

Efecto de enjuagues de ácido hipocloroso en el pH de la saliva: estudio *in vitro*

Effect of Hypochlorous Acid as a Mouthwash on Salivary pH: in vitro Study

Diego Fernando Gualtero Escobar
Candidato a Doctor en Biotecnología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. Licenciado en Biología y Química, magíster en Bioquímica, profesor asociado, investigador del Instituto Unidad de Investigación Básica Oral, Facultad de Odontología-Vicerrectoría de Investigaciones, Universidad El Bosque, Bogotá, Colombia.

Diana Marcela Buitrago Ramírez
Doctor en Ciencias Farmacéuticas, Universidad Nacional de Colombia. Bacterióloga, profesora asociada, investigadora Instituto Unidad de Investigación Básica Oral, Vicerrectoría de Investigaciones, Universidad El Bosque, Bogotá, Colombia.

Diego Alejandro Trujillo Pérez
Odontólogo, Universidad El Bosque, Bogotá, Colombia.

Justo Calderón Robles
Ingeniero químico, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia. Gerente Aquilabs S. A., Colombia.

Gloria Inés Lafaurie Villamil
Odontóloga, especialista en Periodoncia, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia. Magistra en Epidemiología, profesora titular, Facultad de Odontología, directora Instituto Unidad de Investigación Básica Oral, Universidad El Bosque, Bogotá, Colombia.

Esta investigación hace parte de un proyecto financiado por el Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación Colciencias, Fondo: 130850227678. El proyecto fue aprobado el 27 de septiembre del 2012 con acta 012-2012 por parte del Comité de Ética de la Universidad El Bosque.

RESUMEN

Antecedentes: Se ha propuesto el ácido hipocloroso (HOCl) como un agente antiplaca. El potencial uso de enjuagues con HOCl debe valorarse para establecer si afecta el pH y las propiedades amortiguadoras de la saliva que favorezcan procesos de desmineralización dental. **Objetivo:** Evaluar el efecto *in vitro* de enjuagues con HOCl a diferentes concentraciones en el pH de la saliva. **Métodos:** Se recolectaron 20 muestras de saliva total. 1,1 ml de saliva fueron titulados con 0,1 y 0,4 mL de HOCl a diferentes concentraciones (125, 250 y 500 ppm) hasta una proporción en volumen 1:1 o 4:1. El NaCl 0,5 % se utilizó como control de titulación. Se evaluó el volumen requerido de HOCl para inducir un pH crítico de la saliva $\leq 5,5$. Se efectuó un análisis descriptivo para todas las variables y un Anova con *post hoc* de comparaciones múltiples de Bonferroni. **Resultados:** Ninguna de las concentraciones evaluadas de HOCl afectó la capacidad de la saliva en amortiguar los ácidos en solución a una proporción 1:1. Sin embargo, se alcanzó un pH $< 5,5$ cuando se aumentó la proporción de HOCl 500 ppm en relación con el volumen de saliva (3:1; $p = 0,016$). Las concentraciones 250 y 125 ppm no afectan considerablemente el pH de la saliva incluso a proporciones en volumen 6:1 y 9:1, respectivamente. **Conclusión:** El HOCl a 125 ppm y a 250 ppm no afecta la capacidad de la saliva para neutralizar los ácidos en solución, por lo que estas concentraciones son óptimas para su potencial uso como principio activo de enjuague bucal antiplaca.

PALABRAS CLAVE

ácido hipocloroso; amortiguadores; placa dental; saliva

ÁREAS TEMÁTICAS

Bioquímica; enfermedades dentales; enjuague bucal; especies reactivas de oxígeno; secreciones corporales

ABSTRACT

Background: Hypochlorous acid (HOCl) has been proposed as antiplaque agent. The potential use of anti-plaque mouthwashes must be previously evaluated to determine whether it affects damping properties of saliva favoring tooth demineralization processes. **Aim:** To evaluate *in vitro* the effect of mouthwashes with HOCl at different concentrations on saliva pH. **Methods:** 20 whole saliva samples were collected. 1.1 ml of saliva were titrated with 0.1 or 0.4 mL of HOCl at different concentrations (125, 250 y 500 ppm) until a volume ratio 1:1 and 4:1. 0.5% NaCl was used as a titration control. HOCl volume required to induce a critical pH in saliva was assessed at ≤ 5.5 . A descriptive analysis for all variables and ANOVA with *post hoc* Bonferroni with multiple comparisons was conducted. **Results:** None of the HOCl concentrations evaluated affects the ability of the saliva to neutralize acids in solution at a 1:1 ratio. However, it is reached at pH < 5.5 when the proportion of HOCl at 500 ppm was increased in relation to the volume of saliva (3:1; $p = 0.016$). Concentrations of 250 and 125 ppm do not affect saliva pH even at proportions in volume of 6:1 and 9:1. **Conclusion:** HOCl at 125 ppm and 250 ppm does not affect the ability of saliva to neutralize acids in solution and these concentrations are suitable for use as active agent of an antiplaque mouthwash.

KEYWORDS

buffers; dental plaque; hypochlorous acid; saliva

THEMATIC FIELDS

Biochemistry; bodily secretions; reactive oxygen species; tooth diseases

CÓMO CITAR ESTE ARTÍCULO

Gualtero DF, Buitrago DM, Trujillo DA, Calderón J, Lafaurie GI. Efecto de enjuagues de ácido hipocloroso en el pH de la saliva: estudio *in vitro*. Univ Odontol. 2015 Ene-Jun; 34(72): 83-90. <http://dx.doi.org/10.11144/Javeriana.uo34-72.efea>

doi:10.11144/Javeriana.uo34-72.efea

Recibido para publicación: 25/11/2014
Aceptado para publicación: 21/06/2015

Disponible en: <http://www.javeriana.edu.co/universitasodontologica>

INTRODUCCIÓN

La saliva es una secreción exocrina compleja, importante en el mantenimiento de la homeostasis de la cavidad bucal (1). Es bien conocido que las funciones de la saliva son, en relación con el flujo y la composición molecular, proteger los tejidos bucales contra la desecación y las agresiones del medio ambiente, así como modular los procesos de desmineralización y remineralización (2).

La saliva contiene sistemas amortiguadores orgánicos e inorgánicos como bicarbonato, fosfato y proteínas que mantienen regulado su pH (3,4). Los sistemas amortiguadores neutralizan los ácidos generados por los microorganismos cariogénicos y controlan las caídas de pH por acción bacteriana a partir de los carbohidratos fermentables o por acción de los alimentos (5). El pH de la saliva y su capacidad amortiguadora también regulan procesos de disolución y remineralización del diente, por lo que a valores de pH menores de 5,5 se favorece la desmineralización del esmalte dental (2).

La cavidad oral provee un microambiente ideal para el crecimiento bacteriano. La biopelícula dental es la forma más frecuente de proliferación microbiana. La acumulación de placa genera procesos patológicos como la enfermedad periodontal, que involucra una serie de eventos asociados con el crecimiento de microorganismos (6). El control de la biopelícula dental es una de las piedras angulares de la odontología preventiva y se puede lograr por medios mecánicos (7), el uso de agentes químicos o una combinación de los dos (8,9). Varios agentes químicos, como la clorhexidina, el flúor, aceites esenciales y el cloruro de cetilpiridinio, se emplean comúnmente como principios activos en enjuagues bucales con diferentes efectos en el control de la placa (8,10,11).

El ácido hipocloroso (HOCl) hace parte de las especies reactivas del oxígeno liberadas de manera endógena por los neutrófilos. Se ha utilizado en medicina para el tratamiento de lesiones infectadas y de pobre cicatrización (12), ya que presenta un potente efecto antimicrobiano y antiinflamatorio al inducir la proliferación celular (13-15). El HOCl ha mostrado tener un efecto antimicrobiano de amplio espectro que abarca bacterias gramnegativas, grampositivas, parásitos y hongos (16). *In vitro*, el HOCl muestra inhibición bacteriana para bacterias de la biopelícula dental a una con-

centración del 0,05 % a un minuto para *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Eikenella corrodens*, *Campylobacter rectus* y *Fusobacterium nucleatum*, así como microorganismos sobreinfectantes como *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella oxytoca* y *Klebsiella pneumoniae* (17).

En Colombia, en 1993, a través de la implementación de un protocolo modificado de acidificación más procesos secundarios de superoxidación del agua, se desarrolló una técnica para estabilizar el HOCl. Esta dio inicio a procesos investigativos dirigidos a la optimización y refinamiento de los métodos de obtención de la molécula hasta crear una solución antimicrobiana a base de HOCl con potenciales aplicaciones profilácticas y terapéuticas en medicina humana. Esto fue aprobado por el Instituto de Vigilancia en Alimentos y Medicamentos de Colombia (18,19).

El interés que ha despertado el ácido hipocloroso como agente antiplaca en cavidad oral se basa en su baja toxicidad, efectividad antimicrobiana sobre microorganismos con poder patogénico en la cavidad oral, su efecto antiinflamatorio y sobre la proliferación celular y los antecedentes de su uso clínico en medicina como sustancia tópica para desinfectar heridas (12,17,20,21). El desarrollo de una sustancia antiplaca con efectos antiinflamatorios y capacidad de inducir proliferación celular con un efecto en la cicatrización de heridas representaría una innovación en odontología.

La Administración de Medicamentos y Alimentos de Estados Unidos y la Asociación Dental Estadounidense han establecido protocolos para evaluar el uso potencial en la cavidad oral de sustancias antiplaca y para el control de la gingivitis (22). Siguiendo los lineamientos de estos protocolos, este proyecto tiene como fin implementar estudios de seguridad inicial. Se han comenzado varias fases de estudio para el desarrollo y la evaluación de un enjuague con base en HOCl para uso en odontología. Sin embargo, los agentes antimicrobianos para el control químico de la placa bacteriana no deben afectar la capacidad natural de la saliva de amortiguar los ácidos generados por el metabolismo de la placa o los alimentos ingeridos (3). Debido a que el HOCl es un ácido débil y en solución presenta un pH ácido, el objetivo de este estudio fue evaluar *in vitro* el efecto del HOCl a diferentes concentraciones en el pH de la saliva.

MATERIALES Y MÉTODOS

Desarrollo de enjuagues de HOCl para uso oral

La solución de trabajo de HOCl se desarrolló según una fórmula y tecnología patentadas de Aquilabs S. A./US (US patent: US20040062818 y US2009/0258083A1) (23). Se diseñaron dos soluciones de HOCl de apariencia translúcida. Las dos soluciones (A y B) se obtuvieron con una concentración de cloro disponible como HOCl 0,025 % y 0,05 % según la norma NTC 1847. Un potencial de óxido-reducción de 950-1100 M. V. y una conductividad de 25,3 ds/m, una densidad de 1,01 g/ml a un pH $5,2 \pm 0,5$.

Toma de la muestra

La población objeto del presente estudio estuvo constituida por 20 pacientes voluntarios hombres con edades de 18-25 años, sistémicamente sanos, no fumadores, sin caries dental, sin tratamiento de ortodoncia, que no estuvieran utilizando enjuagues bucales y que al momento del estudio no se encontraran consumiendo ningún tipo de medicamento que pudiera alterar las propiedades físico-químicas de la saliva, o su producción y secreción, o que interactuara con el ácido hipocloroso en el momento del ensayo experimental. Este proyecto fue evaluado y aprobado por el Comité de Ética de la Universidad El Bosque, el 27 de septiembre del 2012 con acta 012-2012. Todos los pacientes firmaron el consentimiento informado antes de su participación.

Recolección de la muestra

Se designó un ambiente adecuado para la toma de la muestra, siguiendo las recomendaciones de la Asociación Latinoamericana de Investigaciones en Saliva. Las muestras de saliva se recolectaron bajo las mismas condiciones y por el mismo investigador en el horario comprendido entre las 8:00 y las 9:00 a. m. para evitar alteraciones por efecto del ciclo circadiano en cada sujeto en estudio. Antes de la recolección de la muestra se les indicó a los pacientes no ingerir alimentos, ni bebidas, ni cepillarse los dientes 2 horas antes de la toma de muestra. De cada paciente se recolectaron entre 3,5 y 5,0 mL de saliva total no estimulada en tubos de polipropileno estériles (Falcón™ de 15 y 50 ml), utilizando el método de *spitting* (24). El tiempo de duración de la toma de muestra estuvo en el rango de 10 a 15 minutos. Luego cada muestra se mantuvo en refrigeración hasta el momento de llevarla al laboratorio (lo cual se hacía en un plazo no mayor a una hora). A todas las muestras se les adicionó un inhibidor de proteasas (Sigma™, Estados Unidos).

Medición de pH salival por titulación

Inmediatamente después de la recolección de cada una de las muestras de saliva, se determinó el pH de forma directa colocando un electrodo de pH conectado a un potenciómetro previamente calibrado (Ultrabase UB-10®) dentro de la muestra. Se utilizaron soluciones de HOCl en concentraciones de 125, 250 y 500 ppm con un pH $5,2 \pm 0,5$ en ensayos de titulación para evaluar los cambios de pH de la saliva. Se emplearon 10 muestras de saliva y se depositaron 1,1 ml de cada muestra para titularlos con HOCl hasta alcanzar una relación 1:1 muestra/HOCl en volumen. El método de titulación consistió en adicionar de forma continua pequeños volúmenes de HOCl (0,1 mL) e ir registrando el pH de la saliva. Se realizó un segundo ensayo utilizando otras 10 muestras con titulación con volúmenes constantes de 0,4 mL del principio activo, en una relación 1:4 de saliva/HOCl. Esto se hizo con el fin de lograr un pH más bajo en saliva y alcanzar una caída del pH salivar hasta un punto crítico (pH < 5,5), con el fin de romper la capacidad amortiguadora de la saliva. En todos los experimentos realizados se utilizó como control NaCl al 0,5 %, pH 7,4. Durante el proceso de titulación, el electrodo se enjuagó con agua destilada y se secó con papel absorbente entre cada medición y cada muestra.

Expresión y análisis de resultados

La capacidad amortiguadora de la saliva fue reportada en términos de disminución constante del pH debido a la naturaleza de la titulación. Se realizaron curvas de pH del promedio de las muestras de saliva evaluadas comparadas con cantidades crecientes de los tratamientos. Se efectuó un análisis descriptivo para todas las variables y empleó un análisis de varianza (Anova) de un factor que fue corregido a través de la prueba *post hoc* de comparaciones múltiples de Bonferroni, para establecer diferencias en la disminución del pH inducido por las diferentes concentraciones de HOCl evaluadas con los volúmenes de titulación. Se asumió un valor de $p \leq 0,016$ para establecer diferencias significativas entre los grupos. El tratamiento de los datos se realizó mediante el paquete estadístico SPSS (v. 13).

RESULTADOS

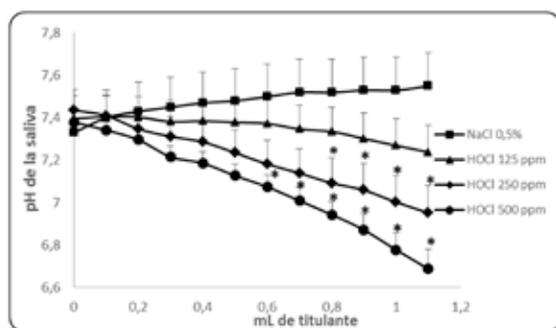
Efecto del HOCl en la capacidad

amortiguadora de la saliva y valores de pH

El pH inicial promedio de las muestra de saliva total fue de 7,35. Los resultados obtenidos, luego de la titulación de 1,1 mL de saliva con 0,1 mL de las soluciones de HOCl a 250 ppm y 500 ppm hasta un

volumen final de 1,1 mL, muestran que estas inducen una ligera disminución de los valores de pH 6,9 y 6,7, respectivamente, en comparación con el pH 7,1 inducido por el mismo principio activo a 125 ppm. Sin embargo, los valores de pH en saliva no alcanzaron el pH crítico < 5,5. Por otro lado, el NaCl utilizado como control no indujo disminución del pH de la saliva. Estos resultados indican que a una relación 1:1 de saliva/HOCl, con las diferentes concentraciones evaluadas, no se afecta de manera considerable la capacidad de la saliva en contrarrestar los ácidos generados en la titulación (figura 1).

FIGURA 1
EFECTO DE LA TITULACIÓN CON SOLUCIONES DE HOCl DE 125, 250 Y 500 PPM EN EL pH DE LA SALIVA A UNA PROPORCIÓN 1:1



Nota. Cada punto representa el promedio \pm e. s. m. de $n = 10$.
* $p < 0,016$ con respecto al control (NaCl 0,5 %).

Al analizar los datos a través de la prueba *post hoc* de comparaciones múltiples de Bonferroni, se determinó que la titulación con las soluciones de HOCl a 500 y 250 ppm induce una disminución significativa de los valores de pH en saliva a partir de la adición de 0,5 mL ($p = 0,011$) y 0,8 mL ($p = 0,016$) de la solución cuando se compararon con NaCl. Estos volúmenes corresponden a una concentración final de 176,5 mg para la solución de 500 ppm y de 97,3 mg para la solución de 250 ppm (tabla 1). No obstante, estos enjuagues de HOCl a ambas concentraciones no producen una disminución del pH salival hasta el punto de afectar su capacidad amortiguadora. Con respecto a los resultados obtenidos al utilizar la solución de HOCl a 125 ppm, no se presentó ninguna variación estadísticamente significativa de los valores de pH de la saliva (figura 1).

Para determinar si al aumentar el volumen de HOCl en las diferentes concentraciones del estudio se lograba vencer la capacidad neutralizante de la saliva hasta alcanzar un pH crítico ($\leq 5,5$), se realizó una titulación con un mayor volumen de titulante (0,4 mL). El pH promedio inicial de la saliva total fue de 7,1. Se necesitaron mayores volúmenes de HOCl 125 ppm para modificar de manera considerable los valores de pH de la saliva hasta el punto crítico, a fin de vencer la capacidad de amortiguar ácidos en la solución (tabla 2).

TABLA 1
PH DE SALIVA TOTAL LUEGO DE LA TITULACIÓN CON HOCl A DIFERENTES CONCENTRACIONES*

Volumen (μ L)	HOCl (125 ppm)	Promedio de pH	HOCl (250 ppm)	Promedio de pH	HOCl (500 ppm)	Promedio de pH	NaCl 0,5 %
0	0,0	7,35	0,0	7,39	0,0	7,38	7,33
100	10,4	7,33	20,8	7,37	41,7	7,34	7,40
1100	62,5	7,13	131,0	6,89	261,9	6,69	7,55

* Valores promedio de pH, volumen 1:1 muestra/HOCl.

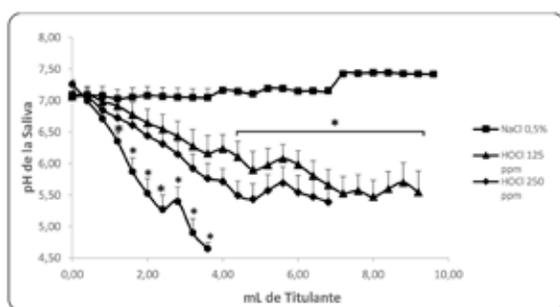
TABLA 2
DETERMINACIÓN DEL pH CRÍTICO (< 5,5) DE LA SALIVA TOTAL LUEGO DE LA TITULACIÓN CON HOCl A DIFERENTES CONCENTRACIONES*

Titulante	Saliva pH inicial	Volumen titulación (mL)	mg HOCl	Saliva pH final	Δ pH
HOCl 125 ppm	7,07	9,2	114,13	5,55	1,520
HOCl 250 ppm	6,99	7,2	216,9	5,53	1,460
HOCl 500 ppm	7,26	2,8	359,0	5,40	1,860
NaCl	7,10	2,8	N/A	7,09	0,001

* Valores promedio de pH, volumen 1:4 muestra/HOCl. Δ pH (cambio de pH) = pH inicial - pH final.
N/A: no aplica.

Teniendo en cuenta que se utilizaron 1,1 mL de saliva en la titulación con HOCl 125 ppm, la proporción en volumen HOCl/saliva fue de aproximadamente 9:1; mientras que para 250 ppm fue de 6:1. Cuando se tituló la saliva con HOCl a 500 ppm, el volumen de titulante requerido para alcanzar el punto crítico de pH (5,5) fue menor reflejando una proporción 3:1. El pH de la saliva descendió rápida y significativamente ($p = 0,016$) con HOCl a 500 ppm, lo cual afecta la capacidad amortiguadora de la saliva hasta el pH crítico (figura 2).

FIGURA 2
TITULACIÓN DE LA SALIVA CON SOLUCIONES DE HOCL
EN CONCENTRACIONES DE 125, 250 Y 500 PPM
HASTA PH CRÍTICO DE 5,5



Nota. Proporción 1:4. Cada punto representa el promedio \pm e. s. m. de $n = 10$.

* $p < 0,016$ con respecto al control (NaCl 0,5 %).

DISCUSIÓN

Son diversos los estímulos que pueden activar la secreción salival y aumentar o disminuir la capacidad amortiguadora de la saliva. Entre ellos se encuentran los que actúan directamente en la cavidad bucal, como sustancias químicas o alimentos u otras sustancias como medicamentos o productos farmacológicos de uso oral (25). El objetivo de utilizar productos farmacológicos antimicrobianos bucales es inhibir el crecimiento bacteriano de microorganismos patógenos de la cavidad oral, pero sin afectar la secreción o la capacidad amortiguadora de la saliva, dado que si el pH disminuye de manera significativa hasta acidificarse, puede conducir a efectos adversos locales inmediatos como erosión del esmalte dental (26). La erosión dental es definida como una pérdida irreversible de estructura dental por disolución química del esmalte que no involucra bacterias. Los ácidos responsables de la erosión son derivados de fuentes de dieta, ocupacionales o intrínsecas. Sin embargo, la erosión dental también se puede inducir por enjuagues bucales (27,28).

El HOCl es un agente antimicrobiano efectivo, debido a que induce oxidación o clorinación para neutralizar endotoxinas o exotoxinas como los lipopolisacáridos y gingipainas de bacterias gramnegativas patógenas. En las gingipainas de *Porphyromonas gingivalis*, el HOCl induce la oxidación de residuos de cisteínas presentes en el sitio activo de estas enzimas, lo cual bloquea su función como proteasa en la degradación del tejido periodontal (14). En las membranas bacterianas, el HOCl induce una pérdida en la capacidad respiratoria al modificar irreversiblemente proteínas y enzimas que contienen grupos hemo y sulfuros, lo que lleva a la muerte del microorganismo (29).

En el presente estudio se evaluaron soluciones de HOCl a 125, 250 y 500 ppm, utilizando concentraciones comerciales indicadas para uso en desinfección de heridas de piel. Asimismo, estas concentraciones se valoran en estudios paralelos de seguridad de este producto en cavidad oral en relación con la toxicidad local, la viabilidad celular, pruebas antibacterianas y la capacidad erosiva sobre el esmalte dental *in vitro* (datos no mostrados).

El comportamiento altamente activo de la molécula de HOCl busca alcanzar su propio equilibrio para mantenerse en mayor proporción en la formulación; por lo tanto, su pH 5,2 tiende a reducirse en $\pm 0,5$ log, lo cual acidifica la solución y conserva su estabilidad sin disociarse y siendo menos sensible a la descomposición por factores externos como la temperatura o la exposición a luz solar (30). A pesar de estos rangos de pH a las concentraciones de 125 ppm y 250 ppm, no se presenta una disminución vertiginosa del pH salival hasta el considerado comúnmente como pH crítico de 5,5 que pueda llevar a efectos adversos locales inmediatos como erosión dental, caries, susceptibilidad a candidiasis, predisposición a enfermedad periodontal y aparición de cáncer bucal (2,31). A estas concentraciones no se altera la capacidad amortiguadora de la saliva, lo que indica que este producto, además de tener efectos antimicrobianos, es óptimo porque no induce cambios bruscos del pH salival en volúmenes de uso para un enjuague bucal. Por ello se considera un buen candidato para ser utilizado con fines terapéuticos en el ámbito bucal. Al comparar los hallazgos de este estudio, su comportamiento es similar a otros enjuagues de alto uso clínico como la clorhexidina al 0,12 % (32), el cloruro de cetilpiridinio y el triclosán (33), que no modifican la capacidad amortiguadora de la saliva. Se necesitan futuros estudios *in vivo* para confirmar estos resultados.

Cavalcanti y colaboradores, en estudio publicado en el 2010, evaluaron el pH endógeno de 10 enjuagues bucales de venta en Brasil. Los rangos de pH fueron de 3,56 a 7,43. Tres de ellos estuvieron por debajo del pH crítico 5,5: Clinerize®, Listerine Cool Citrus® y el Peroxyl®, que presentan como ingrediente activo timol o peróxido de hidrogeno (31). Al utilizar la solución de HOCl a 500 ppm, mostraron que con tal concentración se induce una disminución relevante del pH salivar, al utilizar bajos volúmenes de la solución por debajo de las utilizadas para su dosificación en enjuague bucal que es de 10 mL. Ello sugiere que a esta concentración se puede romper la capacidad amortiguadora de la saliva lo que conlleva efectos indeseables en la cavidad oral.

Es importante resaltar que el potencial erosivo de una sustancia no puede ser atribuido solo al pH. Otras propiedades fisicoquímicas, como la acidez titulable mediante la incorporación de 0,1 N de KOH para establecer la cantidad de base que necesita el producto para alcanzar un pH igual o mayor al pH neutro, la evaluación del rendimiento y el total de sacarosa disuelta ($^{\circ}\text{Bx}$) y la viscosidad deben ser también analizadas (31). Cabe destacar que la mayoría de los productos farmacológicos de uso tópico bucal dentro de sus excipientes utilizan sustancias como el bicarbonato que son amortiguadores del pH ácido, con el fin de mantener un pH neutro salival (32,33). Otros productos contienen flúor y esta reducción del pH incrementa la estabilidad química de algunos compuestos de flúor, favorecen su incorporación en la hidroxiapatita y permiten la precipitación de fluoruro de calcio sobre la superficie del diente, lo que reduce así la capacidad erosiva del producto (31).

Los resultados de este estudio indican que la saliva tiene mejor capacidad de amortiguar los ácidos de soluciones de HOCl en concentraciones de 125 y 250 ppm. Por el contrario, el HOCl a 500 ppm afecta considerablemente esta capacidad, pues disminuye de esta forma el pH de la saliva a un punto crítico que favorecería la desmineralización del esmalte dental (2). La saliva contiene bases conjugadas como el bicarbonato (HCO_3^{-1}), el fosfato ácido (HPO_4^{-2}) e, incluso, las mismas proteínas como la lisozima y la α -amilasa que neutralizan los hidrogeniones (H^+) liberados por ácidos fuertes o débiles. Así mantienen el pH de la saliva estable (4). Cuando el pH de salival alcanza un valor de 5,5, su capacidad amortiguadora se rompe, lo que favorece los procesos de desmineralización del esmalte dental relacionados con caries (2,3).

El HOCl es un ácido débil con un $\text{pKa} = 7,5$ que se mantiene estable (protonado) en solución un pH entre 3 y 6. Cuando el pH de la solución es 7,5, las formas en proporción presentes en solución son 50 % de HOCl y 50 % de ClO^- (ion hipoclorito) (30). Por lo tanto, los enjuagues orales con HOCl se podrían utilizar suplementados con amortiguadores con un pKa que mantenga un pH que favorezca la forma HOCl protonado dentro del enjuague y, a la vez, fortalezca la capacidad amortiguadora de la saliva. Dado que estos resultados son *in vitro*, es necesario continuar evaluando el efecto del HOCl sobre la capacidad amortiguadora de la saliva en estudios *in vivo* para evaluar los cambios de pH de la saliva tras el uso del enjuague bucal.

La evaluación efectuada sobre el pH salivar es requerida dentro de los estudios iniciales de seguridad para poder considerar el HOCl como sustancia promisoría. Aun así, constituye solo un punto dentro de una serie de etapas que deben seguirse con rigurosidad para llegar a conclusiones sobre su seguridad y eficacia. Concomitante con este estudio, se están desarrollando pruebas de toxicidad local, citotoxicidad celular y capacidad proliferativa del HOCl y pruebas microbiológicas que permitan sustentar la iniciación de estudios clínicos para evaluar la eficacia antimicrobiana y sobre la cicatrización de heridas para uso en la cavidad oral.

CONCLUSIONES

El HOCl en concentraciones de 125 ppm y 250 ppm no afecta considerablemente la capacidad amortiguadora de la saliva, por lo que sería posible emplear dichas concentraciones en enjuagues bucales. Por el contrario, el HOCl a 500 ppm disminuye drásticamente el pH de la saliva, por lo que no se recomendaría el uso de esa concentración en enjuagues bucales sin la incorporación de sustancias amortiguadores del pH ácido.

RECOMENDACIONES

Debido a su naturaleza ácida y su potencial uso como agente antiplaca, el HOCl como ingrediente activo en enjuagues bucales se debería suplementar con otros ingredientes amortiguadores que mantuvieran estable el HOCl y fortalecieran la capacidad natural de la saliva de amortiguar los ácidos que se generen por la acción del HOCl, en especial en concentraciones de 500 ppm. Es necesario continuar realizando estudios *in vivo* que puedan confirmar los hallazgos obtenidos en este estudio.

REFERENCIAS

- Romero HM, Hernández Y. Modificaciones del pH y flujo salival con el uso de aparatología funcional tipo Bimler. *Rev Latinoam Ortod Odontopediatr Ortodoncia.ws* [internet]. 2009 Mar [citado 2014 nov 15]. Disponible en: www.ortodoncia.ws.
- Aiuchi H, Kitasako Y, Fukuda Y, Nakashima S, Burrow MF, Tagami J. Relationship between quantitative assessments of salivary buffering capacity and ion activity product for hydroxyapatite in relation to cariogenic potential. *Aust Dent J*. 2008 Jun; 53(2): 167-71.
- Moritsuka M, Kitasako Y, Burrow MF, Ikeda M, Tagami J. The pH change after HCl titration into resting and stimulated saliva for buffering capacity test. *Aust Dent J*. 2006 Jun; 51(2): 170-4.
- Lamanda A, Cheaib Z, Turgut MD, Lussi A. Protein buffering in model systems and in whole human saliva. *PLoS One*. 2007 Feb; 2(2): e263.
- Cury JA, Tenuta LM. Enamel remineralization: controlling the caries disease or treating early caries lesions? *Braz Oral Res*. 2009; 23(Suppl 1): 23-30.
- Palmer, RJ. Oral bacterial biofilms: History in progress. *Microbiol*. 2009 Jul; 155(Pt 7): 2113-4.
- van der Weijden GA, Hioe KP. A systematic review of the effectiveness of self-performed mechanical plaque removal in adults with gingivitis using a manual toothbrush. *J Clin Periodontol*. 2005; 32(Suppl 6): 214-28.
- Riep BG, Bernimoulin JP, Barnett ML. Comparative antiplaque effectiveness of an essential oil and an amine fluoride/stannous fluoride mouthrinse. *J Clin Periodontol*. 1999 Mar; 26(3): 164-8.
- Pan PC, Harper S, Ricci-Nittel D, Lux R, Shi W. In-vitro evidence for efficacy of antimicrobial mouthrinses. *J Dent*. 2010 Jun; 38(Suppl 1): S16-20.
- Charles CH, Mostler KM, Bartels LL, Mankodi SM. Comparative antiplaque and antigingivitis effectiveness of a chlorhexidine and an essential oil mouthrinse: 6-month clinical trial. *J Clin Periodontol*. 2004 Oct; 31(10): 878-84.
- Sharma NC, Araujo MW, Wu MM, Qaqish J, Charles CH. Superiority of an essential oil mouthrinse when compared with a 0.05% cetylpyridinium chloride containing mouthrinse: a six-month study. *Int Dent J*. 2010 Jun; 60(3): 175-80.
- Selkon, JB, Cherry GW, Wilson JM, Hughes MA. Evaluation of hypochlorous acid washes in the treatment of chronic venous leg ulcers. *J Wound Care*. 2006 Jan; 15(1): 33-7.
- Fu X, Kassim, SY, Parks WC, Heinecke JW. Hypochlorous acid generated by myeloperoxidase modifies adjacent tryptophan and glycine residues in the catalytic domain of matrix metalloproteinase-7 (matrilysin): an oxidative mechanism for restraining proteolytic activity during inflammation. *J Biol Chem*. 2003 Aug 1; 278(31): 28403-9.
- Chong-Hou S, Hsein-Kun L. The role of hypochlorous acid as one of the reactive oxygen species in periodontal disease. *J Dent Sci*. 2009; 4(2): 45-4.
- Kim C, Cha Y N. Taurine chloramine produced from taurine under inflammation provides anti-inflammatory and cytoprotective effects. *Amino Acids*. 2014 Jan; 46(1): 89-100.
- Wang L, Khosrovi B, Najafi R. N-Chloro-2,2-dimethyltaurines: a new class of remarkably stable N-chlorotaurines. *Tetrahedron Letters*. 2008; 49: 2193-5.
- Lafaurie GI, Aya MR, Arboleda S, Escalante A, Castillo DM, Millán LV, Calderón JL, Ruiz BN. Eficacia desinfectante del ácido hipocloroso sobre cepas con poder patogénico de cavidad oral. *Rev Colomb Investig Odontol*. 2009; 1: 3-11.
- Henaó SC, Rocio C, Gaitán JA. Actividad bactericida del HOCl sobre 5 cepas causantes de infección nosocomial. *Rev Fac Med (Universidad Nacional de Colombia)*. 2003; 51(3): 136-42.
- Naranjo J, Acevedo C, Calderón JL. Uso del ácido hipocloroso en úlceras de miembros inferiores. *Informador Médico*. 2006; 94: 8-11.
- Wang L, Bassiri M, Najafi R, Najafi K, Yang J, Khosrovi B, Hwang W, Barati E, Belisle B, Celeri C, Robson MC. Hypochlorous acid as a potential wound care agent: part I. Stabilized hypochlorous acid: a component of the inorganic armamentarium of innate immunity. *J Burns Wounds*. 2007 Apr; 6: e5.
- Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med*. 1989 Feb; 320(6): 365-76.
- U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research. Guidance for industry. Gingivitis: development and evaluation of drugs for treatment or prevention [internet]. Rockville, MD: FDA; 2005 [citado 2014 sep 2]. Disponible en: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm071693.pdf>
- Method of producing and applications of composition of hypochlorous acid [internet]. [Citado 2014 sep 2]. Disponible en: <http://www.wipo.int/portal/en/>
- Navazesh M. Methods for collecting saliva. *Ann N Y Acad Sci*. 1993 Sep; 694: 72-7.
- Llena-Puy C. The role of saliva in maintaining oral health and as an aid to diagnosis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2006 Aug; 11(5): E449-55.
- Binnie V, McHugh S, Macpherson L, Borland B, Moir K, Malik K. The validation of self-reported smoking status by analysing cotinine levels in simulated and unstimulated saliva, serum and urine. *Oral Dis*. 2004 Sep; 10(5): 287-93.
- Imfeld T. Dental erosion: definition, classification and links. *Eur J Oral Sci*. 1996 Apr; 104(2 [Pt 2]): 151-5.
- Hermont AP, Oliveira PA, Martins CC, Paiva SM, Pordeus IA, Auad SM. Tooth erosion and eating disorders: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2014 Nov; 9(11): e111123.

29. Mckenna SM, Davies KJ. The inhibition of bacterial growth by hypochlorous acid. Possible role in the bactericidal activity of phagocytes. *Biochem J.* 1988 Sep; 254(3): 685-92.
30. Robson MC, Payne WG, Ko F, Mentis M, Donati G, Shafii SM, Culverhouse S, Wang L, Khosrovi B, Najafi R, Cooper DM, Bassiri M. Hypochlorous acid as a potential wound care agent: part II. Stabilized hypochlorous acid: its role in decreasing tissue bacterial bioburden and overcoming the inhibition of infection on wound healing. *J Burns Wounds.* 2007 Apr; 6: e6.
31. Cavalcanti AL1, Ramos IA, Leite RB, da Costa Oliveira M, de Melo Menezes K, Fernandes LV, de Castro RD, Vieira FF. Endogenous pH, titratable acidity and total soluble solid content of mouthwashes available in the Brazilian market. *Eur J Dent.* 2010 Apr; 4(2): 156-9.
32. Hassan SV, Mobarak EH, Fawzi EM. The efficacy of different regimens of chlorhexidine as an antimicrobial agent for a group of Egyptians. *J Egypt Public Health Assoc.* 2008; 83(5-6): 435-50.
33. Tolentino ES, Chinellato LE, Tarzia O. Saliva and tongue coating pH before and after use of mouthwashes and relationship with parameters of halitosis. *J Appl Oral Sci.* 2011; 19(2): 90-4.

CORRESPONDENCIA

Diego Fernando Gualtero Escobar
gualterodiego@unbosque.edu.co

Diana Marcela Buitrago Ramírez
buitragodianam@unbosque.edu.co

Diego Alejandro Trujillo Pérez
diegotrujillo111@hotmail.com

Justo Calderón Robles
calderonjusto@aquilabs.com.co

Gloria Inés Lafaurie Villamil
institutouibo@gmail.com