevamente al medio ambiente para que se secaran. Este proceso se repitió a las 4 y 8 horas a partir del inicio del experimento.

Medición del cambio de color y registro de las tinciones en el esmalte dentario. Se realizaron tanto en el examen basal como a las 2, 4 y 8 horas transcurridas. La medición del color del esmalte dentario se realizó en el noveno medio de las caras vestibulares con un espectrofotómetro (VITA Easyshade[®] Compact), de acuerdo a las instrucciones del fabricante, utilizando los valores del espacio cromático CIE Lab. Estas fueron realizadas en un cuarto iluminado con dos ampollas (Eco home, luz clara/fría Phillips), impidiéndose que algún otro tipo de luz incidiera sobre las muestras.

El registro de las tinciones en la cara vestibular del esmalte fue realizado por un observador independiente, que desconocía el tratamiento realizado en cada grupo.

Recolección de datos. La recolección de datos se realizó en una tabla excel, en donde se registraron en forma individual los valores, tanto de los tres ejes del espacio cromático CIE Lab, como los asignados para medir la severidad y extensión de las tinciones. Estas se realizaron en la medición basal y a las 2, 4 y 8 horas transcurridas (ver anexo)

Análisis estadístico. Para determinar cambios en el color del esmalte dentario, utilizando los valores del espacio cromático CIE Lab, se determinó el cambio ΔE entre: 0-2 horas, 0-4 horas y 0-8 horas. De esta manera se compararon los diferentes grupos entre sí en un tiempo específico y entre el mismo grupo a diferentes tiempos. Para cuantificar diferencias significativas se utilizó un modelo lineal mixto o ANOVA para medidas repetidas y se realizaron comparaciones múltiples a través del test de Dunnet y Bonferroni, con un nivel de significancia del 5%. Para realizar comparaciones entre dos ΔE de un mismo grupo a diferentes intervalos de tiempo y entre dos ΔE de diferentes grupos a un mismo intervalo de tiempo se utilizó el test t para muestras pareadas con un nivel de significancia del 5%. No

se realizaron test de significancia para las variables cualitativas tetracotómicas (severidad y extensión de la tinción), puesto que se necesita un tamaño muestral mayor para poder aplicar el test de Stuart-Maxwell y tener resultados válidos. Sin embargo se utilizaron tablas y gráficos para poder visualizar el comportamiento del nivel de las variables. Los programas computacionales utilizados para el análisis estadístico de los datos fueron: Excel 2007 (Microsoft), Minitab 15 (Addlink Software Científico) y Statistical package for the social sciences (SPSS 19, IBM)

RESULTADOS

Análisis descriptivo del cambio de color dentario

Los premolares del grupo control no presentaron cambios de color visibles en el esmalte dentario, en las mediciones realizadas tanto al inicio como a las 2, 4 y 8 horas transcurridas (ver figura 2).

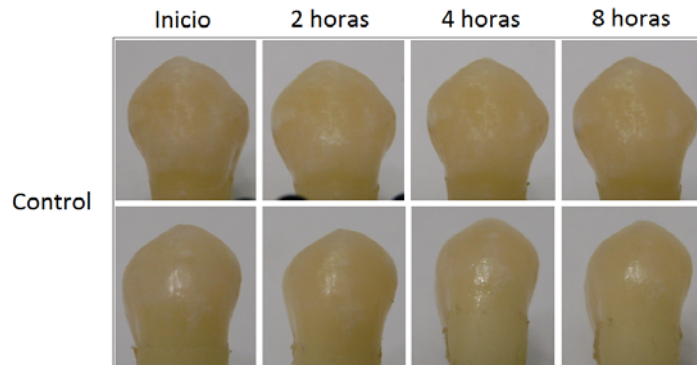


Figura 2. Premolares del grupo control tratados con CHX al 0.12%, saliva humana y agua destilada, a diferentes intervalos de tiempo (0, 2, 4 y 8 horas). Se pudo apreciar que el esmalte dentario no varió en su color a través del tiempo.

Los premolares tratados con té negro, a diferencia de los del grupo control, sí presentaron cambios de color en la superficie del esmalte. A las 2 horas se observó un tenue cambio homogéneo en toda su superficie, de color café/rojizo. Además se pudo apreciar en la totalidad de los premolares, pequeñas tinciones de mayor intensidad, dispersas. Estas se correspondían generalmente con defectos sutiles del esmalte. A las 4 y 8 horas transcurridas, se observó un aumento tanto en la intensidad de la tinción homogénea que cubría toda la superficie del esmalte como en la cantidad y dispersión de las tinciones de mayor intensidad. El aumento en la intensidad y dispersión de las tinciones guardó relación con el tiempo de exposición (ver figura 3).

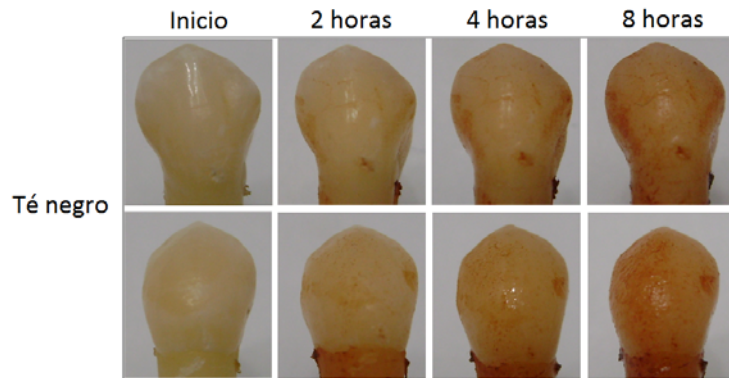


Figura 3. Premolares del grupo negro tratados con CHX al 0.12%, saliva humana y té negro, a diferentes intervalos de tiempo (0, 2, 4 y 8 horas). Se pudo observar un cambio de color café/rojizo en la totalidad de la superficie del esmalte, además de la presencia de pequeñas tinciones de mayor intensidad, dispersas. El aumento en la intensidad y dispersión de las tinciones guardó relación con el tiempo de exposición.

Los premolares tratados con té verde también presentaron cambios de color en la superficie del esmalte. A las 2 horas se observó un tenue cambio homogéneo en toda su superficie, de color verdoso con un ligero tono amarillo. Además se pudo apreciar en la mayoría de los premolares, de un modo similar a lo observado en el grupo anterior, pequeñas tinciones de mayor intensidad, dispersas. A las 4 y 8 horas transcurridas, se observó un aumento tanto en la intensidad de la tinción que cubrió en forma homogénea la superficie del esmalte como en la cantidad y dispersión de las tinciones de mayor intensidad. El aumento en la intensidad y dispersión de las tinciones en el esmalte guardó relación con el tiempo de exposición a la solución de té (ver figura 4).

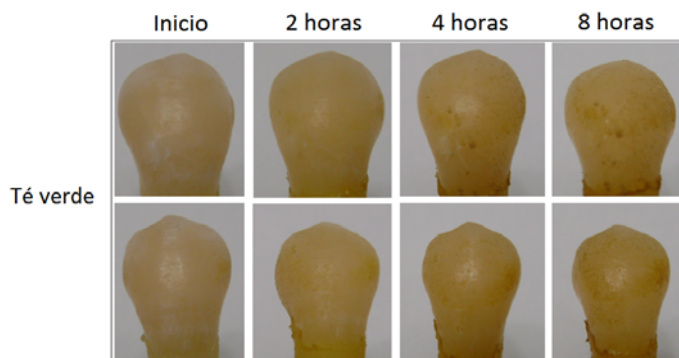


Figura 4. Premolares del grupo verde tratados con CHX al 0.12%, saliva humana y agua té verde, a diferentes intervalos de tiempo (0, 2, 4 y 8 horas). Se pudo observar un cambio de color verdoso en la totalidad de la superficie del esmalte, además de la presencia de pequeñas tinciones de mayor intensidad, dispersas. El aumento en la intensidad y dispersión de las tinciones guardó relación con el tiempo de exposición.

Medidas descriptivas de los valores CIE Lab.

a.- Claridad/Oscuridad (eje L*): Al inicio del tratamiento, el promedio de los valores CIE para el eje L* fue similar en los tres grupos. A medida que transcurrió el tiempo, los valores del grupo control sólo experimentaron variaciones en forma leve. En cambio, en los grupos negro y verde se detectaron variaciones notorias, en donde los valores disminuyeron en forma progresiva, vale decir, se volvieron “más oscuros”. Este descenso fue más acentuado en el grupo negro que en el verde (ver tabla IV).

Variable	Tiempo	Grupo	Media	Desv. Est.	Coef. Var. (%)	Mínimo	Q1	Mediana	Q3	Máximo
Claridad/Oscuridad	0	Control	82,9	3,7	4,4	74,7	81,3	82,8	85,5	89,4
		Negro	83,7	4,2	5,1	73,0	81,1	84,3	85,9	91,1
		Verde	83,1	3,9	4,7	76,9	80,1	83,6	84,5	93,1
	2	Control	83,7	2,7	3,2	79,6	81,4	83,6	85,9	89,3
		Negro	80,1	3,5	4,3	72,5	77,9	79,6	81,9	86,6
		Verde	81,4	3,1	3,8	76,0	79,5	81,0	83,4	87,8
	4	Control	84,6	2,6	3,1	80,1	82,8	84,5	87,0	89,4
		Negro	75,7	3,6	4,7	69,6	73,6	75,0	77,5	83,7
		Verde	78,1	4,1	5,3	68,6	76,2	79,7	80,6	84,2
	8	Control	84,2	2,6	3,1	80,2	81,2	84,8	86,5	87,9
		Negro	69,8	4,2	6,0	59,8	67,0	69,7	72,6	78,8
		Verde	75,0	3,0	4,0	68,7	73,3	74,5	76,6	81,5

Tabla IV. Tabla de valores CIE promedio para el eje L* (Claridad/Oscuridad), a diferentes intervalos de tiempo (0, 2, 4 y 8 horas). Los valores del grupo control variaron en forma leve a través del tiempo. A diferencia de los grupos negro y verde, cuyos valores descendieron notoriamente en forma progresiva, vale decir, se volvieron “más oscuros” a medida que transcurrió el tiempo de exposición.

b.- Rojo/Verde (eje a*): El promedio de los valores CIE para el eje a*, al inicio del tratamiento, fue mayor en el grupo control que los grupos negro y verde. A las 2 horas, el promedio de valores del grupo control disminuyó levemente, vale decir se volvieron un poco menos rojos, y se mantuvieron estables en el resto de las mediciones. En el grupo negro, en cambio, el promedio de los valores aumentó notoriamente, vale decir se volvieron más rojos. En el grupo verde, las variaciones en el promedio de los valores fueron disímiles. A las 2 horas, los valores disminuyeron levemente, vale decir se volvieron menos rojos. A las 4 y 8 horas los valores aumentaron de forma progresiva, vale decir se volvieron más rojos (ver tabla V)

Variable	Tiempo	Grupo	Media	Desv. Est.	Coef. Var. (%)	Mínimo	Q1	Mediana	Q3	Máximo
Rojo/ Verde	0	Control	2,2	1,9	83,7	-0,8	1,1	1,9	3,7	5,7
		Negro	1,7	1,7	99,2	-1,5	0,7	1,5	2,9	4,4
		Verde	1,5	2,5	166,8	-2,4	-0,1	1,1	2,7	8,0
	2	Control	0,9	1,1	114,5	-1,0	0,3	1,0	1,5	3,4
		Negro	4,2	1,5	36,7	1,0	3,3	4,3	5,2	6,7
		Verde	1,2	1,7	141,5	-2,6	0,2	0,8	2,7	4,5
	4	Control	0,9	1,2	122,2	-1,3	0,2	1,0	1,6	3,3
		Negro	8,8	1,9	21,1	4,7	7,4	9,2	10,1	12,3
		Verde	2,7	1,6	58,5	0,0	1,7	2,5	3,9	6,6
	8	Control	0,8	1,1	137,2	-1,2	-0,3	1,1	1,6	2,3
		Negro	12,8	2,5	19,8	7,8	10,7	13,2	14,7	17,0
		Verde	3,2	1,1	33,6	1,6	2,2	3,4	3,9	5,8

Tabla V. Tabla de valores CIE promedio para el eje a* (Rojo/Verde), a diferentes intervalos de tiempo (0, 2, 4 y 8 horas). A las 2 horas, el promedio de valores en el grupo control disminuyó levemente, vale decir se volvieron un poco más verdes, y se mantuvieron estables en el resto de las mediciones. En cambio, en los grupos negro y verde, con la salvedad del grupo verde a las 2 horas de medición, el promedio de los valores aumentó a través del tiempo, vale decir se volvieron más rojos.

c.- Amarillo/Azul (eje b*): El promedio de los valores CIE para el eje b*, al inicio del tratamiento, fueron similares entre los tres grupos, aunque ligeramente mayor en el grupo control, seguido del grupo negro. A las 2 horas el promedio de los valores en el grupo control disminuyó levemente, vale decir se volvieron menos amarillos y se mantuvieron estables en el resto de las mediciones. En cambio, en los grupos negro y verde no se apreciaron variaciones a las 2 horas, a diferencia de las 4 y 8 horas, en donde los valores promedios aumentaron, vale decir se volvieron más amarillos. Este aumento fue ligeramente mayor en el grupo negro que en el verde (ver tabla VI).

Variable	Tiempo	Grupo	Media	Desv. Est.	Coef. Var. (%)	Mínimo	Q1	Mediana	Q3	Máximo
Amarillo /Azul	0	Control	29,9	4,5	15,0	22,9	27,1	28,8	33,7	38,5
		Negro	28,6	4,3	15,0	21,0	25,7	27,5	31,1	39,0
		Verde	27,0	6,3	23,4	12,7	23,5	26,4	28,7	44,8
	2	Control	26,3	3,4	12,8	20,4	23,6	26,2	28,5	32,2
		Negro	28,7	3,1	10,7	24,1	25,3	28,4	31,5	34,2
		Verde	26,9	4,3	15,9	20,7	22,8	26,8	30,7	33,7
	4	Control	26,4	3,0	11,3	21,3	24,8	26,3	27,9	33,4
		Negro	34,6	2,9	8,5	30,0	31,9	35,7	36,8	40,4
		Verde	31,1	3,8	12,3	24,5	27,6	31,3	33,9	37,9
	8	Control	26,1	2,2	8,6	22,1	24,6	26,1	27,6	30,8
		Negro	38,6	2,7	7,1	34,4	36,0	38,8	41,3	42,8
		Verde	34,0	3,4	9,9	28,8	31,6	33,7	36,7	40,0

Tabla VI. Tabla de valores CIE promedio para el eje b* (Amarillo/Azul), a diferentes intervalos de tiempo (0, 2, 4 y 8 horas). Al inicio del tratamiento los valores promedio fueron similares entre los tres grupos. A las 2 horas los valores en el grupo control disminuyeron levemente, vale decir se volvieron más azules y se mantuvieron estables en el resto de las mediciones. En cambio, en los grupos negro y verde no se apreciaron variaciones a las 2 horas, a diferencia de las 4 y 8 horas, en donde los valores aumentaron, vale decir se volvieron más amarillos.

Análisis cuantitativo de cambios en el color dentario.

La diferencia entre dos colores se determinó como la distancia entre dos puntos del espacio euclideo en un vector ortonormal de 3 dimensiones, denominado “Delta E” (ΔE).

Se estableció que existe un efecto significativo en el cambio de color a través del tiempo, por lo que se determinó que el tiempo de exposición es un factor determinante en el cambio de color ($p\text{-valor}=0$). Además, se verificó un efecto de interacción significativo entre los diferentes grupos de estudios y el tiempo, vale decir, los premolares de los diferentes grupos se comportaron de diferente manera a través del tiempo ($p\text{-valor}=0$). Se observó un efecto significativo en el cambio de color en los premolares de los diferentes grupos de estudio, vale decir, los premolares de los grupos de estudio poseen un cambio de color medio estadísticamente diferente entre ellos ($P\text{-valor}=0$).

Al realizar comparaciones múltiples entre los diferentes grupos de estudio, se observó que el color de los premolares del grupo control varió en forma estadísticamente significativa comparado con los grupos negro y verde ($p\text{-valor}= 0$ y 0.012 , respectivamente). También se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el cambio de color entre los grupos negro y verde ($p\text{-valor}= 0$) (Ver tabla VIII).

Comparaciones múltiples

Medida: ΔE

(I)Grupo (J)Grupo			Diferencia de medias (I-J)	Error típ.	Sig.	Intervalo de confianza 95%	
						Límite inferior	Límite superior
Bonferroni	Control	Negro	-8.1462*	1.04557	.000	-10.7253	-5.5671
		Verde	-3.1300*	1.04557	.012	-5.7091	-.5509
	Negro	Control	8.1462*	1.04557	.000	5.5671	10.7253
		Verde	5.0162*	1.04557	.000	2.4371	7.5953
	Verde	Control	3.1300*	1.04557	.012	.5509	5.7091
		Negro	-5.0162*	1.04557	.000	-7.5953	-2.4371
t de Dunnet (bilateral) ^a	Negro	Control	8.1462*	1.04557	.000	5.7747	10.5177
	Verde	Control	3.1300*	1.04557	.008	.7585	5.5015

Tabla VII. Comparaciones múltiples del cambio de color en el esmalte dentario, entre los tres grupos de estudio. Se determinó que las variaciones en el color mostraron diferencias estadísticamente significativas, al comparar los grupos entre sí.

Para visualizar tendencias y diferencias en el cambio de color dentario promedio se realizaron gráficos de intervalos de confianza, para cada tiempo de medición (2, 4 y 8 horas), teniendo como referencia la medición inicial del color (ver gráficos: 1 y 2)

En el grupo control la variación del color dentario en promedio fue de $\Delta E=5.4$, a las 2 horas. A partir de entonces, el cambio en el color no varió en forma estadísticamente significativa, tanto a las 4 como a las 8 horas ($p\text{-valor}= 0.367$ y 0.952 , respectivamente). En el grupo negro la variación del color dentario en promedio es de $\Delta E=5.2$, a las 2 horas. A partir de entonces este cambio se fue acentuando, $\Delta E=13.1$ a las 4 horas ($p\text{-valor}=0$) y $\Delta E=21$ a las 8 horas ($p\text{-valor}=0$). En el grupo verde la variación del color dentario en promedio fue de $\Delta E=5.2$ a las 2 horas. A partir de entonces este cambio también se acentuó, $\Delta E=8.0$ a las 4 horas ($p\text{-valor}=0.003$) y $\Delta E=12.0$ a las 8 horas ($p\text{-valor}=0$) (ver gráfico 1).

Cambio de color medio para la diferencia de tiempos de exposición
IC del 95% para la media

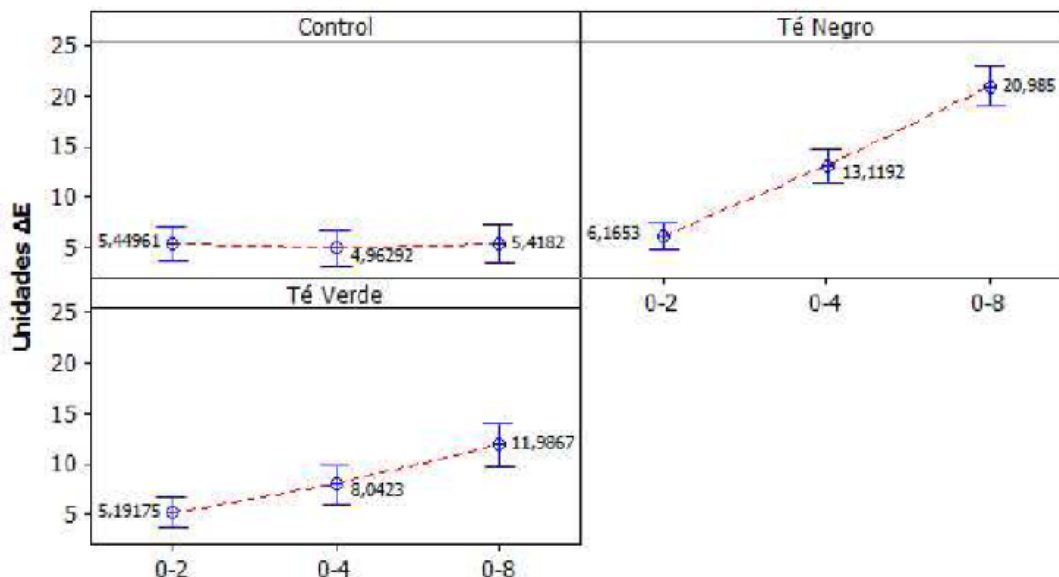


Gráfico 1. Cambio en el color dentario medio para los tres grupos de estudio, a diferentes tiempos de exposición (2, 4 y 8 horas). En el grupo control la variación del color promedio fue de $\Delta E=5.4$, a las 2 horas. A partir de entonces, el cambio en el color no varió en forma estadísticamente significativa (p -valor= 0.367 y 0.952, a las 4 y 8 horas respectivamente). En el grupo negro la variación del color dentario en promedio es de $\Delta E=5.2$, a las 2 horas. A partir de entonces este cambio se fue acentuando (p -valor=0, tanto para las 4 como 8 horas). En el grupo verde la variación del color dentario en promedio fue de $\Delta E=5.2$ a las 2 horas. A partir de entonces este cambio también se acentuó (p -valor=0.003 y 0, a las 4 y 8 horas respectivamente).

Al comparar el cambio de color promedio entre los tres grupos de estudio, se pudo apreciar que a las 2 horas no existieron diferencias estadísticamente significativas entre estos (entre control y negro p -valor= 0.967; entre control y verde p -valor= 0.994; entre negro y verde p -valor=0.816). A las 4 horas los cambios de color promedio de los tres grupos difirieron en forma estadísticamente significativa entre sí (entre control y negro p -valor= 0; entre control y verde p -valor= 0.018; entre negro y verde p -valor=0.0051). A las 8 horas las diferencias en los cambios de color promedio de los tres grupos continuaron acentuándose (entre control y negro p -valor= 0; entre control y verde p -valor= 0; entre negro y verde p -valor=0) (ver gráfico 2).

Cambio de color medio para la diferencia de tiempos de exposición
IC del 95% para la media

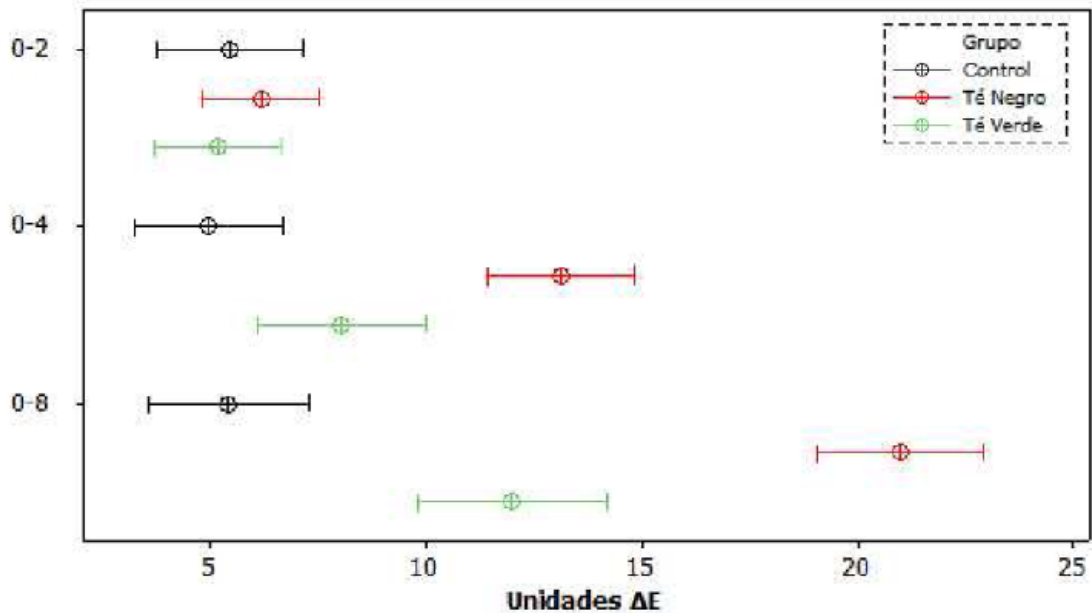


Gráfico 2. Cambios comparativos del color dentario medio entre los tres grupos de estudio, a diferentes tiempos de exposición (2, 4 y 8 horas). A las 2 horas entre control y negro p -valor= 0.967; entre control y verde p -valor= 0.994; entre negro y verde p -valor=0.816). A las 4 horas entre control y negro p -valor= 0; entre control y verde p -valor= 0.018; entre negro y verde p -valor=0.0051). A las 8 horas entre control y negro p -valor= 0; entre control y verde p -valor= 0; entre negro y verde p -valor=0).

Análisis cualitativo de tinciones dentarias

a.- Medición de grado de severidad de tinciones.

Se comparó la presencia y grado de severidad de tinciones en la cara vestibular del esmalte, entre los diferentes grupos, a diferentes intervalos de tiempo (0-2 horas, 0-4 horas. y 0-8 horas) (Ver gráfico 3 y tabla VIII).

Al inicio del experimento, en ninguno de los premolares utilizados se observaron tinciones en la superficie del esmalte. Después de 2 horas, no se observaron tinciones en los premolares del grupo control. En los premolares del grupo negro, un 25% (n=5) presentó tinciones leves y un 75% (n=15) moderadas. En los premolares del grupo verde, un 25% (n=5) no presentó tinciones, un 60% (n=12) leves y un 15% (n=3) moderadas. Después de 4 horas de exposición, no se observaron tinciones en los premolares del grupo control. En los premolares del grupo negro, un 15% (n=3) presentó tinciones leves y un 85% (n=17) moderadas. En el grupo verde, un 40% (n=8) presentó tinciones leves y un 60% (n=12) moderadas. Después de 8 horas de exposición, en los premolares del grupo control no se

observaron tinciones. En los premolares del grupo negro, un 90% (n=18) presentó tinciones moderadas y un 10% (n=2) severas. En los premolares del grupo verde, un 10% (n=2) presentó tinciones leves y un 90% (n=18) moderadas (ver gráfico 3 y tabla VIII).

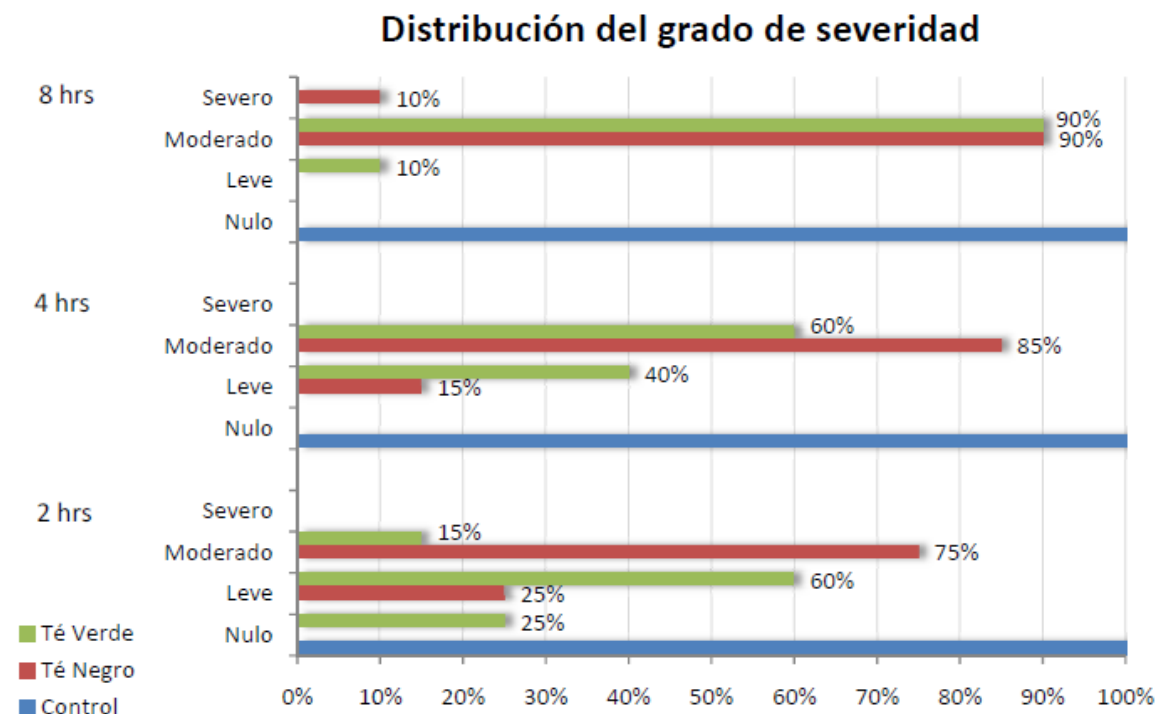


Gráfico 3. Presencia y grado de severidad de tinciones en la cara vestibular del esmalte de los premolares. En el grupo control no se observaron tinciones en ningún intervalo de medición. A las dos horas, la mayoría de las tinciones observadas en los premolares fueron moderadas para el grupo negro y leves para el grupo verde. A las 4 y 8 horas la mayoría de las tinciones fueron moderadas, tanto para el grupo verde como negro. Sin embargo, sólo en el grupo negro se alcanzó la clasificación severa a las 8 horas de medición.

Tiempo	Control								Negro								Verde								
	N		L		M		S		N		L		M		S		N		L		M		S		
	N	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	
0-2	20	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	25	15	75	0	0	5	25	12	60	3	15	0	0
0-4	20	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	15	17	85	0	0	0	0	8	40	12	60	0	0
0-8	20	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	18	90	2	10	0	0	2	10	18	90	0	0

Tabla VIII. Presencia y grado de severidad de tinciones en la cara vestibular del esmalte de los premolares. N= nulo, L= leve, M= moderado, S= severo.

b.- Medición de grado de extensiones de tinciones.

Se comparó el grado de extensión de tinciones de mayor intensidad en la cara vestibular del esmalte, entre los diferentes grupos, a diferentes intervalos de tiempo (0-2 horas, 0-4 horas y 0-8 horas) (ver gráfico 4 y tabla IX).

Al inicio del experimento, en ninguno de los premolares utilizados se apreciaron tinciones. Después de 2 horas de exposición, no se observaron tinciones en los premolares del grupo control. En los premolares del grupo negro, un 25% (n=5) fue clasificado como “sin tinción” y un 75% (n=15) con extensión leve. En los premolares del grupo verde, un 85% (n=17) fue clasificado como “sin tinción” y un 15% (n=3) con extensión leve. Después de 4 horas de exposición, no se observaron tinciones en los premolares del grupo control. En los premolares del grupo negro, un 15% (n=3) fue clasificado como “sin tinción” y un 85% (n=17) con extensión leve. En los premolares del grupo verde, un 40% (n=8) fue clasificado como “sin tinción” y un 60% (n=12) con extensión leve. Después de 8 horas de exposición, en los premolares del grupo control se continuó apreciando ausencia de tinciones. En los premolares del grupo negro un 90% (n=18) fueron clasificados con extensión tinción leve, un 5% (n=1) con moderada y un 5% (n=1) con severa. En los premolares del grupo verde, un 10% (n=2) fue clasificado como “sin tinción”, un 60% (n=12) con extensión leve y un 15% (n=3) con moderado (ver gráfico 4 y tabla IX).

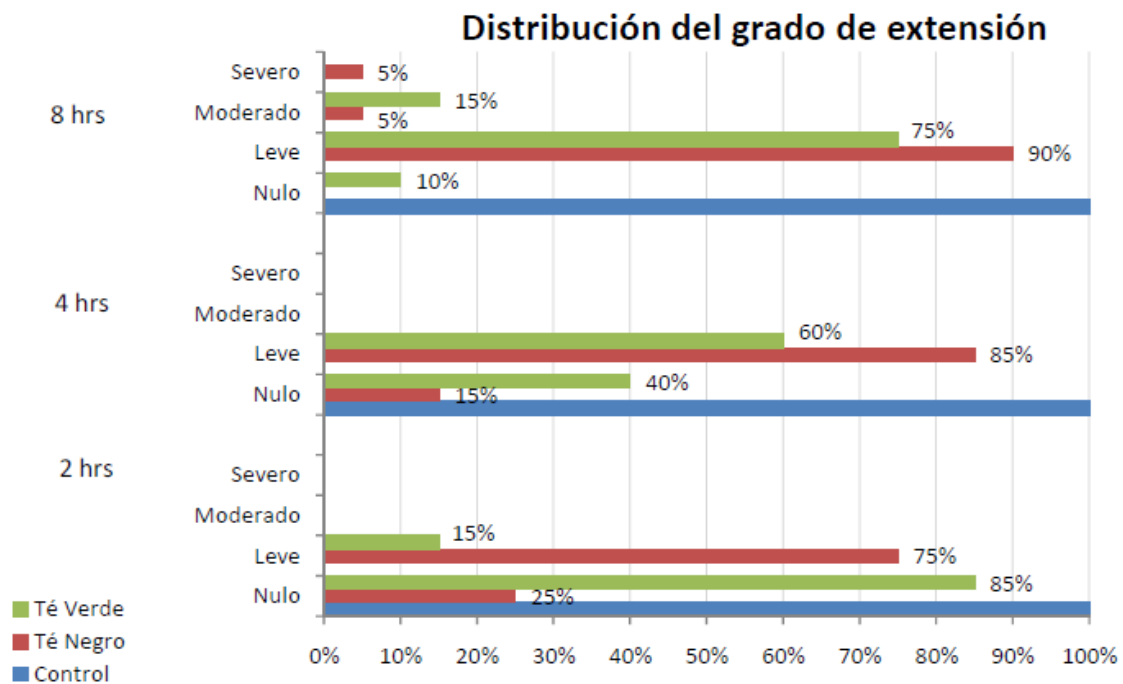


Gráfico 4. Grado de extensión de tinciones de mayor intensidad en la cara vestibular del esmalte de los premolares. En el grupo control no se observaron tinciones en ningún intervalo de medición. A las dos horas, la mayoría de las tinciones observadas en los premolares fueron clasificadas como leves en el grupo negro y sin tinción en el grupo verde. A las 4 y 8 horas la mayoría de las tinciones fueron clasificadas como leves, tanto para el grupo verde como negro. Sólo en el grupo negro se alcanzó la clasificación severa a las 8 horas de medición.

Tiempo	Control								Negro								Verde							
	N		L		M		S		N		L		M		S		N		L		M		S	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
0-2	20	100	0	0	0	0	0	0	5	25	15	75	0	0	0	0	17	85	3	15	0	0	0	0
0-4	20	100	0	0	0	0	0	0	3	15	18	85	0	0	0	0	8	40	12	60	0	0	0	0
0-8	20	100	0	0	0	0	0	0	0	0	18	90	1	5	1	5	2	10	15	75	3	15	0	0

Tabla IX. Grado de extensión de tinciones de mayor intensidad en la cara vestibular del esmalte de los premolares. N= nulo, L= leve, M= moderado, S= severo.

Momento en que se alcanzó el mayor grado de cambio de color utilizando los valores CIE Lab

El análisis del cambio de color, medido con un espectrofotómetro, determinó que para el grupo control el mayor grado de variación del ΔE se registró a las 2 horas ($\Delta E=5.44961$), a diferencia de los grupos negro y verde donde se registró a las 8 horas ($\Delta E=20.985$ y 11.9867 , respectivamente) (ver gráfico 1).

Momento en que se alcanzó el mayor grado de severidad de las tinciones de esmalte

Se pudo apreciar que el grupo control no se observaron tinciones en ninguna de las mediciones realizadas, a diferencia de los grupos negro y verde. En el grupo negro, el grado más alto alcanzado es severo y se logra a las 8 horas por un 10% (n=2) de los premolares, sin embargo, el 90% restante alcanza sólo un grado moderado (n=18), en este mismo intervalo de tiempo. En el grupo verde, en cambio, el grado más alto alcanzado es moderado y se logró a partir de las 2 horas, por sólo por un 15% (n=3) de los premolares, sin embargo, es a las 8 horas de exposición que el 90% de los premolares logró alcanzar este nivel (n=18) (ver gráfico 3 y tabla VIII).

Momento en que se alcanzó el mayor grado de extensión de las tinciones de esmalte

En el grupo negro, el grado más alto alcanzado es severo y se logra a las 8 horas de exposición por solo un 5% (n=1) de los premolares, en cambio, el 90% alcanza sólo un grado leve (n=18), a esta misma hora. En el grupo verde, el grado más alto alcanzado es moderado y se logra a las 8 horas de exposición por solo por un 15% (n=3) de los premolares, en cambio, el 75% (n=15) sólo logra un grado leve en este mismo intervalo de tiempo (ver gráfico 4 y tabla IX).

DISCUSIÓN

No se observaron cambios de color en los premolares del grupo control, a diferencia de los tratados con preparaciones de té, grupos negro (Lipton yellow label) y verde (Lipton clear green), en donde estos sí fueron detectados de color similar a las soluciones de té empleadas (ver figuras 2, 3 y 4).

Uno de los principales efectos adversos de la CHX es la tinción dentaria (Addy y cols., 1982; Flötra, 1973). Sin embargo, a diferencia de lo esperado, en nuestro estudio no se observaron cambios de color en los premolares del grupo control. La causa pudo deberse al poco tiempo de contacto, en forma directa, de la CHX con el esmalte (1 minuto) y a que posteriormente los premolares fueron sumergidos en agua destilada, pudiendo actuar esta última como un solvente que diluyó la CHX impregnada en la superficie dentaria.

El rol que juegan los cromógenos dietéticos en el proceso de formación de tinciones ha sido reportado y discutido particularmente en asociación con antisépticos como la CHX. El mecanismo de tinción más probable para explicar los cambios de color observados en los grupos: negro y verde, involucra la precipitación de componentes cromógenos de la dieta sobre la CHX previamente adsorbida (Addy y Moran, 1995; Watts y Addy, 2001;). Debido a que el cambio de color fue similar al de las soluciones empleadas, da la impresión de tratarse de tinciones extrínsecas directas (Watts y Addy, 2001). Se ha demostrado tanto *in vivo* (Prayitno y cols., 1979) como *in vitro* (Addy y cols., 1979) que la CHX combinada con té poseen la capacidad de provocar cambios en el color dentario y que su efecto tiene un potencial de decoloración dentaria mayor que el de la CHX por si sola (Addy y Moran, 1984).

Se pudo apreciar que las tinciones de mayor intensidad se encontraban en relación a defectos del esmalte (ver figuras 2, 3 y 4). Una superficie irregular puede generar un mayor grado de retención de saliva y por consiguiente precipitación de CHX y componentes cromógenos derivados del té, provocando así un cambio de color más evidente. Se ha determinado *in vitro* que ciertos componentes del té negro rápidamente se adsorben al tomar contacto con la película adquirida y/o saliva (Joiner y cols., 2003) e *in vivo* que la película adquirida tiene una tendencia a desarrollar tinciones, particularmente en aquellas áreas de la dentición que son inaccesibles para el cepillado y la acción abrasiva de los dentífricos (Forward, 1991; Watts y Addy, 2001).

El grado de intensidad de las tinciones guardó relación con el tiempo de exposición a las soluciones de té (ver figuras 2, 3 y 4). A mayor tiempo de exposición mayor es la cantidad de compuestos cromógenos que precipitan sobre superficie del esmalte, resultando en un mayor grado de cambio de color. Se ha reportado *in vitro* que el tiempo de exposición de la CHX combinada con té es un factor relevante en relación al cambio de color (Addy y Moran, 1984).

En el análisis descriptivo del cambio de color del esmalte dentario, utilizando los valores de los tres ejes que componen el espacio cromático CIE Lab, determinó que los premolares del grupo control aumentaron en forma leve su cantidad de rojo y amarillo a las 2 horas, para posteriormente mantenerse estables en el resto de las mediciones. En tanto los premolares de los grupos negro y verde se volvieron más oscuros, rojos y amarillos a medida que transcurrió el tiempo de exposición. Cabe destacar que los cambios detectados

para el grupo negro fueron marcadamente más notorios, particularmente en el aumento de la cantidad de rojo, al ser comparados con el grupo verde (ver tablas IV, V y VI).

Llama la atención que los cambios en el grupo control sólo se verifican a las 2 horas y que estos no se repitieron en el resto de las mediciones. Una posible explicación puede ser que la medición inicial de color se realizó con los premolares totalmente secos y en la efectuada en el resto de las mediciones (2, 4 y 8 horas), a pesar de que se esperó a que los premolares se secaran, estos aun pudieron contener pequeñas cantidades de agua destilada residual, que influyó en la medición del color.

Las variaciones de color determinadas en los premolares del grupo negro guardan total relación con lo referido en el análisis descriptivo. Lee y cols. (2008), reportaron en una publicación destinada a proponer un modelo *in vitro* de evaluación de tinciones y blanqueamiento dentario, que una preparación de té negro provocó tanto un oscurecimiento como un aumento en la cantidad de rojo, mientras que respecto de la variación de colores amarillo/azul (eje "b") los resultados fueron dispares.

A primera vista, el leve aumento en la cantidad de rojo, en los premolares del grupo verde, no se corresponde con el color verdoso/amarillo observado. Sin embargo esto se puede explicar si comprendemos que los colores primarios del espectro visible corresponden al verde, azul y rojo, y la superposición de éstos origina todos los demás colores (Sekito y cols., 2005). La percepción del color amarillo se obtiene al combinar los colores verde y rojo, por lo tanto, el observar un aumento en el color amarillo estaría indicando indirectamente un aumento en el color verde. Los seres humanos percibimos las variaciones de color en los tres ejes del espacio CIE Lab en forma conjunta y no necesariamente la variación de uno en forma particular.

Al comparar la variación del color (ΔE) para cada grupo en forma individual, a diferentes intervalos de tiempo (0-2, 0-4 y 0-8 horas), se determinó que en el grupo control no existieron diferencias estadísticamente significativas entre ningún intervalo de medición, en contraste de los grupos negro y verde, en donde éstas sí se produjeron de manera tiempo dependiente, siendo mayores las diferencias para el grupo negro (ver gráfico 1). Estos datos son relevantes por cuanto confirma que: a) la exposición dentaria a saliva humana (1 minuto), CHX (1 minuto) y agua destilada no modificó el color dentario, b) la inclusión de las soluciones de té sí fueron capaces de provocar cambios. De acuerdo a esto es posible pensar que compuestos cromógenos derivados del té provocaron los cambios de color dentario. Estudios *in vitro* que han utilizado una metodología similar han reportado que el té negro genera un aumento en el cambio de color (ΔE) que guarda relación con el tiempo de exposición (Joiner y cols. 2003; Lee y cols.; 2008;). No encontramos estudios que evaluaran el cambio de color dentario causado por té verde medido con espectrofotómetro para realizar comparaciones con el nuestro.

Al comparar la variación de color (ΔE) entre los tres grupos, a un mismo intervalo de tiempo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas a las 2 horas, a diferencia de las mediciones realizadas a las 4 y 8 horas, en donde fue posible establecer diferencias significativas entre los tres grupos (ver gráfico 2). Es importante destacar que entre los grupos negro y verde: a) las variaciones en el color fueron mayores para el grupo negro comparado con el verde y b) aumentaron conforme transcurrió el tiempo de exposición. Estos datos confirman que la solución de té negro modifica en mayor grado el color del esmalte dentario que la de té verde, por lo que es posible pensar que el té negro

contiene mayor cantidad de compuestos cromógenos que el verde. Leard y Addy (1997), estudiaron *in vitro* la capacidad de provocar tinciones de diferentes marcas comerciales de té negro asociadas con CHX, determinando que diferentes marcas comerciales generan diferentes grados de tinción. Existen numerosas variedades de té y muchas de ellas no son accesibles para investigadores de diferentes países. Esta variable dificulta la posibilidad de realizar comparaciones entre estudios relacionados ya que sus componentes no pueden ser determinados cuantitativamente.

El análisis descriptivo nos señaló que se observaron cambios de color, de diferentes intensidades, en la superficie del esmalte en los premolares de los grupos negro y verde, y que estos guardaron relación con el tiempo de exposición. La utilización de nuestro índice de tinción dentaria nos permitió categorizar estos cambios de modo de poder cuantificarlos y establecer comparaciones entre los grupos.

El grado de severidad y extensión de las tinciones de los grupos negro y verde aumentó en forma progresiva conforme transcurrió el tiempo de exposición (ver gráficos 3 y 4; y tablas VIII y IX). Al realizar comparaciones entre los grupos negro y verde se estableció que las tinciones provocadas por el té negro fueron de mayor severidad y extensión que las té verde, en todos los intervalos de medición (2, 4 y 8 horas). Estos datos concuerdan con los registrados en forma objetiva respecto del aumento gradual en el cambio de color dentario y que fue más notorio en el grupo negro.

En los premolares del grupo negro, el grado más alto alcanzado tanto para severidad como para extensión de tinciones fue severo a las 8 horas, a diferencia de los del grupo verde donde solo alcanzaron un grado moderado (ver gráficos 3 y 4; y tablas VIII y IX). Esto concuerda con lo registrado de manera objetiva en cuanto a que la variación del (ΔE), transcurridas 8 horas de exposición, fue mayor para el grupo negro comparado con el verde, siendo esta diferencia estadísticamente significativa.

CONCLUSIONES

- 1) Una preparación comercial de té negro (Lipton Yellow Label) produce cambios de color café/rojizo en el esmalte dentario, estadísticamente significativos, al ser testeado *in vitro* junto con saliva humana y CHX al 0.12%, a diferentes intervalos de tiempo (2, 4, y 8 horas), cuando la medición se realiza con un espectrofotómetro.
- 2) Una preparación comercial de té verde (Lipton Clear Green) produce cambios de color Verde/amarillo en el esmalte dentario, estadísticamente significativos, al ser testeado *in vitro* junto con saliva humana y CHX al 0.12%, a diferentes intervalos de tiempo (2, 4, y 8 horas), cuando la medición se realiza con un espectrofotómetro.
- 3) Una preparación comercial de té negro (Lipton Yellow Label) produce mayores cambios de color en el esmalte dentario al ser comparado con una preparación comercial de té verde (Lipton Clear Green), de forma estadísticamente significativa, al ser testeadas *in vitro* junto con saliva humana y CHX al 0.12%, a diferentes intervalos de tiempo (2, 4 y 8 horas), cuando la medición se realiza con un espectrofotómetro.
- 4) Una preparación comercial de té negro (Lipton Yellow Label) provoca tinciones en el esmalte dentario, cuyo aumento de severidad y extensión guarda relación con el tiempo de exposición, alcanzando a las 2 y 4 horas un valor de severidad *moderado* y de extensión *leve* y a las 8 horas un valor tanto de severidad como de extensión *severo*.
- 5) Una preparación comercial de té verde (Lipton Clear Green) provoca tinciones en el esmalte dentario, cuyo aumento de severidad y extensión guarda relación con el tiempo de exposición, alcanzando a las 2 y 4 horas un valor de severidad *moderado* y de extensión *leve* y a las 8 horas un valor de severidad y extensión *moderado*.
- 6) Una preparación comercial de té negro (Lipton Yellow Label) provoca tinciones en el esmalte dentario cuyo grado de severidad y extensión es mayor que el de las provocadas por una preparación comercial de té verde (Lipton Clear Green), a diferentes intervalos de tiempo (2, 4 y 8 horas).
- 7) El mayor grado de cambio de color en el esmalte dentario se produce a las 8 horas en los premolares tratados con preparaciones comerciales de té, tanto negro (Lipton Yellow Label) como verde (Lipton Clear Green), cuando la medición se realiza con un espectrofotómetro.
- 8) El mayor grado de severidad y extensión de cambio de color en el esmalte dentario que se produce en los premolares tratados con una preparación comercial de té negro (Lipton Yellow Label) se logra a las 8 horas y alcanza un valor *severo*, a diferencia de los tratados con una preparación comercial de té verde (Lipton Clear Green) que alcanzan un valor *moderado*, a las 2 horas en severidad y a las 8 horas en extensión.

SUGERENCIAS

- 1) Se sugiere aumentar el tamaño de la muestra de modo de poder realizar un test de significancia para las variables cualitativas tetracotómicas (severidad y extensión de tinciones) y así tener resultados válidos.
- 2) Dado la gran cantidad de marcas comerciales de té, tanto negro como verde, presentes en el mercado, se recomienda estudios adicionales que las incorporen.
- 3) La aparición reciente de nuevas variedades de té, tales como: rojo y blanco, generan la necesidad de contar con estudios que evalúen su potencial de decoloración dentaria.
- 4) Estudios adicionales *in vivo* son recomendados para confirmar los efectos observados

RESUMEN

Introducción. El efecto adverso más importante del uso prolongado de clorhexidina (CHX) es la tinción dentaria. Su uso combinado con la ingesta de té puede incrementar aún más este riesgo. Durante años en Chile se ha comercializado principalmente el té negro, sin embargo, en el último tiempo se ha masificado el consumo de té verde. Es importante conocer el potencial de decoloración dentaria de los elementos presentes en nuestra dieta.

Materiales y métodos. El presente estudio es de tipo experimental *in vitro* longitudinal. Se utilizaron premolares distribuidos en tres grupos: a) Control, (saliva, CHX y agua destilada); b) Negro (saliva, CHX y té negro) c) Verde (saliva, CHX y té verde) para determinar diferencias en el cambio de color del esmalte dentario.

Resultados. El grupo control no presentó cambios de color visibles, a diferencia de los grupos: negro y verde, los cuales presentaron tinciones de un color similar a la de la solución de té empleada. El grado de severidad y extensión de las tinciones guardó relación con el tiempo de exposición y fue más notorio en el grupo negro.

Discusión. El mecanismo de tinción más probable involucra la precipitación de componentes cromógenos de la dieta sobre la CHX previamente adsorbida en la superficie del esmalte. A mayor tiempo de exposición mayor es la cantidad de compuestos precipitados.

Conclusiones. Tanto el té negro como el verde poseen un elevado potencial de producir cambios en el color en el esmalte dentario, cuando son utilizados en conjunto con CHX. La ingesta de éstas bebidas debe ser suspendida durante un tratamiento con CHX.

BIBLIOGRAFÍA

Addy M., Moran J. (1995): Mechanisms of satin formation on teeth, in particular associated with metal ions and antiseptics. *Adv Dent Res*, 9:450-456.

Addy M., Moran J. (1997): Clinicals indication for the use of chemical adjunctions to plaque control: Chlorhexidine formulations. *Periodontol*, 2000 15:52-53.

Addy M., Moran J. (1984): The formation of stain on acrylic surfaces by the interaction of cationic antiseptic mouthwashes and tea. *J Biomed Mater Res*, 18:631-641.

Addy M., Moran J., Davies RM., Beak A., Lewis A. (1982): The effect of single morning and evening rinses of chlorhexidine on the development of tooth staining and plaque accumulation. A blind cross-over trial. *J Clin Periodontol*, 9:134-140.

Addy M., Prayitno S., Taylor L., Cadogan S. (1979): An in vitro study of the role of dietary factors in the aetiology of tooth staining associated with the use of chlorhexidine. *J Periodontal Res*, 14:403-410.

Alleyn C.D., O'Neal R.B., Strong S.L., Scheidt M.J., Van Dyke T.E., McPherson J.C. (1991): The effect of chlorhexidine treatment of root surfaces on the attachment of human gingival fibroblast in vitro. *J periodontol*, 62:434-438.

Axelsson P., Lindhe J. (1987): Efficacy of mouthrinses in inhibiting dental plaque and gingivitis in man. *J Clin Periodontol*, 14:205-210.

Barkvoll P., Rolla G., Bellagamba S. (1988): Interaction between chlorhexidine gluconate and sodium monofluorophosphate in vitro. *Scan J Dent Res*, 96:30-33.

Bennick A. (2002): Interaction of plant polyphenols with salivary proteins. *Crit Rev Oral Biol Med*, 13:184-196.

Bennick A., Yan Q. (1995): Identification of histatins as tannin-binding proteins in human saliva. *J biochem*, 311:341-347.

Carpenter G.H., Pramanik R., Proctor G.B. (2005): An in vitro model of chlorhexidine-induced tooth staining. *J Periodontol Res*, 40:225-230.

Cabral C.T., Fernandes M.H. (2007): In Vitro comparison of chlorhexidine and povidone-iodine on the long-term proliferation and functional activity of human alveolar bone cells. *Clin Oral Investig*, 11:155-164.

Duss C., Lang N.P., Cosyn J., Persson G.R. (2010): A randomized, controlled clinical trial on the clinical, microbiological, and staining effects of a novel 0.05% chlorhexidine/herbal extract and a 0.1% chlorhexidine mouthrinse adjunct to periodontal surgery. *J Clin Periodontol*, 37: 988-997

Emilson C.G. (1997): Susceptibility of various microorganisms to chlorhexidine. *Scand J Dent Res*, 85:255-265.

Eren K., Ozmeric N., Sardas S. (2002): Monitoring of bucal epithelial cells by alkaline comet assay (single cell gel electrophoresis technique) in cytogenetic evaluation of chlorhexidine. *Clin Oral Investig*, 6:150-154.

Ernst C.P., Prockl K., Willerhausen B. (1999): Estudio clínico de la efectividad y efectos secundarios de clorhexidina a 0,1% y 0,2%. *Quintessence (ed. esp.)*, 12:221-226.

Flotra L. (1973): Different modes of chlorhexidine application and related local side effects, *J Periodontal Res Suppl*, 12:41-44.

Flotra L., Gjermo P., Rolla G., Waerhaug J. (1971): Side effects of chlorhexidine mouthwashes. *Scand J Dent Res*, 79:119-125.

Forward G. (1991): Role of toothpastes in the cleaning of teeth. *Int Dent J*, 41:164-170.

Giannelli M., Chellini F., Margheri M., Tonelli P., Tani A. (2008): Effect of chlorhexidine digluconate on different cell types: A molecular and ultrastructural investigation. *Toxicol In Vitro*, 22:308-317.

Hagerman A.E., Butler L.G. (1981): The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. *J Biol Chem*, 256:4494-4497.

Hannig C., Hannig M. (2009): The oral cavity-a key system to understand substratum-dependent bioadhesion on solid surfaces in man. *Clin Oral Invest*, 13:123-139.

Hannig C., Hannig M., Attin T. (2005): Enzymes in the acquired enamel pellicle, *Eur J Oral Sci*. 113:2-13.

Harbison M.A., Hammer S.M. (1989): Inactivation of human immunodeficiency virus by Betadine products and chlorhexidine. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2:16-20

Haslam E. (2003): Thoughts on thearubigins. *Phytochemistry*. 64:61-73.

Henostroza G., Dell'Acqua A., Espinoza R., Fernández E., Henao D., Kohen S., Mondelli J., Navarro M.F., Porto C.L., Rodríguez E., Tumenas I., Urzúa I., Vargas M.A., Vélez C.E. (2006): Luz, color y su percepción. En: *Estética en Odontología Restauradora*. Editor: Hinostrza G. Primera edición, Editorial Ripano, Madrid - España. pp:53-75.

Houri-Haddad Y., Halabi A., Soskolne W.A. (2008): Inflammatory response to chlorhexidine, minocycline HCl and doxycycline HCl in an in vivo mouse model. *J Clin Periodontol*, 35:783-788.

Jensen J.L., Lamkin M.S., Oppenheim F.G. (1992): Adsorption of human salivary proteins to hydroxyapatite: a comparison between whole saliva and glandular salivary secretion. *J Dent Res*, 71:1569-1576.

Joiner A. (2004): Tooth colour: a review of the literature, *J Dent*. 32:3-12.

Joiner A., Muller D., Elofsson U., Malmsten M., Arnebrant T. (2003): Adsorption from black tea and red wine onto *in vitro* salivary pellicles studied by ellipsometry. *Eur j oral sci*, 111:417-422.

Jones C.G. (1997): Chlorhexidine: is it still the gold standard?. *Periodontol*. 2000 15:55-62.
Kay B.K.; Williamson M.P; Sudol P. (2000): The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains. *FASEB J*, 14:231-241.

Kirkegaard E., Von der Fehr F., Rolla G. (1974): Influence of chlorhexidine on *in vitro* uptake of fluoride in dental enamel. *Scan J Dent Res*, 82:566-569.

Kolahi J., Soolari A. (2006): Rinsing with chlorhexidine gluconate solution after brushing and flossing teeth: a systematic review of effectiveness. *Quintessence Int*, 37(8):605-612.

Lamkin M.S., Arancillo A.A., Oppenheim F.G. (1996): Temporal and compositional characteristics of salivary protein adsorption to hydroxyapatite. *J Dent Res*, 75:803-808.

Lee B.S., Huang S.H., Chiang Y.C., Chien Y.S., Mou C.Y., Lin C.P. (2008): Development of *in vitro* tooth staining model and usage of catalysts to elevate the effectiveness of tooth bleaching. *Dent Mater*, 24(1):57-66.

Lindhe J., Lang N., Karring T. (2009): Control químico de la placa supragingival. En: *Periodontología clínica e Implantología Odontológica*. Editores: Lindhe, J., Lang, N., Karring, T. Editorial Médica Panamericana, Quinta Edición, Buenos Aires - Argentina, pp:734-765.

Lobene R. (1968): Effect of dentifrices on tooth stain with controlled brushing. *J Am Dent Assoc*. 77:849-855.

MacPherson L., Stephen K., Joiner A., Schafer F., Huntington E. (2000): Comparison of a conventional and modified tooth stain index. *J Clin Periodontol*, 27:854-859.

Mariotti A.J., Rumpf D.A. (1999): Chlorhexidine-induced changes to human gingival fibroblast collagen and non collagen protein production. *J Periodontol*, 70:1443-1448.

Nathoo S.A. (1997): The chemistry and mechanisms of extrinsic and intrinsic discoloration. *J Am Dent Assoc*, 128:6S-10S.

O'Brien W.J.; Groh C.L.; Boenke K.M; (1990): A new, small-color-difference equation for dental shades. *J Dent Res*. 69:1762-1764.

Paul S., Meter A., Pietroban N., Hammerle C.H.F. (2002): Visual and spectrophotometric shade analysis of human teeth. *J Dent Res*, 81:578-582.

Pradeau D. (1998): Tisanas. En: Análisis químicos farmacéuticos de medicamentos. Noriega Editores. Editorial Limusa S.A., Primera Edición, México DF - México, pp:1046-1047.

Prayitno S., Taylor L., Cadogan S., Addy M. (1979): An *in vivo* study of dietary factors in the aetiology of tooth staining associated with the use of chlorhexidine. *J Periodontal Res*, 14:411-417.

Proctor G.B., Pramanik R., Carpenter G.H., Rees G.D. (2005): Salivary Proteins interact with dietary constituents to modulate tooth staining, *J Dent Res*. 84:73-78.

Pucher J.J., Daniel J.C. (1992): The effect of chlorhexidine digluconate on human fibroblast *in vitro*. *J Periodontol*, 63:526-532.

Ribeiro D.A., Bazo A.P., da Silva Franchi C.A., Marquez M.E.A., Salvatori D.M.F. (2004): Chlorhexidine induces DNA damage in rat Peripherals leukocytes and oral mucosal cells. *J Periodontal Res*, 39:358-361.

Schmidt-Hebbel H. (1990): Excitantes nerviosos y digestivos. En: Aditivos alimentarios y la reglamentación de los alimentos: Aplicaciones y comentarios de orden químico y tecnológico. Editado por Fundación Chile. Editorial Universitaria, Primera edición, Santiago - Chile, pp:144-146.

Sekito T., Monnerat A., Bazhouni T., Sampaio P. (2005): Selección del color en la clínica odontológica: una constante búsqueda por mejores resultados. En: Odontología estética: el estado del arte. Editor: Milton Hecht. Editora Artes Médicas Ltda. Primera edición español, Sao Pablo - Brasil, pp:329-349.

Sheen S., Banfield N., Addy M. (2001): The propensity of individual saliva to cause extrinsic staining *in vitro* a developmental method. *J Dent*, 29:99-102.

Van Strydonck D.A.C., Timmerman M.F., Van der Velden U., Van der Weijden G.A. (2004): The anti-plaque efficacy of a chlorhexidine mouthrinse used in combination with toothbrushing with dentifrice. *J Clin Periodontol*, 31: 691–695.

Watts A., Addy M. (2001): Tooth discolouration and satining: a review of the literatura. *Br Dent J*, 190:309-316.

Yan Q.T., Bennick A. (1995): Identification of histatins as tannin-binding proteins in human saliva. *Biochem J*, 311:341-347.

TABLA DE REGISTRO TESIS

Diente	L0	L2	L4	L8											Severidad				Extensión				
						a0	a2	a4	a8		b0	b2	b4	b8	0	2	4	8	0	2	4	8	
Control 1	81,9	83,4	83,7	82,9		2,8	0,9	1,3	1,2		34	32,2	31,2	30,8		0	0	0	0	a	a	a	a
Control 2	81,3	85,1	83,3	86,6		2,1	1,0	0,5	1,2		27,0	23,5	21,6	22,4		0	0	0	0	a	a	a	a
Control 3	89,4	86,3	89,4	86,9		3,9	1,3	0,2	0,5		38,5	28,5	26,8	26,4		0	0	0	0	a	a	a	a
Control 4	88,4	82,2	87,3	86,6		-0,8	-0,5	-1,3	-1,2		22,9	20,4	21,3	22,1		0	0	0	0	a	a	a	a
Control 5	81,8	83,8	84,7	85,4		0,0	-1	-0,8	-0,6		28,5	23,8	24,9	23,6		0	0	0	0	a	a	a	a
Control 6	83,3	83,0	82,7	81,1		1,9	1,7	0,8	1,8		27,3	27,5	24,8	25,7		0	0	0	0	a	a	a	a
Control 7	86	86,1	89,0	84,0		0,6	1,5	1,2	2,3		24,9	25,0	27,2	24,9		0	0	0	0	a	a	a	a
Control 8	85,1	89,3	87,7	87,9		5,7	0,2	-0,1	-0,5		38,4	25,2	24,2	24,8		0	0	0	0	a	a	a	a
Control 9	82,3	82,1	82,9	80,9		1,7	1,4	1,1	1,3		29,0	30,4	26,2	26,6		0	0	0	0	a	a	a	a
Control 10	85,6	86,6	85,4	85,8		1,4	1,3	1,4	0,9		27,2	27,0	26,4	26,2		0	0	0	0	a	a	a	a
Control 11	75,8	80,8	83,4	84,2		3,1	2,5	1,6	1,5		30,2	28,8	28,2	28,3		0	0	0	0	a	a	a	a
Control 12	83,3	86,6	84,4	83,5		1,1	0,7	0,8	0,5		24,8	28,5	24,8	24,5		0	0	0	0	a	a	a	a
Control 13	84,8	85,4	87,6	87,8		1,1	-0,3	-0,3	-1		29,0	24,1	26,8	26,0		0	0	0	0	a	a	a	a
Control 14	81,3	79,6	80,1	80,5		4,8	0,6	2,0	0,6		34,7	25,3	28,1	26,7		0	0	0	0	a	a	a	a
Control 15	74,7	81,1	80,9	80,7		5,6	3,4	3,0	2,0		35,9	32,0	33,4	29,1		0	0	0	0	a	a	a	a
Control 16	84,0	82,4	86,1	85,4		3,1	0,5	1,9	1,6		27,4	21,0	25,0	24,1		0	0	0	0	a	a	a	a
Control 17	79,7	80,5	81,2	81,5		3,9	2,0	3,3	1,5		32,8	28,2	31,2	27,7		0	0	0	0	a	a	a	a
Control 18	86,8	84,5	84,5	86,0		-0,4	-0,4	0,2	-0,6		26,3	23,3	24,3	27,2		0	0	0	0	a	a	a	a
Control 19	81,4	84,9	85,7	86,3		1,1	0,5	0,5	0,5		30,0	27,5	25,8	29,0		0	0	0	0	a	a	a	a
Control 20	80,8	79,6	82,6	80,2		1,9	1,2	1,6	2,0		28,2	22,9	26,5	25,2		0	0	0	0	a	a	a	a
Negro 21	82,1	79,5	75,1	68,9		0,9	4,0	7,4	11,8		21,0	25,3	30,5	37,2		0	1	1	2	a	a	a	b
Negro 22	91,1	84,8	80,5	74,9		4,4	3,2	5,8	7,8		39,0	30,8	31,4	34,6		0	1	2	2	a	a	b	b
Negro 23	89,0	85,7	83,7	73,4		1,6	3,9	7,0	13,2		26,1	25,4	31,8	37,3		0	2	2	2	a	b	b	b
Negro 24	84,8	77,7	73,7	59,8		1,0	4,9	9,0	17,0		26,5	28,4	33,4	41,4		0	2	2	3	a	b	b	d
Negro 25	88,4	81,9	77,7	72,5		-0,8	2,1	7,3	10,0		24,3	25,3	32,1	35,6		0	2	2	2	a	b	b	b
Negro 26	85,2	84,3	78,3	72,6		-0,2	1,8	7,9	10,3		26,2	24,1	32,4	35,5		0	1	1	2	a	a	a	b
Negro 27	89,0	86,6	82,5	78,8		-1,5	1,0	4,7	7,9		25,6	25,3	30,0	34,4		0	1	1	2	a	a	a	b
Negro 28	81,8	76,5	69,6	70,6		2,4	3,7	10,0	12,8		31,1	28,1	36,3	40,3		0	2	2	2	a	b	b	b
Negro 29	83,8	81,9	75,9	72,0		1,3	5,0	9,3	13,4		27,8	29,7	33,8	39,7		0	2	2	2	a	b	b	b
Negro 30	82,4	76,5	74,1	66,9		2,9	4,9	7,4	13,1		31,1	27,7	30,4	37,3		0	2	2	2	a	b	b	b
Negro 31	85,4	80,1	74,8	68,5		2,9	5,2	9,8	15,1		35,2	32,6	37,2	41,7		0	2	2	3	a	b	b	c
Negro 32	80,1	79,5	74,7	67,9		3,5	6,6	10,1	15,3		30,1	34,2	36,1	40,5		0	2	2	2	a	b	b	b

Negro	33	78.4	79.6	76.9	67.3		4.0	3.5	8.1	14.2		32.2	29.3	35.6	42.8		0	2	2	2	a	b	b	b
Negro	34	73.0	78.4	72.5	66.9		2.6	4.5	10.3	14.7		30.9	31.7	37.7	42.3		0	2	2	2	a	b	b	b
Negro	35	82.2	79.1	73.6	73.1		0.7	4.2	8.9	9.7		26.9	32.2	36.9	37.2		0	2	2	2	a	b	b	b
Negro	36	79.5	77.2	73.0	64.5		3.8	6.7	11.1	15.8		25.6	28.4	35.9	39.0		0	2	2	2	a	b	b	b
Negro	37	86.0	72.5	75.9	66.6		-0,5	5.4	9.9	12.9		23.5	28.1	35.7	35.0		0	2	2	2	a	b	b	b
Negro	38	85.2	78.5	70.6	67.7		1.3	4.3	12.3	14.6		28.1	29.4	40.4	41.5		0	2	2	2	a	b	b	b
Negro	39	85.0	80.8	76.9	72.3		2.9	5.8	10.6	13.5		33.0	33.3	37.7	40.9		0	2	2	2	a	b	b	b
Negro	40	80.9	81.1	74.3	70.5		0.8	2.4	9.3	13.0		27.1	24.8	35.7	38.5		0	1	2	2	a	a	b	b
Verde	41	81.3	79.9	76.9	73.2		1.1	0.9	2.0	3.0		26.9	27.0	32.1	35.1		0	2	2	2	a	b	b	b
Verde	42	83.6	81.4	78.8	73.8		1.5	0.6	2.2	4.0		28.5	26.4	30.5	37.2		0	1	2	2	a	a	b	b
Verde	43	84.0	78.7	80.1	76.8		1.9	1.7	2.9	3.6		24.8	26.8	27.7	31.5		0	0	2	2	a	a	b	c
Verde	44	78.7	80.9	79.9	74.5		2.5	2.3	3.1	3.5		28.8	28.2	34.1	33.6		0	1	1	2	a	a	a	b
Verde	45	83.6	82.2	79.8	78.6		0.6	0.7	2.8	2.2		23.1	24.9	27.6	28.9		0	1	2	2	a	a	b	b
Verde	46	88.4	86.2	84.2	81.5		-0,8	0.5	1.6	1.8		22.9	22.9	27.6	28.8		0	0	1	1	a	a	a	a
Verde	47	80.5	87.8	80.2	75.8		0.7	0.1	2.2	3.1		25.6	21.3	26.3	33.3		0	0	2	2	a	a	b	b
Verde	48	85.3	83.8	81.3	77.9		8.0	3.8	4.2	3.3		44.8	33.7	32.9	33.7		0	0	1	1	a	a	a	a
Verde	49	84.1	79.4	80.6	72.1		1.0	0.4	0.3	3.5		33.0	31.3	33.1	38.4		0	1	1	2	a	a	a	b
Verde	50	84.5	81.5	78.4	74.8		-0,6	-0,2	1.6	1.9		20.9	22.8	29.9	29.6		0	1	2	2	a	a	b	b
Verde	51	80.9	76.0	68.6	74.4		3.1	4.5	6.6	5.8		30.3	33.0	37.9	39.4		0	1	1	2	a	a	a	b
Verde	52	78.2	81.0	71.5	71.1		6.7	3.0	4.0	3.6		35.8	30.6	36.2	35.9		0	1	1	2	a	a	a	b
Verde	53	76.9	84.2	72.1	68.7		-0,1	-1	1.9	2.7		25.6	26.7	32.3	34.7		0	1	2	2	a	a	b	c
Verde	54	79.5	78.9	75.9	73.7		3.1	2.5	4.0	3.8		28.3	29.8	32.8	36.9		0	1	2	2	a	a	b	b
Verde	55	80.0	76.7	72.0	73.1		2.7	2.8	5.2	4.6		27.5	30.7	35.1	36.0		0	2	2	2	a	b	b	b
Verde	56	93.1	86.4	80.6	74.1		-2,4	-2,6	0	1.6		12.7	20.8	24.5	32.6		0	2	2	2	a	b	b	c
Verde	57	84.3	82.3	83.5	80.3		0.1	0	2.0	1.7		22.6	20.7	30.0	30.1		0	1	1	2	a	a	a	b
Verde	58	82.4	80.1	80.8	74.4		0.4	0.4	1.2	2.3		24.8	22.7	26.8	32.8		0	0	2	2	a	a	b	b
Verde	59	84.4	80.4	77.6	75.9		2.4	2.7	3.7	3.9		25.8	24.6	27.4	31.7		0	1	2	2	a	a	b	b
Verde	60	88.1	79.8	79.5	74.7		-1,7	1.0	3.0	3.9		27.5	33.0	36.4	40.0		0	1	1	2	a	a	a	b

