

Artigo Original de Pesquisa

Detecção de paracloroanilina após desinfecção de resina acrílica com gluconato de clorexidina *in vitro*

Detection of para-chloroaniline after disinfection of acrylic resin with *in-vitro* chlorhexidine gluconate

Mariana Silveira Echeverria¹
Samantha Rodrigues Xavier¹
Pedro José Sanches Filho²
Eduardo Luiz Barbin³
Guilherme Brião Camacho³
Renato Fabrício de Andrade Waldemarin³

Autora para correspondência:

Mariana Silveira Echeverria
Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Odontologia, Departamento de Saúde Bucal Coletiva
Rua Gonçalves Chaves, 457
CEP 96015-560 – Pelotas – RS – Brasil
E-mail: mari_echeverria@hotmail.com

¹ Universidade Federal de Pelotas, Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Pelotas – RS – Brasil.

² Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Rio-Grandense – Pelotas – RS – Brasil.

³ Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Odontologia – Pelotas – RS – Brasil.

Data de recebimento: 12 fev. 2020. Data de aceite: 29 set. 2020.

Palavras-chave:

clorexidina; dentadura;
desinfecção;
paracloroanilina.

Resumo

Introdução: O controle de infecções fúngicas em superfícies protéticas geralmente requer desinfecção com soluções químicas. Entre elas, a clorexidina (CHX) tem sido altamente indicada. Estudos odontológicos recentes observaram o risco de degradação da CHX na paracloroanilina (PCA) durante a desinfecção do canal radicular, mas essa degradação após a desinfecção protética não foi estudada. **Objetivo:** Investigar a presença de PCA após desinfecção com CHX. **Material e métodos:** Doze discos de resina acrílica foram divididos em quatro grupos (n = 3): G1: controle (água destilada); G2: gluconato de clorexidina a 0,2%; G3: gluconato de clorexidina a 2%; e G4: gluconato de clorexidina a 4%. Os discos foram imersos por 10 min nas soluções e depois armazenados em água destilada a 37°C por 24 h. A solução sofreu extração em fase líquida e foi

submetida à cromatografia gasosa e espectrometria de massa (CG/SM) por SCAN e pelo método SIM. **Resultados:** Pelo método SCAN, foi detectada a formação de PCA nos grupos G3 e G4 (uma amostra em cada grupo). Nos demais grupos, não foi detectada formação de PCA. Pelo método SIM, todos os grupos, exceto o controle, apresentaram formação de PCA. Por uma curva de calibração, foi detectado coeficiente de Pearson de 0,94 entre a concentração de CHX e a de PCA. **Conclusão:** A PCA é formada como subproduto após a desinfecção com gluconato de clorexidina.

Keywords:

chlorhexidine;
dentures; disinfection;
para-chloroaniline.

Abstract

Introduction: Control of fungal infections on prosthetic surfaces usually requires disinfection with chemical solutions. Among them, chlorhexidine (CHX) has been highly indicated. Recent dental studies have observed the risk of CHX degradation in para-chloroaniline (PCA) during root canal disinfection, but this degradation after prosthetic disinfection has not been studied. **Objective:** The aim of this study was to investigate the presence of PCA after CHX disinfection. **Material and methods:** Twelve acrylic resin discs were divided into four groups (n = 3): G1: control (distilled water); G2: 0.2% chlorhexidine gluconate; G3: 2% chlorhexidine gluconate; and G4: 4% chlorhexidine gluconate. The disks were immersed for 10 min in the solutions and then stored in distilled water at 37°C for 24 h. The solution suffered liquid phase extraction and was subjected to gas chromatography and mass spectrometry (GC/MS) by SCAN and SIM methods. **Results:** By SCAN method, it was detected the formation of PCA in G3 and G4 (one sample in each group). At all others, it was not detected PCA formation. By SIM method, every group, except control, showed PCA formation. By a calibration curve, it was detected a 0.94 Pearson's coefficient relating the CHX concentration to the PCA concentration. **Conclusion:** PCA is formed as a by-product after disinfection with chlorhexidine gluconate.

Introdução

É importante a limpeza efetiva da prótese a fim de evitar a formação e adesão de biofilme de *Candida albicans* nas superfícies da resina acrílica [10, 19, 26]. Essa adesão é um pré-requisito para a ocorrência de estomatite protética, com frequência diagnosticada em pacientes idosos [17, 19]. Assim, protocolos de limpeza são recomendados e devem ser respeitados para se manter efetivamente um ambiente bucal livre de doenças [24].

Os métodos disponíveis para limpeza de dentaduras incluem escovação mecânica, limpeza química ou a combinação de ambos [8, 11, 19]. O gluconato de clorexidina é amplamente recomendado em todo o mundo por ser considerado um antibacteriano e antisséptico eficaz na desinfecção química [9, 15, 21]. As concentrações utilizadas para esse fim podem ser 0,12, 2 ou 4% [2, 8, 19]. Em um recente estudo clínico randomizado sobre

limpeza de dentaduras, o uso de clorexidina (CHX) e hipoclorito de sódio apresentou os melhores resultados na redução de microrganismos [27].

Os componentes químicos derivados da degradação de CHX a 2% já foram determinados por cromatografia gasosa e espectrometria de massa (CG/SM), e encontraram-se os seguintes: paracloroanilina (PCA), ortocloroanilina, metacloroanilina, espécies reativas de hidrogênio e organoclorados [4]. A PCA pertence ao grupo 2B da Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (Iarc), sendo classificada como um possível agente cancerígeno em humanos.

A literatura odontológica tem estudado a formação de PCA nos canais radiculares por causa do uso de CHX como agente auxiliar na preparação do canal radicular, em que sua liberação é potencializada pelo uso de hipoclorito de sódio [3, 13, 23], no entanto não há estudos avaliando a ocorrência de liberação de PCA de bases protéticas

que foram desinfetadas com CHX. Por isso, o objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* a presença de PCA após a desinfecção de discos de resina acrílica por imersão em soluções de CHX a 0,2, 2 e 4%.

Material e métodos

Doze discos de resina acrílica (13 × 3 mm) foram preparados por polimerização por microondas e, depois disso, submetidos a lixas sequenciais de 600, 800 e 1.200 no polimento automático AROPOL 2v (Arotec, Cotia, SP, Brasil). Todas as amostras foram armazenadas em água destilada a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 h. Dividiram-se os discos em quatro grupos (n = 3):

- G1: Controle: imersão constante em água destilada;
- G2: imersão de 10 min em gluconato de clorexidina a 0,2% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos);
- G3: imersão de 10 min em gluconato de clorexidina a 2% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos);
- G4: imersão de 10 min em gluconato de clorexidina a 4% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos).

Após imersão, os discos foram armazenados a 37°C em 10 mL de água destilada, utilizando garrafas de vidro cujas tampas eram protegidas por uma lâmina de alumínio. Em seguida, a água em que os discos foram armazenados foi levada para um funil de separação de volume, ao qual foi adicionado 10 mL de diclorometano. A mistura foi agitada manualmente por 3 min. Depois da separação dos dois fluidos em duas fases distintas, o diclorometano foi filtrado por meio de um funil com sulfato de sódio. O processo foi repetido três vezes para cada amostra. Após a coleta final da solução resultante em um béquer, o diclorometano foi deixado em repouso na capela por 24 h até sua total evaporação. O material resultante foi dissolvido em 1 mL de diclorometano para ser analisado em CG/SM. Todos os grupos foram estudados em triplicata. Utilizou-se padrão PCA (purificado por sublimação $\geq 99\%$) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos), para fins de comparação.

Os parâmetros de CG foram: temperatura da injeção 280°C , modo de injeção dividida, coluna RTX-5MS, 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro, espessura do filme de 0,25 μm e fluxo da coluna de 1 mL/min. Os parâmetros SM, por sua vez, consistiram em: temperatura da fonte de

íons de 200°C , temperatura da interface a 280°C , Ch1 127 m/z, Ch2 153 m/z, Ch3 65 m/z, Ch4 167 m/z, Ch5 187 m/z e Ch6 161 m/z.

Os resultados de CG/SM obtidos das soluções padrão foram comparados com os obtidos das soluções teste para tempo de retenção e relação massa / carga (m/z), a fim de indicar a presença de PCA.

A solução padrão foi analisada nas concentrações de 5.000, 2.500, 1.000 e 500 $\mu\text{g/mL}$. Com base nas áreas abaixo da curva para essas concentrações, foi estabelecida uma curva de calibração para ajudar a encontrar a concentração de PCA das amostras.

Resultados

O tempo de retenção do padrão PCA foi de 12,88 min. A SM do padrão mostrou que tinha a marca de pico 127 m/z. Dois métodos foram utilizados para CG: SCAN e SIM (monitoração de íons simples). Os resultados da varredura indicaram que, após 24 h, o G2 não apontou formação de PCA em nenhuma das amostras, no entanto foi detectada a formação de PCA no G3 e no G4 (uma amostra em cada grupo), evidenciada pela igualdade dos picos em 12,88 min de CG e 127 m/z da SM.

Uma vez que era difícil identificar a presença de PCA pelo método SCAN, uma busca no SIM foi realizada para o íon 127 m/z, cujos resultados mostraram presença de PCA em todas as amostras de G2, G3, G4. A curva de calibração determinou a Equação 1:

$$y = 4.191x - 2355 \quad (1)$$

Em que:

x = concentração;

y = **área abaixo da curva nessa concentração.**

A Equação 1 teve correspondência de 0,992 e, por meio dela, foi encontrada a concentração de PCA na água de armazenamento do disco. A Tabela I apresenta a área e a concentração de soluções padrão e a água de armazenamento do disco. Com base nos valores médios de concentração de PCA nessas águas de armazenamento, foi realizado um teste de correlação de Pearson entre a concentração de CHX usada e a concentração de PCA encontrada. Esse teste mostrou coeficiente de correlação de 0,94 pelo Stata 15.0.

Uma solução forçada com PCA (1 mg/L) foi obtida para estabelecer o percentual de recuperação do método. Esse teste mostrou 92% de recuperação.

As Figuras 1, 2 e 3 mostram os resultados de CG e SM para soluções padrão e para G2, G3 e G4.

Tabela I - Concentração de paracloroanilina e área das soluções padrão e água de armazenamento do disco

Solução		Área	Concentração
S1		487,5	500
S2		1.585,5	1.000
S3		7.179	2.500
S4		19.049	5.000
G2	1	1.375	818,16
	2	2.286	1.099,65
	3	2.706	1.229,42
G3	1	14.174	4.064,5148
	2	14.973	5.019,72
	3	24.973	5.019,72
G4	1	65.256	8.197
	2	53.671	16.976,77
	3	76.236	23.948,98

S1, S2, S3 e S4: soluções padrão; G2, G3 e G4: grupos testados

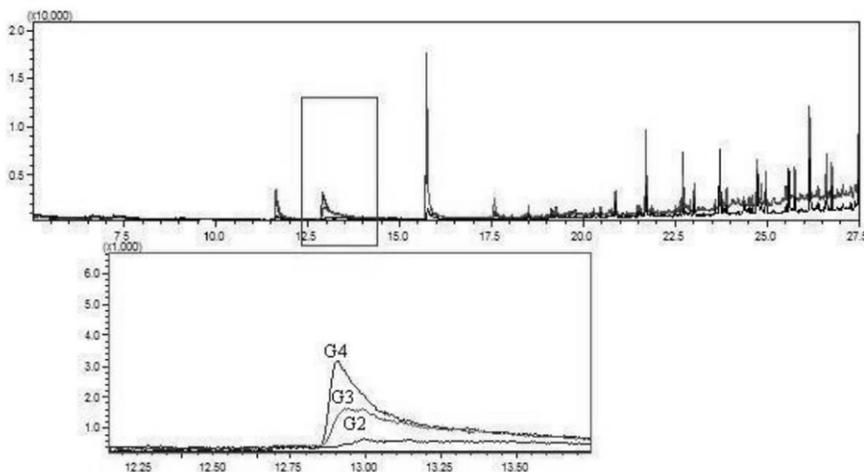


Figura 1 - Sobreposição de alguns resultados SIM da cromatografia gasosa para íons 127 m/z. A imagem inferior é uma aproximação da parte superior e mostra como a concentração de clorexidina aumentou a concentração de paracloroanilina

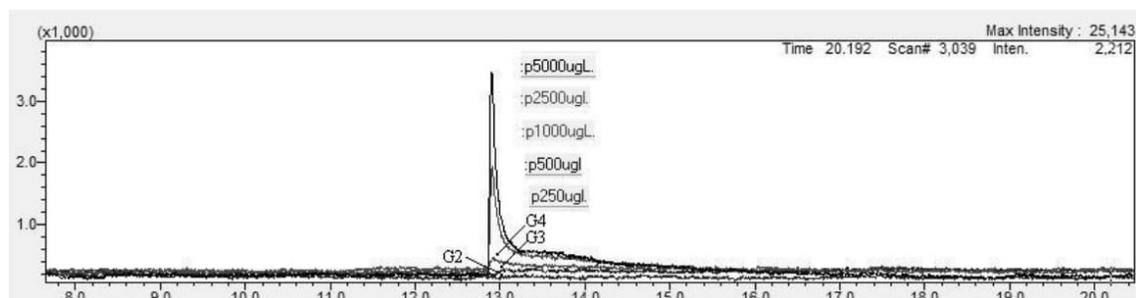


Figura 2 - Superposição de alguns resultados do SIM para soluções padrão e grupos testados mostrando que todos tiveram o mesmo tempo de retenção

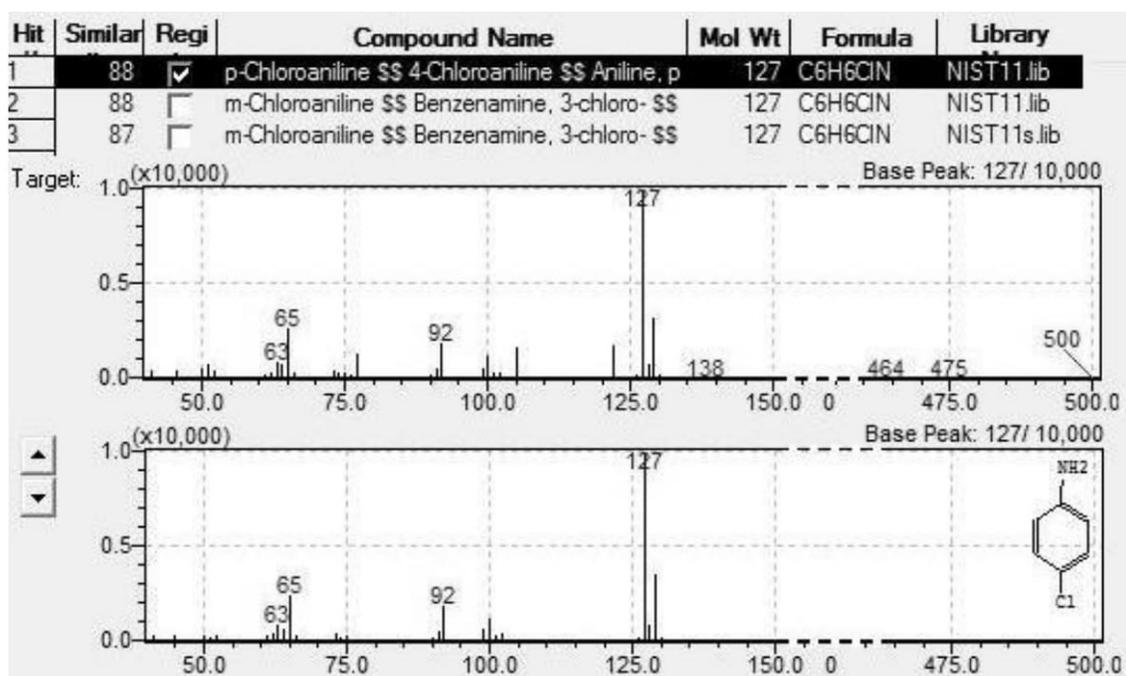


Figura 3 - Espectrometria de massa e sua comparação com a solução padrão, mostrando similaridade de 88%

Discussão

O gluconato de clorexidina é considerado um antibacteriano eficaz para terapia oral e altamente recomendado em todo o mundo [9, 15, 21]. A CHX apresenta as vantagens da eficiência como bactericida e fungicida de amplo espectro e alta substantividade [6, 12, 22]. Como desvantagens, podem ser citados a descoloração da prótese [6, 18] e possíveis efeitos tóxicos, além da eventual degradação da PCA [4]. O achado mais relevante do presente estudo evidencia que, independentemente da concentração de CHX, houve a liberação de PCA pelo método SIM.

A degradação da CHX ocorre por clivagem da molécula ao longo do ligante hexanodiamina entre os anéis aromáticos em ambas as extremidades da molécula. Os resultados da clivagem formam

produtos de degradação menores. Cada um destes contém um anel aromático e, se a corrente for separada do anel aromático no local da clivagem, pode resultar na formação de PCA [25]. No estudo da carcinogênese da PCA foram relatados aumento nos casos de anemia hemolítica leve e aumento leve da meta-hemoglobina, bem como fibrose do baço aumentada significativamente nos grupos tratados com PCA e sarcoma do baço em ratos. A investigação ainda mostrou um ligeiro aumento na incidência de feocromocitomas adrenais nos dois grupos. Os camundongos machos apresentaram incidência aumentada de adenomas e carcinomas hepatocelulares, e também aumentaram os casos de hemangiossarcoma no fígado e baço [7]. Essas e outras descobertas justificam a classificação da PCA no grupo 2B do Iarc como possível carcinogênico em humanos [28].

Não há consenso na literatura sobre a concentração de CHX nem sobre o número de ciclos a serem utilizados para a desinfecção. As concentrações são citadas entre 0,12 e 4%, e os protocolos de desinfecção variam de imersões únicas de 90 s a imersões diárias de 10 ou mais minutos, com ou sem repetições [1, 2, 5, 8, 14, 19, 20]. A CHX pode fornecer substantividade de até 12 semanas, sendo essa uma das razões pelas quais o uso da substância é indicado no tratamento contra microrganismos [22]. Neste estudo, optou-se por realizar apenas uma imersão de 10 min, por ser um protocolo menos agressivo. Como outros protocolos envolvem períodos mais longos ou menor imersão e repetição, os resultados deste estudo podem alterar-se em função da mudança no protocolo de desinfecção.

De acordo com a presente investigação, a desinfecção com G2 não mostrou formação de PCA em nenhuma das triplicatas das amostras testadas no modo SCAN. Essa desinfecção, no entanto, foi menos eficaz em um estudo microbiológico em relação à recorrência da formação de colônias de cândida [16]. G3 e G4 mostraram formação de PCA em pelo menos uma das amostras. Essa detecção, embora não seja conclusiva sobre a formação desses subprodutos como resultado do processo de desinfecção, sugere a possibilidade de isso ocorrer nessas concentrações. O pico de PCA no G3 foi menor do que no G4.

A extração na fase líquida, embora mais rápida e barata, é menos eficiente que a extração na fase sólida. Além disso, a agitação manual pode gerar variação indesejável do processo. Apesar de os discos de resina acrílica terem passado pelo processo de produção padrão e pela inspeção visual quanto à presença de bolhas visíveis, variações não detectadas na porosidade deles podem ter ocorrido. Também foi observado muito ruído em todo o tempo de retenção, que pode ser causado pelos próprios compostos orgânicos da resina acrílica.

Esse ruído fez com que se tornasse difícil identificar o PCA pelo método SCAN e, por isso, tentou-se encontrá-lo pelo método SIM, o qual mostra em termos gráficos o tempo de retenção de íons previamente selecionados pelo operador. Dessa forma, realizou-se uma pesquisa no SIM de 127 m/z. Ela encontrou, em todas as amostras testadas, os mesmos tempos de retenção achados para soluções padrão. O tempo de retenção utilizando a SM apresentou 88% de similaridade com o das soluções padrão, ao longo de alguns picos insignificantes de m/z superior. Igualmente, a área sob a curva desse íon nesse tempo de retenção foi determinada. Essas áreas, quando comparadas à curva de calibração,

permitiram definir a concentração de PCA na água de armazenamento do disco.

É importante notar que todas as amostras apresentaram presença de PCA como resultado da desinfecção com CHX. Além disso, o coeficiente de Pearson mostrou relação positiva entre a concentração de CHX e a de PCA encontrada na água de armazenamento. Isso significa que o risco de ingestão de PCA ao usar o CHX como desinfetante aumenta à medida que a concentração de CHX aumenta. A concentração de PCA na água de armazenamento do disco variou de 81,2 µg/L para uma amostra de G2 a 2.394 mg/L para uma amostra de G4. As concentrações médias foram de 106 µg/L para o G2, 486 µg/L para G3 e 1.608 mg/L para G4. A concentração de G2 foi 10 vezes menor que de G4, o que mostra potencial tóxico menor para esse grupo, no entanto a concentração em si é apenas um parâmetro de comparação entre os procedimentos, uma vez que em nosso trabalho a PCA se acumulou na água durante 24 h e na boca pode ser liberada gradualmente.

Conclusão

Com base na metodologia utilizada, pôde-se concluir que a PCA é formada como subproduto da desinfecção com CHX e que, entre as soluções estudadas, a desinfecção com solução de 0,2% CHX parece ser mais segura em relação à formação de PCA.

Referências

- Altieri KT, Sanitá PV, Machado AL, Giampaolo ET, Pavarina AC, Jorge JH, et al. Eradication of a mature methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) biofilm from acrylic surfaces. *Braz Dent J.* 2013 Sep-Oct;24(5):487-91.
- Aoun G, Saadeh M, Berberi A. Effectiveness of Hexetidine 0.1% Compared to Chlorhexidine Digluconate 0.12% in Eliminating *Candida Albicans* Colonizing Dentures: A Randomized Clinical In Vivo Study. *J Int Oral Health.* 2015 Aug;7(8):5-8.
- Barbin LE, Estrela C, Guedes DFC, Spano JCE, Souza-Neto MD, Pecora JD. Detection of Para-Chloroaniline Reactive Oxygen Species and 1-Chloro-4-Nitrobenzene in High Concentrations of Chlorhexidine and in a Mixture of Chlorhexidine and Calcium Hydroxide. *J Endod.* 2013 May;39(5):664-8.

Camara De Bem SH, Estrela C, Guedes DF, Sousa-Neto MD, Pécora JD. Determination of chemical components derived from 2% chlorhexidine gel degradation using gas chromatography-mass spectrometry. *Acta Odontol Scand.* 2014 Nov;72(8):630-8.

Carvalho CF, Vanderlei AD, Marocho SMS, Pereira SMB, Nogueira L, Paes TJAJ. Effect of disinfectant solutions on a denture base acrylic resin. *Acta Odontol Latinoam.* 2012;25(3):255-60.

Cheng Y, Sakai T, Moroi R, Nakagawa M, Sakai H, Ogata T, et al. Self-cleaning ability of a photocatalyst-containing denture base material. *Dent Mater J.* 2008 Mar;27(2):179-86.

Chhabra RS, Huff JE, Haseman JK, Elwell MR, Peters AC. Carcinogenicity of p-chloroaniline in rats and mice. *Food Chem Toxicol.* 1991 Feb;29(2):119-24.

Cortelli SC, Costa FO, Rode S de M, Haas AN, Andrade AK, Pannuti CM, et al. Mouthrinse recommendation for prosthodontic patients. *Braz Oral Res.* 2014;28(Spe. No.).

Dalwai S, Rodrigues SJ, Baliga S, Shenoy VK, Shetty TB, Pai UY, et al. Comparative evaluation of antifungal action of tea tree oil chlorhexidine gluconate and fluconazole on heat polymerized acrylic denture base resin - an in vitro study. *Gerodontology.* 2016 Sep;33(3):402-9.

Da Silva PM, Acosta EJ, Pinto LR, Graeff M, Spolidorio DM, Almeida RS, et al. Microscopical analysis of *Candida albicans* biofilms on heat-polymerised acrylic resin after chlorhexidine gluconate and sodium hypochlorite treatments. *Mycoses.* 2011 Nov;54(6):e712-7.

Felton D, Cooper L, Duqum I, Minsley G, Guckes A, Haug S, et al. Evidence-based guidelines for the care and maintenance of complete dentures: a publication of the American College of Prosthodontists. *J Prosthodont.* 2011 Feb;20(Suppl. 1):S1-S12.

Gonçalves LS, Rodrigues RC, Andrade Junior CV, Soares RG, Vettore MV. The Effect of Sodium Hypochlorite and Chlorhexidine as Irrigant Solutions for Root Canal Disinfection: A Systematic Review of Clinical Trials. *J Endod.* 2016 Apr;42(4):527-32.

Kolosowski KP, Sodhi RN, Kishen A, Basrani BR. Qualitative analysis of precipitate formation on the surface and in the tubules of dentin irrigated with sodium hypochlorite and a final rinse of chlorhexidine or QMiX. *J Endod.* 2014 Dec;40(12):2036-40.

Matos AO, Costa JO, Beline T, Ogawa ES, Assunção WG, Mesquita MF, et al. Effect of Disinfection on the Bond Strength between Denture Teeth and Microwave-Cured Acrylic Resin Denture Base. *J Prosthodont.* 2018 Feb;27(2):169-76.

Matthes R, Jablonowski L, Koban I, Quade A, Hübner NO, Schlueter R, et al. In vitro treatment of *Candida albicans* biofilms on denture base material with volume dielectric barrier discharge plasma (VDBD) compared with common chemical antiseptics. *Clin Oral Investig.* 2015 Dec;19(9):2319-26.

Mima EGO, Pavarina AC, Vargas FS, Giampaolo ET, Machado AL, Vergani CE. Effectiveness of chlorhexidine on the disinfection of complete dentures colonised with fluconazole-resistant *Candida albicans*: in vitro study. *Mycoses.* 2011 Sep;54(5):e506-12.

Montagner H, Montagner F, Braun KO, Peres PE, Gomes BP. In vitro antifungal action of different substances over microwaved-cured acrylic resins. *J Appl Oral Sci.* 2009 Sep-Oct;17(5):432-5.

Nalbant AD, Kalkanci A, Filiz B, Kustimur S. Effectiveness of different cleaning agents against the colonization of *Candida* spp and the in vitro detection of the adherence of these yeast cells to denture acrylic surfaces. *Yonsei Med J.* 2008 Aug;49(4):647-54.

Pellizzaro D, Polyzois G, Machado AL, Giampaolo ET, Sanitá PV, Vergani CE. Effectiveness of mechanical brushing with different denture cleansing agents in reducing in vitro *Candida albicans* biofilm viability. *Braz Dent J.* 2012;23(5):547-54.

Pero AC, Scavassin PM, Nunes ÉM, Policastro VB, Giro G, Compagnoni MA. Bond Strength of Artificial Teeth Attached to a Microwave-Polymerized Denture Base Resin after Immersion in Disinfectant Solutions. *J Prosthodont.* 2016 Oct;25(7):576-9.

Rodríguez Acosta EJ, Silva PM, Jacobina M, Lara VS, Neppelenbroek KH, Porto VC. Candida albicans Adherence to Denture Base Material: Chemical Disinfection and the Effect of Acquired Salivary Pellicle Formation. J Prosthodont. 2015 Apr;24(3):200-6.

Rosenthal S, Spangberg L, Safavi K. Chlorhexidine substantivity in root canal dentin. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2004 Oct;98(4):488-92.

Siddique R, Sureshbabu NM, Somasundaram J, Jacob B, Selvam D. Qualitative and quantitative analysis of precipitate formation following interaction of chlorhexidine with sodium hypochlorite, neem, and tulsi. J Conserv Dent. 2019 Jan-Feb;22(1):40-7.

Srinivasan M, Gulabani MA. Microbiological evaluation of the use of denture cleansers in combination with an oral rinse in complete denture patients. Indian J Dent Res. 2010 Jul-Sep;21(3):353-6.

Thomas JE, Sem DS. An in vitro spectroscopic analysis to determine whether para-chloroaniline is produced from mixing sodium hypochlorite and chlorhexidine. J Endod. 2010 Feb;36(2):315-7.

Uludamar A, Ozkan YK, Kadir T, Ceyhan I. In vivo efficacy of alkaline peroxide tablets and mouthwashes on Candida albicans in patients with denture stomatitis. J Appl Oral Sci. 2010 May-Jun;18(3):291-6.

Valentini-Mioso F, Maske TT, Cenci M, Boscato N, Pereira-Cenci T. Chemical hygiene protocols for complete dentures: A crossover randomized clinical trial. J Prosthet Dent. 2019 Jan;121(1):83-9.

World Health Organization. International Agency for Research on Cancer. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. IARC; 1993.