

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE ESTOMATOLOGÍA



Substantividad y acción antibacteriana
de enjuagues bucales con distintas
concentraciones de zinc

TESIS DOCTORAL

MARGARITA TERESA BURGUERA PASCU

Granada, 2006

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE ESTOMATOLOGÍA
PROGRAMA DE DOCTORADO «INVESTIGACIÓN EN ESTOMATOLOGÍA»



Substantividad y acción antibacteriana de enjuagues bucales con distintas concentraciones de zinc

TESIS DOCTORAL

MARGARITA TERESA BURGUERA PASCU

Director: Alberto Rodríguez Archilla

Granada, 2006



Universidad de Granada



Facultad de Odontología

Alberto Rodríguez Archilla, Profesor Titular de Medicina Bucal de la Universidad de Granada, Director de la Tesis Doctoral titulada: “*Substantividad y acción antibacteriana de enjuagues bucales con distintas concentraciones de zinc*” de la que es autora Dña. **Margarita Teresa Burguera Pascu**, realizada dentro del Programa de Doctorado “*Investigación en Estomatología*” desarrollado por el Departamento de Estomatología de la Universidad de Granada.

AUTORIZA la presentación de la referida Tesis para su defensa y mantenimiento de acuerdo con lo previsto en el Real Decreto 56/2005, de 21 de enero, emitiendo el siguiente informe:

Los trabajos efectuados en la elaboración de esta memoria han sido realizados bajo mi supervisión y dirección, reuniendo las condiciones académicas necesarias para optar al Grado de Doctor.

Y para que conste y surta sus efectos en el expediente correspondiente, expido la presente en Granada a doce de enero de dos mil seis.

A handwritten signature in blue ink, consisting of several fluid, overlapping strokes.

Fdo.: Alberto Rodríguez Archilla

Quisiera expresar mi agradecimiento a:

En primer lugar, al profesor D. **Alberto Rodríguez Archilla**, mi director, por su apoyo incondicional durante todos mis estudios de postgrado. Incomparable, amigo, siempre con la palabra y el consejo preciso en el momento justo. A usted mi agradecimiento eterno. Me siento orgullosa de haber estado bajo su excelente formación académica.

A la **Universidad de Granada** por abrirme sus puertas y permitirme realizar mis estudios de Doctorado.

Un especial reconocimiento a los profesores de la Facultad de Odontología de la Universidad de Granada, Dña. **María Paloma González Rodríguez**, Dña. **Pilar Baca García** y D. **Manuel Bravo Pérez** por sus aportaciones al desarrollo de la investigación y el análisis estadístico de los datos.

A la profesora Dña. **Milena Agostinelli** y al profesor D. **Carlos Rondón** de la Universidad de Los Andes, Mérida (Venezuela) por su asesoramiento en el análisis estadístico y el estudio analítico respectivamente.

A Dña. **Francisca Castillo Pérez** (“Paqui”), técnica del laboratorio de Microbiología y a Dña. **M^a Gertrudis Gómez Villaescusa** (“Yudi”), técnica del laboratorio de investigación de la Facultad de Odontología, por su invaluable asistencia durante la realización del trabajo experimental en los laboratorios.

No quisiera olvidar al **personal del Laboratorio de Espectroscopia Atómica y Molecular de la Universidad de Los Andes**, Mérida (Venezuela) que me brindaron amablemente su tiempo y su material para la realización de parte de este trabajo.

A **mi familia**, especialmente a mis padres, incentivo para llegar siempre más lejos, gracias por su apoyo incondicional y por creer en mí. A mis hermanos por estar siempre que los he necesitado. A mis sobrinos fuente de inspiración y cariño a pesar de las distancias. A todos gracias por estar a mi lado siempre.

Finalmente, mi agradecimiento a **los pacientes** que se prestaron a la realización de este estudio.

A TODOS ELLOS, MUCHAS GRACIAS

ÍNDICE

I) INTRODUCCIÓN	11
1.- Elementos biogénicos o bioelementos	11
1.1 Generalidades	11
1.2. Clasificación de los elementos biogénicos	13
1.3. Oligoelementos, micronutrientes o elementos traza	15
1.3.1 Clasificación	15
1.3.2. Toxicidad y biocinética de los oligoelementos	17
1.3.3. Carencia de un oligoelemento	17
2.- El zinc	21
2.1 Origen y Propiedades del Zinc	21
2.2 El Zinc en los Sistemas Biológicos	21
2.3 Funciones del Zinc	24
2.3.1. El zinc en el metabolismo	24
2.3.2. El zinc en la proliferación celular y el crecimiento	24
2.3.3 El zinc y el sistema inmunológico	25
2.3.4. El zinc y el sistema endocrino	26
2.3.5. El zinc y el sistema nervioso	26
2.3.6. Otras funciones del zinc	27
2.4 El Zinc en la Cavidad Oral	29
2.4.1. El zinc como agente antimicrobiano	29
2.4.2. El zinc y la enfermedad periodontal	29
2.4.3. El zinc en la halitosis	30
2.4.4. El zinc en las glándulas salivales	30
2.4.5. El zinc y el sentido del gusto	30
2.4.6. El zinc en los dientes	30
2.4.7. El zinc como agente terapéutico en las enfermedades orales	31
2.4.8. El zinc y el cáncer oral	32
2.5 Deficiencia del Zinc	32
2.6 Toxicidad del Zinc	34
3.- La saliva	36
3.1 Generalidades de la Saliva	36
3.2 pH Salival	36
3.3 Composición Salival	36
3.4 Funciones de la Saliva	37
4.- Microbiota oral	42
4.1 Generalidades Sobre las Bacterias	42
4.2. Género <i>Streptococcus</i> . Clasificación e Identificación	42
4.3. Factores que Condicionan las Características y la Composición de la Microbiota Oral	47
5.- Agentes antisépticos orales	50
5.1. Mecanismos de Acción de los Antisépticos Orales	50
5.2. Propiedades Ideales de un Agente Antiséptico Oral	51
5.3. Principales Agentes Antisépticos de Uso Odontológico	51
5.3.1 Clorhexidina	51

5.3.2 Triclosan	52
5.3.3 Aceites Esenciales	52
5.3.4 Sales Metálicas	52
5.4 Antisépticos Orales con Zinc	53
5.5. Productos de Uso Odontológico Comercializados en España que Contienen Zinc	55
II) JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	57
III) MATERIAL Y MÉTODOS	60
1.- Descripción de la muestra	60
1.1 Estudio Preliminar	60
1.2 Estudio Definitivo	60
2.- Protocolo de recogida de datos clínicos	61
3.- Preparación de los enjuagues con distintas sales de zinc a diferentes concentraciones	62
3.1 Estudio Preliminar	62
3.2 Estudio Definitivo	62
4.- Recogida de muestras de saliva y realización de los enjuagues con diferentes sales de zinc	65
4.1 Estudio Preliminar	65
4.2 Estudio Definitivo	66
5.- Determinación de los niveles de zinc en saliva	67
5.1. Aspectos Teóricos	67
5.2. Determinación de Zinc en Saliva por EAA-AE	69
5.3. Determinación de Zinc en Saliva por EAA-Llama	78
6.- Evaluación De La Sensación Astringente	81
7.- Protocolo Microbiológico. Recuento Bacteriano (UFC/mL)	82
8.- Determinación del pH salival	85
9.- Método Estadístico	85
IV) RESULTADOS	88
1. Determinación de zinc en saliva	88
1.1 Estudio Preliminar	88
1.2 Estudio Definitivo	89
2. Sensación astringente de los enjuagues con sales de zinc	97
3. Número de Unidades Formadoras de Colonias en saliva	100
4. Determinación del pH salival	107
V) DISCUSIÓN	115
VI) CONCLUSIONES	129
VII) BIBLIOGRAFÍA ORDENADA	132
VIII) ANEXOS	149

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

°C: grados centígrados

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADP: adenosindifosfato

ARN: ácido ribonucleico

ATP: adenosintrifosfato

cm: centímetro

cols: colaboradores

DE: desviación estándar

FDHA: fosfato de dioxido-acetona

FGA: fosfogliceraldehido

g: gramo

HCO₃⁻: ión bicarbonato

H₂CO₃: ácido carbónico

Kg: kilogramo

L: litro

mg: miligramo

min: minuto

mL: mililitro

mM: milimolar

mΩ: miliohmio

μ: micra

μg: microgramo

μL: microlitro

μM: micromolar

NAD⁺: nicotinamida adenindinucleótido

NADH: dihidronicotinamida

adenindinucleótido

ng: nanogramo

NS: no significativo

pg: picogramo

PRG: glicoproteínas ricas en prolina

PRPs: proteínas secretorias ricas en

prolina

PTS: fosfotransferasa

Sig: significación

SLPI: Proteasa inhibidora de leucocitos

secretores

UFC/mL: unidades formadoras de

colonias por mililitro

VEGh: proteína salival VEG

VIH: virus de inmunodeficiencia

humana

VSC: compuestos sulfurosos volátiles

X: media

Zn²⁺: ión zinc

INTRODUCCIÓN

1. ELEMENTOS BIOGÉNESICOS o BIOELEMENTOS

1.1. GENERALIDADES

Todos los seres vivos están constituidos, cualitativa y cuantitativamente, por elementos químicos que se encuentran en la corteza terrestre. Esto indica que la vida se ha desarrollado a partir de elementos con propiedades físico-químicas acorde con los procesos químicos que se están llevando a cabo en los seres vivos.

Los elementos biogénicos o bioelementos (del griego *bios=vida*, y *génesis=origen*) son aquellos elementos químicos que forman parte de la materia viviente^{1,2}. En los seres vivos se pueden encontrar alrededor de setenta elementos químicos diferentes, aunque no todos son indispensables para la vida, ni comunes a todos ellos. En la figura 1 se muestra la composición química aproximada de un hombre de 70 Kg. de peso. La tabla 1 esquematiza la composición de los seres vivos.

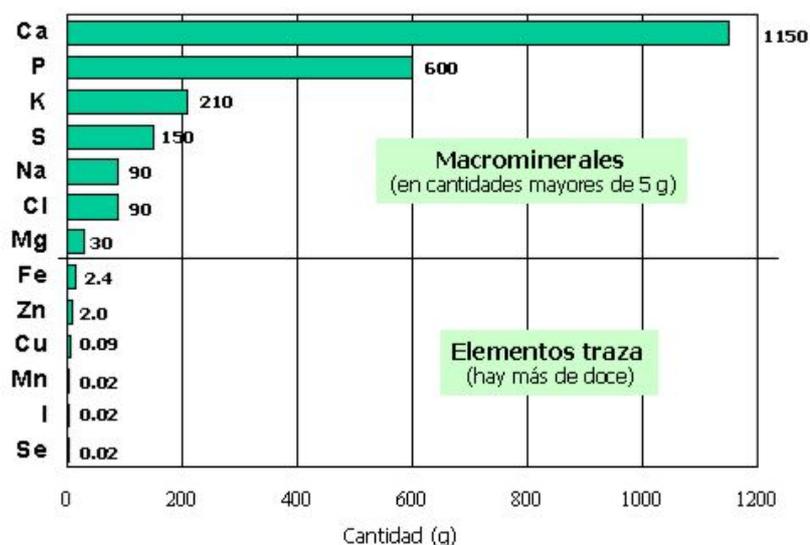
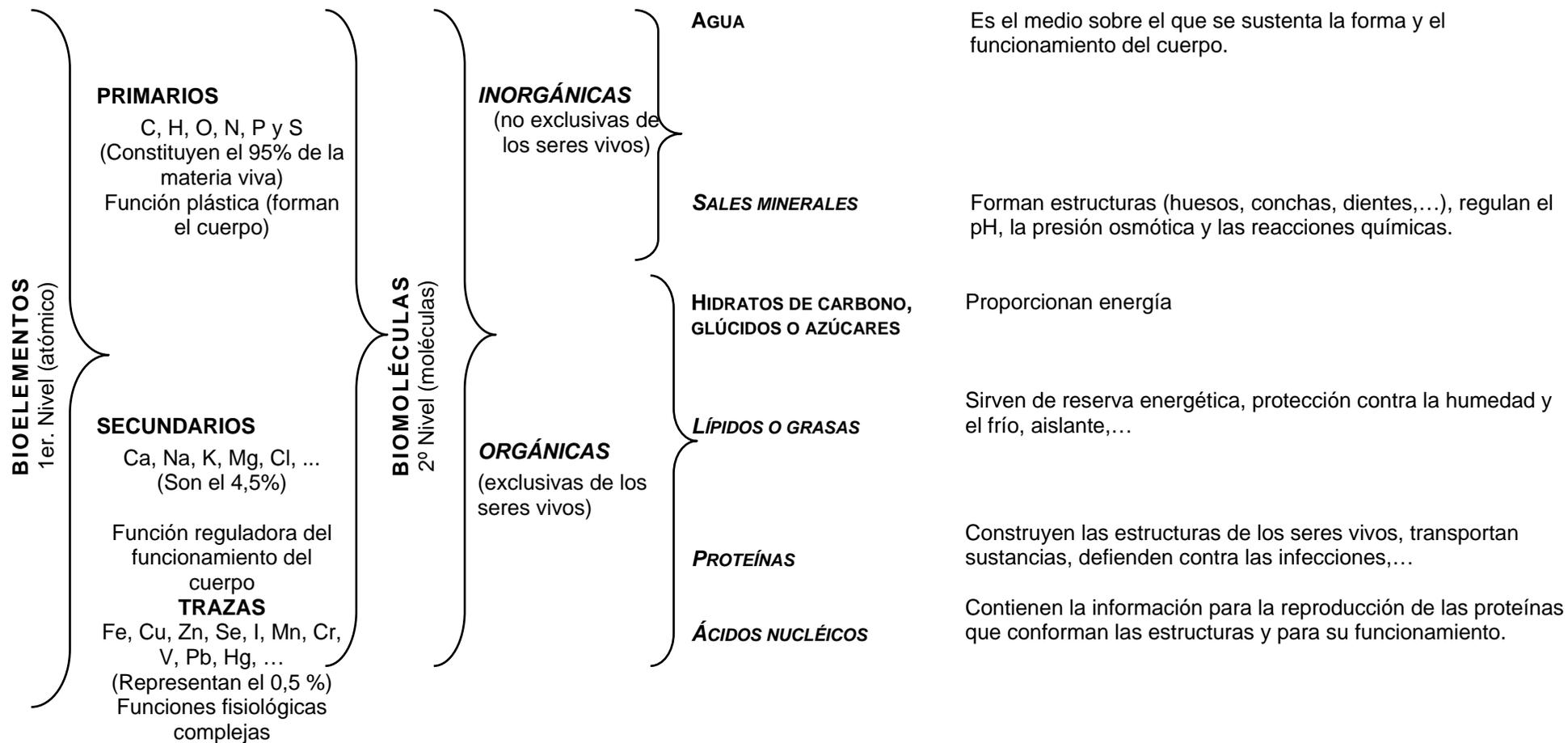


Figura 1. Contenido de minerales en un adulto de 70 Kg. de peso.

¹ Baran EJ. Química Bioinorgánica. Madrid: Editorial McGraw-Hill Interamericana; 1994.

² Alarcón OM. Elementos Biogénicos. 2ª ed. Mérida: Talleres Gráficos Universidad de los Andes; 2000.

Tabla 1.- Composición química de los seres vivos



1.2. CLASIFICACIÓN DE LOS ELEMENTOS BIOGÉNICOS

Los bioelementos, según su abundancia en los seres vivos, se clasifican en tres grandes grupos (tabla 1 y figura 2):

1	H 1 Hidrógeno																	He Helio						
2	Li Sodio	Be Berilio																	B 5 Boro	C 6 Carbono	N 7 Nitrógeno	O 8 Oxígeno	F 9 Fluor	Ne Neón
3	Na 11 Sodio	Mg 12 Magnesio																	Al 13 Aluminio	Si 14 Silicio	P 15 Fósforo	S 16 Azufre	Cl 17 Cloro	Ar Argón
4	K 19 Potasio	Ca 20 Calcio	Sc Escandio	Ti Titanio	V 23 Vanadio	Cr Cromo	Mn 25 Manganeso	Fe 26 Hierro	Co 27 Cobalto	Ni Níquel	Cu 29 Cobre	Zn 30 Cinc	Ga Gallio	Ge Germanio	As Arsénico	Se Selenio	Br Bromo	Kr Criptón						
5	Rb Rubidio	Sr Estroncio	Yb Itrio	Zr Circonio	Nb Gallio	Mo 42 Molibdeno	Tc Tecnecio	Ru Rutenio	Rd Rodio	Pd Paladio	Ag Plata	Cd Cadmio	In Indio	Sn Estanho	Sb Antimonio	Te Telurio	I 53 Yodo	Xe Xenón						
6	Cs Cesio	Ba Bario	La Lantano	Hf Hafnio	Ta Tántalo	W Volframio	Re Renio	Os Osmio	Ir Iridio	Pt Platino	Au Oro	Hg Mercurio	Tl Talo	Pb Plomo	Bi Bismuto	Po Polonio	At Astatino	Rn Radón						
7	Fr Francio	Ra Radio	Ac Actinio																					

Bioelementos secundarios en todos los organismos
 Bioelementos secundarios en algunos organismos
 Bioelementos primarios

Figura 2. Tabla periódica de los elementos químicos.

- **Bioelementos primarios o principales.** Son cuatro: el carbono (C), el hidrógeno (H), el oxígeno (O) y el nitrógeno (N). Son los elementos mayoritarios de la materia viva y constituyen el 95% de la masa total de los seres vivos.
- **Bioelementos secundarios.** Dentro de este grupo se incluyen: el azufre (S), el fósforo (P), el magnesio (Mg), el calcio (Ca), el sodio (Na), el potasio (K) y el cloro (Cl). Se encuentran en una proporción del 4,5% formando parte de todos los seres vivos.
- **Oligoelementos, micronutrientes o elementos traza.** Son un conjunto de elementos químicos que se encuentran en el organismo en cantidades muy pequeñas (mg/Kg o µg/L). Sin embargo, muchos de ellos son nutrientes esenciales ya que desempeñan una serie de

funciones indispensables para mantener la vida como el crecimiento o la reproducción normal de las diferentes especies, incluyendo al hombre³. Hasta la fecha, se han aislado unos 60 oligoelementos en los seres vivos, aunque únicamente 14 de ellos pueden considerarse comunes a todas las especies. Estos elementos son: el hierro (Fe), el manganeso (Mn), el cobre (Cu), el zinc (Zn), el flúor (F), el yodo (I), el boro (B), el silicio (Si), el vanadio (V), el cromo (Cr), el cobalto (Co), el selenio (Se), el litio (Li), el molibdeno (Mo) y el estaño (Sn)⁴. Algunas de las características de éstos se describen en la tabla 2.

Tabla 2. Principales características de algunos oligoelementos.

Hierro	Fundamental para la síntesis de clorofila, catalizador en reacciones químicas y componente de los citocromos que intervienen en la respiración celular, y de la hemoglobina que interviene en el transporte de oxígeno.
Manganeso	Es necesario para los huesos y juega un papel importante en las funciones reproductoras. Interviene en la fotólisis del agua, durante el proceso de fotosíntesis en las plantas.
Yodo	Necesario para la síntesis de la tiroxina, hormona que interviene en el metabolismo, que influyen fundamentalmente en el crecimiento y maduración del organismo, y afecta sobre todo a la piel, el pelo, las uñas, los dientes y los huesos.
Flúor	Previene la aparición de caries al mantener el esmalte de los dientes en buenas condiciones, ayuda a frenar la aparición de osteoporosis y tiene incidencia en el crecimiento.
Cobalto	Es un componente esencial de la vitamina B ₁₂ . Contribuye a reducir la presión arterial y a dilatar los vasos sanguíneos, y favorece la fijación de la glucosa en los tejidos.
Silicio	Proporciona resistencia al tejido conjuntivo, endurece tejidos vegetales como en las gramíneas.
Cromo	Potencia la acción de la insulina y favorece la entrada de glucosa a las células.
Zinc	Interviene en el funcionamiento de ciertas hormonas y desempeña un importante papel en el crecimiento, la producción de insulina, las funciones psicológicas, la formación de espermatozoides y la defensa del sistema inmunitario.
Litio	Actúa sobre los neurotransmisores y la permeabilidad celular. En dosis adecuada puede prevenir estados de depresión.
Molibdeno	Forma parte de las enzimas vegetales que actúan en la reducción de los nitratos por parte de las plantas.

³ Herrera E, editor. Bioquímica. Aspectos estructurales y vías metabólicas. 2ª ed. Mexico DF: Interamericana McGraw-Hill; 1991.

⁴ Underwood EJ. Trace elements in human and animal nutrition. 4ª ed. New York: Academic Press; 1997.

1.3. OLIGOELEMENTOS, MICRONUTRIENTES o ELEMENTOS TRAZA

1.3.1 Clasificación

Los oligoelementos se pueden clasificar atendiendo a diversos criterios.

→ Según su frecuencia en el organismo, se clasifican en:

- **Invariables**: son aquellos elementos que están presentes en todos los seres vivos, en concentraciones muy bajas (menos del 0,005 % del peso corporal). Dentro de este grupo destacan: el zinc (Zn), el cobre (Cu), el hierro (Fe), el manganeso (Mn), el yodo (I), el selenio (Se), etc.
- **Variables**, son aquellos elementos que se detectan en unos organismos y en otros no. Sus funciones todavía no son bien conocidas. Se encuentran incluidos en este grupo: el litio (Li), el rubidio (Rb), el germanio (Ge), el estaño (Sn), etc.

→ Según su significación biológica, se clasifican en:

- **Esenciales**. Son los elementos necesarios para mantener la vida. Mertz⁵ señaló que cuando su aporte es deficiente determina invariablemente la disminución de una función de óptima a subóptima. Si se administra el elemento en cantidades fisiológicas y/o adecuadas previene o cura esta alteración. Algunos de estos elementos son: el zinc (Zn), el cobre (Cu), el hierro (Fe), el manganeso (Mn), el yodo (I), el molibdeno (Mo), el fósforo (P), el níquel (Ni), el estaño (Sn), el selenio (Se), el silicio (Si) y el vanadio (V) entre otros.

⁵ Mertz W. The essential trace elements. Science 1981; 213: 1132-38.

Cotizas⁶ indicó que un elemento traza puede ser considerado esencial si cumple los siguientes requisitos:

- Debe estar presente en todos los tejidos sanos de todos los organismos vivos.
 - Su concentración en los tejidos debe ser relativamente constante.
 - Su carencia produce alteraciones ultraestructurales y fisiológicas similares (y/o reproducibles) en las diferentes especies; es decir, que las alteraciones determinadas por la carencia del elemento son independientes de la especie estudiada.
 - Su administración, en cantidades adecuadas, debe curar o prevenir estas alteraciones.
 - Las alteraciones o lesiones producidas por la carencia se acompañan de cambios bioquímicos pertinentes y específicos.
 - Estos cambios bioquímicos se deben evitar o corregir, cuando la carencia se previene o se trata.
-
- **Posibles esenciales.** Son aquellos elementos cuyas concentraciones y/o funciones todavía no están claramente establecidas, es el caso del cromo (Cr), el níquel (Ni), el arsénico (As) o el vanadio (V); otros que sólo son esenciales para algunas especies como el boro (B) o el bromo (Br) y algunos cuya esencialidad aún es objeto de controversia, como es el caso del litio (Li), el cadmio (Cd) o el estaño (Sn).

 - **No esenciales.** Son elementos que se encuentran en los tejidos vivos en concentraciones variables. Se adquieren del medio ambiente en cantidades que dependen de su concentración en el

⁶ Coitzas G. Importance of trace substances in environmental health as exemplified by manganese. 1st Ann Conf Trace Subst Environ Health. Columbia (USA); 1997.

mismo, de la intensidad y la duración del contacto. Por tanto, son un reflejo de la interacción del organismo vivo con el medio ambiente. Entre éstos cabe mencionar: el aluminio (Al), el antimonio (Sb), el mercurio (Hg), el germanio (Ge), el rubidio (Rb), la plata (Ag), el oro (Au), el plomo (Pb), el bismuto (Bi), el titanio (Ti) y el circonio (Zr).

- **Tóxicos.** La catalogación de algunos oligoelementos como el plomo (Pb), el cadmio (Cd) o el mercurio (Hg) como tóxicos se justifica para algunos por sus propiedades dañinas o potencialmente perjudiciales a concentraciones relativamente bajas⁷.

1.3.2. Toxicidad y biocinética de los oligoelementos

Todos los elementos traza son tóxicos -o potencialmente tóxicos- si se ingieren o se inhalan en cantidades muy elevadas durante largos períodos de tiempo⁸. La toxicidad de un metal o de sus compuestos, depende de las propiedades físicas y químicas del metal, las cuales difieren de acuerdo a su posición en la tabla periódica y de su carácter electroquímico. En el caso que un elemento traza se encuentre en exceso en el organismo, se pueden producir:

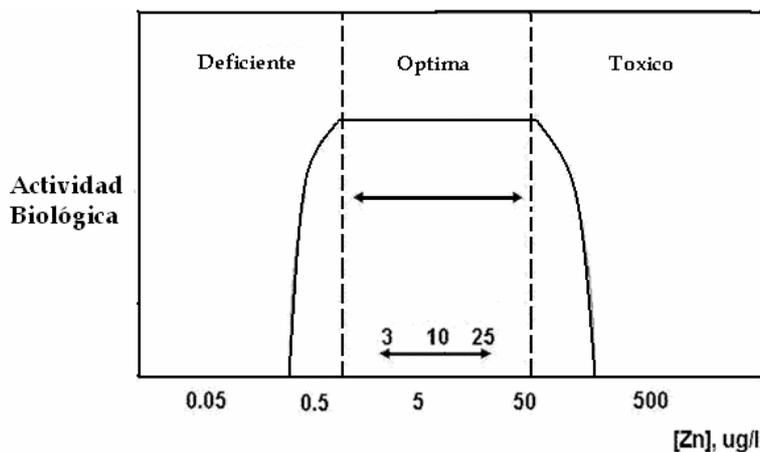
- alteraciones en la permeabilidad de las membranas celulares y de los orgánoides subcelulares
- alteraciones en la estructura y en la función de los ácidos nucleicos y de las proteínas
- liberación de sustancias, como la histamina
- síntesis incrementada de ciertas hormonas
- cambios en las actividades enzimáticas tisulares

⁷ Luckey TD, Venugopal B, editors. Physiological and Chemical Basis for Metal Toxicity: Metal Toxicity in Mammals. Vol. 1. New York: Plenum Press; 1997.

⁸ Gaetke LM, Chow CK. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. Toxicology 2003; 189: 147-63.

- cambios en la composición electrolítica de los diferentes espacios corporales.

El efecto de dosis-dependencia, conocido desde hace años, se presenta en forma de una curva con dos máximos^{9,10} (gráfica 1).



Gráfica 1. Curva dosis-dependencia del zinc.

La primera parte de la curva, que se incrementa, al aumentar las concentraciones del elemento traza hasta alcanzar una meseta, expresa la acción biológica del elemento. Por su parte, la meseta indica la suplementación óptima y la función normal; su ancho está determinado por la capacidad homeostática del organismo. Al aumentar más las dosis se produce la acción farmacológica del elemento traza. En esta fase, el oligoelemento actúa como un fármaco estimulando o inhibiendo una función determinada. A dosis aún más elevadas aparecen los signos y los síntomas de la intoxicación, expresión de la acción toxicológica o tóxica del micronutriente. Las dosis a las cuales estas diferentes fases se hacen aparentes, así como el ancho de la meseta, varían ampliamente entre los diferentes micronutrientes y dependen de la presencia de otros elementos o compuestos en el organismo y de la dieta que se consume.

⁹ Alarcón OM. Elementos Biogénicos. 2ª ed. Mérida: Talleres Gráficos Universidad de los Andes; 2000.

¹⁰ Slikker W Jr, Andersen ME, Bogdanffy MS, et al. Dose-dependent transitions in mechanisms of toxicity: case studies. Toxicol Appl Pharmacol 2004; 201: 226-94.

El organismo posee poderosos mecanismos que mantienen constante la meseta de función óptima en la curva de dosis-respuesta biológica, a pesar de los amplios rangos de variación alimentaria y ambiental de estos elementos¹¹. Estos mecanismos se ponen en juego cuando la capacidad reguladora de los procesos de absorción y/o de excreción de los elementos traza ha sido vencida. En unión a los mecanismos característicos de regulación del medio interno, la velocidad con que se eliminan los elementos traza del organismo, representa un potente método de monitoreo del control homeostático.

Es un hecho conocido que tanto los aportes carenciales como los excesivos de los elementos traza pueden producir alteraciones metabólicas. Es lógico suponer que estas alteraciones preceden a la aparición de los trastornos estructurales o funcionales celulares y que ellas pudieran ser, en un momento determinado, los únicos indicadores reconocibles de la deficiencia de los elementos traza.

1.3.3. Carencia de un oligoelemento

Se pueden distinguir cuatro fases o períodos en el desarrollo de la carencia de un elemento traza:

- La fase de agotamiento inicial
- La fase de deficiencia compensada
- La fase de deficiencia metabólica
- La fase de deficiencia clínica

La fase de agotamiento inicial, determinada por el ingreso inadecuado de un elemento traza, se caracteriza por los cambios en su metabolismo. Los mecanismos homeostáticos, en este momento, aumentan la eficiencia de la absorción y la conservación del elemento traza, controlando su excreción. Esta etapa se puede acompañar de un lento agotamiento de las reservas corporales del elemento traza y, en menor grado, de una disminución en la saturación de

¹¹ Nelson DL, Cox MM, Cuchillo CM, editores. Lehninger: Principios de Bioquímica. 3ª ed. Barcelona: Ed. Omega; 2001.

los transportadores sanguíneos específicos, aunque no constituye una carencia en sí misma.

La fase de deficiencia compensada se caracteriza por el deterioro de las funciones bioquímicas que dependen del oligoelemento, pero sin ningún cambio cuantificable en el nivel y en el metabolismo de los sustratos influenciados por estas funciones. Por ejemplo, los neozelandeses que residen en ambientes pobres en selenio, presentan una actividad reducida de la enzima glutatión-peroxidasa sérica, pero no muestran signos perceptibles de daño oxidativo debido a otras funciones que no dependen del selenio¹².

La fase de deficiencia metabólica, que corresponde a la forma descompensada de la carencia, se caracteriza por cambios notables en los sustratos y en las reacciones metabólicas dependientes de los elementos traza¹³. Es un verdadero peligro para el organismo. Incluye la aparición de enfermedades aparentemente no relacionadas con los disturbios metabólicos preexistentes. Por ejemplo, la carencia de cromo provoca la aparición de concentraciones elevadas de insulina circulante e intolerancia a la glucosa, considerados como factores de riesgo independientes para las enfermedades cardiovasculares; mientras que la carencia de selenio en estas etapas se considera un factor de riesgo para la aparición del cáncer. La carencia de cobre es un factor de riesgo en muchos aspectos de las enfermedades cardiovasculares y otorrinolaringológicas.

Finalmente, la fase de deficiencia clínica se caracteriza por el empeoramiento de los trastornos metabólicos y por la aparición de lesiones estructurales y funcionales que determinan una enfermedad grave¹⁴.

¹² Thomson CD, Robinson MF. Selenium in human health and disease with emphasis on those aspects peculiar to New Zealand. *Am J Clin Nutr* 1980; 33: 303-23.

¹³ Keen CL, Hanna LA, Lanoue L, Uriu-Adams JY, Rucker RB, Clegg MS. Developmental consequences of trace mineral deficiencies in rodents: acute and long-term effects. *J Nutr* 2003; 133: 1477S-80S.

¹⁴ Kolpakova AF. Role of environmental pollution with heavy metals in chronic pulmonary diseases pathogenesis in north regions. *Med Tr Prom Ekol* 2004; 56: 14-9.

2. EL ZINC

2.1. ORIGEN Y PROPIEDADES DEL ZINC

El nombre del elemento zinc proviene del alemán antiguo “*zink*” que significa de “origen oscuro”. Fue reconocido como elemento químico en 1746, cuando el químico alemán Andrés Sigismund Marggraf lo aisló en forma pura calentando la calamina, un mineral mezcla de silicato y carbonato de zinc, con carbón de leña^{15,16}.

El zinc es un elemento metálico brillante de color blanco azulado, cuyos puntos de fusión y de ebullición son 419,9°C y 907°C, respectivamente. Es el último elemento de la primera serie de los metales de transición y está ubicado en la tabla periódica en el período 4, grupo II-B. Su símbolo químico es Zn, su número atómico 30 y su peso atómico 65,37 g/mol. Como consecuencia de su estructura electrónica, el único estado de oxidación del Zn es +2, de manera que no participa en reacciones de oxido-reducción. Sus compuestos químicos más comunes son: el óxido (ZnO); los haluros (ZnX₂ donde X = Cl, Br, I) y sales como el nitrato [Zn(NO₃)₂]; el sulfato (Zn SO₄) o el acetato [Zn(CH₃COO)₂]. Además, tiene una pronunciada tendencia a formar combinaciones complejas aniónicas y catiónicas con otros elementos.

2.2. EL ZINC EN LOS SISTEMAS BIOLÓGICOS

El zinc es esencial para el funcionamiento normal de los organismos vivos aunque su requerimiento diario sea escaso. El aporte del zinc al organismo depende de una dieta equilibrada. Los alimentos con un alto contenido en proteínas son ricos en zinc, mientras que las dietas ricas en carbohidratos poseen menores cantidades de este metal^{17,18,19}. Las mejores

¹⁵ Cotton FA, Wilkinson G. Fundamentos de Química Inorgánica. 4º ed. México D.F.: Ed. Limusa SA; 1986.

¹⁶ Coleman J. Zinc proteins: enzymes, storage proteins, transcription factors, and replication proteins. Biochem J 1992; 61: 897-946.

¹⁷ Matseshe J, Philips S, Malagelada J, McCall J. Recovery of dietary iron and zinc from the proximal intestine of healthy man: studies of different meals and supplements Am J Clin Nutr 1980; 33: 1946-53.

fuentes de zinc son la carne, los huevos, la leche, los mariscos, el pescado y las legumbres^{20,21}. Un adulto sano de aproximadamente 70 Kg. de peso contiene entre 1,5 y 3,0 gramos de Zn.

Según la Sociedad Española de Oftamología, un adulto requiere un aporte diario de 15 mg. de zinc²². Para el Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos (NIH)²³, el requerimiento diario de zinc varía según la edad, el sexo, el peso y la altura del individuo (tabla 3).

Tabla 3. Aporte dietético de zinc recomendado para la población estadounidense

Categoría	Edad (años)	Peso (Kg)	Altura (cm.)	Aporte dietético de zinc (mg Zn/día)
Recién nacidos	0-0.5	6	60	5
	0.5-1	9	71	5
Niños	1-3	13	90	10
	4-6	20	112	10
	7-10	28	132	10
Hombres	11-14	45	157	15
	15-18	66	176	15
	19-24	72	177	15
	25-50	79	176	15
	> 51	77	173	15
Mujeres	11-14	46	157	12
	15-18	55	163	12
	19-24	58	164	12
	25-50	63	163	12
	> 51	65	160	12
Embarazadas				15
Lactancia	1 ^{er} semestre			19
	2 ^o semestre			16

¹⁸ Torres M, Rodríguez A, Saura F. Effects of dietary fiber and phytic acid on mineral availability. Crit Rev Food Sci Nutr 1991; 30: 1-22.

¹⁹ Camara F, Amaro MA. Nutritional aspect of zinc availability. Int J Food Sci Nutr 2003; 54 : 143-51.

²⁰ Moser-Veillon P. Zinc: consumption patterns and dietary recommendations J Am Diet Assoc 1990; 90: 1089-94.

²¹ Bury NR, Walker PA, Glover CN. Nutritive metal uptake in teleost fish. J Exp Biol 2003; 206: 11-23.

²² García L. Suplementos vitamínicos con zinc son útiles en la degeneración macular asociada a la edad. Arch Soc Esp Oftalmol 2002; 77: 57-8.

²³ Moizé Arcone V. Dietas con Modificación de la Textura y la Consistencia. Dietas Progresivas. En: Salas-Salvadó J, Bonada I, Trallero Casañas R, Saló I, Solá ME, editores. Nutrición y Dietética Clínica. Barcelona: Ediciones Doyma; 2000. p. 287-325.

Tras la ingestión y digestión de los alimentos, se libera zinc a la luz intestinal, y se realiza su absorción a nivel del intestino delgado, específicamente en el yeyuno. Cierta porción se absorbe a través de difusión pasiva, y otra parte se hace a través de un mecanismo de transporte activo. El metabolismo del zinc, se puede ver afectado por un trastorno hereditario, la acrodermatitis enteropática²⁴.

En el organismo, el zinc se distribuye de la siguiente forma: músculos (60%), huesos (30%), piel (6%) y el resto distribuido en los demás compartimientos corporales. Las concentraciones más altas se encuentran en la próstata, el hígado, el riñón, la retina y en el esperma²⁵. En menor cantidad puede encontrarse en las uñas, el cabello o la orina²⁶.

El zinc se elimina principalmente por las heces, y la cantidad excretada se relaciona directamente con su contenido en la dieta; el zinc fecal comprende el zinc dietético no absorbido, el zinc de las células mucosas que se descaman y el zinc de los jugos intestinales ricos en el metal, especialmente el jugo pancreático. En los adultos normales, el contenido del metal en esas secreciones es de aproximadamente 1 µg/mL. El zinc se excreta en la bilis en cantidades insignificantes. La excreción urinaria de zinc se denomina zincuria. Esta excreción es muy constante y no depende del aporte del micronutriente al organismo. La zincuria oscila entre 400 y 600 µg de Zn en 24 horas. El mecanismo que rige la excreción renal del zinc no es bien conocido²⁷. Una pequeña fracción del zinc se pierde por la descamación de la piel. La excreción

²⁴ Sandstrom B, Cederblad A, Lindblad BS, Lonnerdal B. Acrodermatitis enteropathica, zinc metabolism, copper status, and immune function. *Arch Pediatr Adolesc Med* 1994; 148: 980-5.

²⁵ Jackson M. Physiology of zinc. General aspects. In: Mills CF. editor. *Zinc in human biology*. London: Springer-Verlag; 1989. p. 61-89.

²⁶ Chicharro JL, Serrano V, Urena R, Gutierrez AM, Carvajal A, Fernandez- Hernando P, Lucia A. Trace elements and electrolytes in human resting mixed saliva after exercise. *Br J Sports Med* 1999; 33: 204-7.

²⁷ Cousins R, Hempe J. Zinc. En: Brown ML, Filer LJ, Guthrie HA, Levander OA, Mc Cormick DB, Olson RE, editores. *Conocimientos actuales sobre nutrición*. 6ª ed. esp. Washinton DC: OPS; 1991. p. 327-49.

de zinc a través del sudor normalmente alcanza 1,5 mg/día, incrementándose en los climas calientes²⁸.

2.3. FUNCIONES DEL ZINC

2.3.1. El zinc en el metabolismo

El zinc actúa a nivel metabólico como²⁹:

- Elemento estructural de numerosas enzimas^{30,31,32}.
- Estabilizador de estructuras moleculares a nivel de los constituyentes subcelulares y sus membranas.
- Parte fundamental de numerosas metaloenzimas y activador de otras, como la fosfatasa alcalina, la alcohol deshidrogenasa, la anhidrasa carbónica, la deshidrogenasa glutámica, la carboxipeptidasa, la ADN y la ARN polimerasa.
- Esencial en la transmisión y traslación de polinucleótidos y por lo tanto, en el proceso de expresión genética.
- Estabilizador de membranas³³.

2.3.2. El zinc en la proliferación celular y el crecimiento

El papel que juega el zinc en el crecimiento y proliferación celular es tan importante, que la inhibición del crecimiento se considera un síntoma del déficit de zinc³⁴. Trabajos realizados en animales de experimentación, han mostrado que las dietas deficitarias en zinc, mantenían a los animales vivos, pero

²⁸ Hambidge K, Hambidge C, Jacobs M, Baum D. A mechanism for regulation of insulin release in hypoxia. *Pediatr Res* 1972; 6: 868-71.

²⁹ Hambridge M. Human zinc deficiency. *J Nutr* 2000; 130: 1344S-49S.

³⁰ McCall KA, Huang Ch-Ch, Fierke CA. Function and mechanism of zinc metalloenzymes. *J Nutr* 2000; 130: 1437S-46S.

³¹ Blencowe DK, Morby AP. Zn(II) metabolism in prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev* 2003; 27: 291-311.

³² Fuchs O, Babusiak M, Vyoral D, Petrak J. Role of zinc in eukaryotic cells, zinc transporters and zinc-containing proteins. Review article. *Sb Lek* 2003; 104:157-70.

³³ Frederickson CJ, Suh SW, Silva D, Thompson RB. Importance of zinc in the central nervous system: the zinc containing neuron. *J Nutr* 2000; 130: 1471S-83S.

³⁴ Klotz LO, Kroncke KD, Buchczyk DP, Sies H. Role of copper, zinc, selenium and tellurium in the cellular defense against oxidative and nitrosative stress. *J Nutr* 2003; 133:1448S-51S.

detenían su crecimiento. Quizá el aspecto más interesante de estas experiencias es que no era la falta de aporte calórico lo que impedía el crecimiento, ya que los animales recibían alimento, sino que el responsable era el déficit específico de zinc³⁵. Este oligoelemento es esencial para el crecimiento fetal y su desarrollo y para la producción de leche materna durante la lactancia^{36,37,38}. Así mismo, participa en la transducción de la señal mitogénica³⁹.

Esto permite inferir la importancia clínica que el aporte adecuado de zinc tiene en los siguientes casos:

- Crecimiento adecuado y
- Procesos de reparación de tejidos, tales como:
 - Lesiones en las mucosas⁴⁰.
 - Cicatrización de heridas.
 - Quemaduras.
 - Formación de callos óseos en fracturas.
 - Lesiones en la piel tales como acné^{41,42}.
 - Reparaciones tisulares postquirúrgicas tales como injertos de piel, cierres de fístulas enterales, etc.

2.3.3 El zinc y el sistema inmunológico

El zinc juega un papel de gran importancia en el correcto funcionamiento del sistema inmune, tanto en la inmunidad humoral como en la celular^{43,44,45,46}.

³⁵ MacDonald RS. The role of zinc in growth and cell proliferation. *J Nutr* 2000; 130: 1500S-8S.

³⁶ Henkin RI. Trace metals in endocrinology. *Med Clin North Am* 1976; 60: 797-801.

³⁷ Dicks D, Rojhami A, Cossack ZT. The effect of growth hormone treatment on growth in zinc deficient rats. *Nutr Res* 1993; 13: 701-13.

³⁸ Elmstahl S, Gullberg B, Janson L, Johnell O, Elmstahl B. Increased incidence of fractures in middle-aged and elderly men with low intakes of phosphorus and zinc. *Osteoporosis Int* 1998; 8: 333-40.

³⁹ Hansonn A. Extracellular zinc ions induce mitogen-activated protein kinase activity and protein tyrosine phosphorylation in bombesin-sensitive Swiss 3T3 fibroblasts. *Arch Biochem Biophys* 1996; 328: 233-38.

⁴⁰ Walker CF, Black RE. Zinc and the risk for infectious disease. *Ann Rev Nutr* 2004; 24: 255-75.

⁴¹ Dreno B. Topical antibacterial therapy for acne vulgaris. *Drugs* 2004; 64: 2389-97.

⁴² Stephan F, Revuz J. Zinc salts in dermatology. *Ann Dermatol Venereol* 2004; 131: 455-60.

⁴³ Ibs KH, Rink L. Zinc-altered immune function. *J Nutr* 2003; 133: 1452S-6S.

⁴⁴ Ferencik M, Ebringer L. Modulatory effects of selenium and zinc on the immune system. *Folia Microbiol (Praha)* 2003; 48:417-26.

Un ejemplo lo encontramos en la acrodermatitis enteropática que se caracteriza por un déficit celular de zinc⁴⁷.

2.3.4. El zinc y el sistema endocrino

A este nivel, el zinc juega un papel fundamental en⁴⁸ :

- la formación del complejo Zn-insulina, que permite la acción de la insulina en el páncreas y sobre la membrana de los hepatocitos
- la activación de los receptores de membrana para la hormona T3⁴⁹
- la producción de testosterona y otras hormonas sexuales, involucradas tanto en la formación de tejido como en la producción de espermatozoides^{50,51}
- la protección contra la hiperplasia prostática, ya que la próstata es uno de los tejidos con mayor concentración de zinc en el cuerpo humano^{52,53,54}.

2.3.5. El zinc y el sistema nervioso

Se han encontrado evidencias científicas que relacionan este elemento traza con las funciones nerviosas:

⁴⁵ Rivera MT, De Souza AP, Araujo-Jorge TC, De Castro SL, Vanderpas J. Trace elements, innate immune response and parasites. *Clin Chem Lab Med* 2003; 41:1020-5.

⁴⁶ Bogden JD. Influence of zinc on immunity in the elderly. *J Nutr Health Aging* 2004; 8:48-54.

⁴⁷ Sandstrom B, Cederblad A, Lindblad BS, Lonnerdal B. Acrodermatitis enteropathica, zinc metabolism, copper status, and immune function. *Arch Pediatr Adolesc Med* 1994; 148: 980-5.

⁴⁸ Neve J. Clinical implications of trace elements in endocrinology. *Biol Trace Elem Res* 1992; 32: 173-185.

⁴⁹ Freake HC, Govoni KE, Guda K, Huang C, Zinn SA. Actions and Interactions of Thyroid Hormone and Zinc Status in Growing Rats. *J Nutr* 2001; 131: 1135-41.

⁵⁰ Stallard L, Reeves PG. Zinc Deficiency in adult rats reduces the relative abundance of testis-specific angiotensin-converting enzyme mRNA. *J Nutr* 1997; 127: 25-9.

⁵¹ Hammond GL, Avvakumov GV, Muller YA. Structure/function analyses of human sex hormone-binding globulin: effects of zinc on steroid-binding specificity. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2003; 5:195-200.

⁵² Liang JY, Liu YY, Zou J, Franklin RB, Costello LC, Feng P. Inhibitory effect of zinc on human prostatic carcinoma cell growth. *Prostate* 1999; 40: 200-7.

⁵³ Feng P, Liang JY, Li TL, Guan ZX, Zou J, Franklin R, Costello LC, Zinc induces mitochondria apoptosis in prostate cells. *Mol Urol* 2000; 4: 31-6.

⁵⁴ Moyad MA. Zinc for prostate disease and other conditions: a little evidence, a lot of hype, and a significant potential problem. *Urol Nurs* 2004; 24: 49-52.

- el zinc es necesario para la producción de neurotransmisores al participar en el metabolismo de la dopamina^{55,56}
- las neuronas glutamatérgicas distribuidas por la corteza cerebral cuentan como principal neurotransmisor con el glutamato, rico en zinc, teniendo estrecha relación con las funciones cognitiva y de memoria.
- los denominados “*dedos proteicos de zinc*” juegan un papel muy importante en la síntesis de proteínas específicas del sistema nervioso, y se asocian con los procesos de aprendizaje y memoria^{57,58}.

2.3.6. Otras funciones del zinc

- Acción antioxidante: protege las células contra los daños causados por los radicales libres^{59,60}.
- Efecto sobre el gusto, el olfato y la visión. El zinc es necesario para la producción de una enzima salival, la anhidrasa carbónica. Cuando hay déficit de esta enzima, las papilas gustativas sufren un daño oxidativo, produciéndose una alteración del gusto⁶¹ y del olfato⁶². También, cumple un papel decisivo en el metabolismo de la vitamina A que se almacena en el hígado. Su transporte hacia el ojo lo realiza la enzima transportadora de retinol, que requiere de zinc para su síntesis. Al

⁵⁵ Arnold LE, Pinkham SM, Votolato N. Does zinc moderate essential fatty acid and amphetamine treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder? J Child Adolesc Psychopharmacol 2000; 10: 111-17.

⁵⁶ Kordas K, Stoltzfus RJ. New evidence of iron and zinc interplay at the enterocyte and neural tissues. J Nutr 2004; 134: 1295-8.

⁵⁷ Takeda A. Movement of zinc and its functional significance in the brain. Brain Res Rev 2000; 34: 137-48

⁵⁸ Tamura T, Konishi Y. Mechanisms of transcriptional regulation and neural gene expression. Neurochem Int 1996; 29: 573-81.

⁵⁹ Hambridge M. Human zinc deficiency. J Nutr 2000; 130: 1344S-49S

⁶⁰ Stehbens WE. Oxidative stress, toxic hepatitis, and antioxidants with particular emphasis on zinc. Exp Mol Pathol 2003; 75: 265-76.

⁶¹ Watanabe M, Asatsuma M, Ikui A, Ikeda M, Yamada Y, Nombra S, Igarashi A. Measurements of several metallic elements and matrix metalloproteinases (mmps) in saliva from patients with taste disorder. Chem Senses 2005; 30: 121-125.

⁶² Henkin RI, Martin BM, Agarwal RP. Decreased parotid saliva gustin/carbonic anhydrase VI secretion: an enzyme disorder manifested by gustatory and olfactory dysfunction. Am J Med Sci 1999; 318: 380-91.

llegar al ojo, el retinol debe convertirse en retinal, por la acción de la enzima retinol-deshidrogenasa, una enzima Zn-dependiente ^{63,64}.

⁶³ Russel RM, Morrison SA, Smith FR, Oaks EV, Carney EA. Vitamin A reversal of abnormal dark adaptation in cirrhosis. *Ann Int Med* 1978; 88: 622-26.

⁶⁴ Bartlett H, Eperjesi F. Age-related macular degeneration and nutritional supplementation: a review of randomised controlled trials. *Ophthalmic Physiol Opt* 2003; 23: 383-99.

2.4. EL ZINC EN LA CAVIDAD ORAL

2.4.1. El zinc como agente antimicrobiano

El zinc inhibe el metabolismo celular de las bacterias orales, alterando la producción de ácido. En condiciones normales, esta función la realiza en combinación con otros agentes como el triclosán o la hexetidina, teniendo una acción sinérgica incrementando los beneficios clínicos⁶⁵. Por tanto, el zinc mejora la actividad antimicrobiana de algunos agentes antisépticos⁶⁶. La combinación de clorhexidina con acetato de zinc hace que se reduzca la posible tinción producida por ésta. Los iones de zinc reaccionan con la clorhexidina y se forma sulfato de zinc que es blanco y disimula la tinción.

2.4.2. El zinc y la enfermedad periodontal

La deficiencia de zinc en sangre ha sido observada en pacientes con periodontitis, aumentando la deficiencia a medida que aumenta la severidad de la periodontitis⁶⁷.

Las sales de zinc (citrato de zinc, sulfato de zinc, cloruro de zinc y lactato de zinc) tienen un efecto anticálculo, inhibiendo la formación del mismo. Existe una relación inversa entre la concentración del metal y la producción de ácido en la placa bacteriana^{68,69,70}, siendo estas sales efectivas para prevenir el progreso de la gingivitis a una periodontitis severa⁷¹.

⁶⁵ Marsh PD. Antimicrobial strategies in the prevention of dental caries. *Caries Res* 1993; 27: 72-6.

⁶⁶ Zeelie JJ, McCarthy TJ. Effect of copper and zinc ions on the germicidal properties of two popular pharmaceutical antiseptic agents cetylpyridinium chloride and povidone-iodine. *Analyst* 1998; 123: 503-7.

⁶⁷ Ma ZJ, Zhang JZ. Changes in serum zinc level of periodontitis with kidney deficiency. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi* 1993; 13: 606-7.

⁶⁸ Afseth J, Oppermann RV, Rolla G. Accumulation of Cu and Zn in human dental plaque in vivo. *Caries Res* 1983; 17: 310-14.

⁶⁹ Finney M, Walker JT, Marsh PD, Brading MG. Antimicrobial effect of a novel triclosan/ zinc citrate dentifrice against mixed culture oral biofilms. *Int Dent J* 2003; 53: 371-78.

⁷⁰ Kuraner T, Beksac MS, Kayakirilmaz K, Caglayan F, Onderaglu LS, Ozgunes H. Serum and parotid saliva testosterone, calcium, magnesium and zinc levels in males with and without periodontitis. *Biol Trace Elem Res* 1991; 104: 191-94.

⁷¹ Sheiham A. Is the chemical prevention of gingivitis necessary to prevent severe periodontitis? *Periodontol* 2000 1997; 15: 15-24.

2.4.3. El zinc en la halitosis

El ión zinc (Zn^{2+}) inhibe la formación de los compuestos volátiles de sulfuro producidos en la cavidad oral, siendo estos los mayores causantes de la halitosis. Este efecto está relacionado con la afinidad del zinc por el sulfuro^{72,73,74}.

2.4.4. El zinc en las glándulas salivales

La deficiencia severa de zinc puede ocasionar una marcada alteración de la glándula salival, provocando una reducción del flujo salival y un déficit en la actividad de las enzimas salivales, lo cual contribuiría al aumento de la susceptibilidad a la caries dental⁷⁵.

2.4.5. El zinc y el sentido del gusto

El déficit de zinc en la dieta puede conducir a un deterioro del sentido del gusto. Se ha observado que la suplementación con zinc (220 mg de sulfato de zinc, 2 veces al día) ha sido útil en algunos pacientes, aunque todavía no se sabe a ciencia cierta cuáles son los beneficios globales de este tratamiento^{76,77}.

2.4.6. El zinc en los dientes

El zinc, junto con el hierro y el plomo, se une con el flúor para formar el esmalte superficial de los dientes. A pesar de esto, el zinc juega un papel importante en el metabolismo de mineralización de los dientes, observándose

⁷² Young A, Jonski G, Rolla G. The oral anti-sulphur compound effect of zinc salts and their stability constants. *Eur J Oral Sci* 2002; 110: 31-4.

⁷³ Young A, Jonski G, Rolla G, Waler SM. Effects of metal salts on the oral production of volatile sulphur-containing compounds (VSC). *J Clinical Periodontol* 2001; 28: 776-81.

⁷⁴ Roldan S, Winkel EG, Herrera D, Sanz M, Van Winkelhoff AJ. The effects of a new mouthrinse containing chlorhexidine, cetylpyridinium chloride and zinc lactate on the microflora of oral halitosis patients: a dual-centre, double-blind placebo-controlled study. *J Clin Periodontol* 2003; 30: 427-34.

⁷⁵ Johnson DA, Lopez H, Navia JM. Effects of protein deficiency and diet consistency on the parotid gland and parotid saliva of rats. *J Dent Res* 1995; 74: 1444-52.

⁷⁶ Silverman S. Complications of treatment. In: Silverman S Jr, editor. *Oral Cancer*. 5th ed. Hamilton: BC Decker Inc; 2003: 113-28.

⁷⁷ Silverman JE, Weber CW, Silverman S Jr. Zinc supplementation and taste in head and neck cancer patients undergoing radiation therapy. *J Oral Pathol Med* 1983; 38: 14-6.

una mayor concentración de zinc en los dientes cariados y restaurados que en los dientes no cariados^{78,79}.

2.4.7. El zinc como agente terapéutico en las enfermedades orales

Algunos compuestos de zinc como el acetato, el sulfato, el lactato o el hialuronato, han sido utilizados con éxito en el tratamiento de cuadros de herpes recurrente⁸⁰, lesiones traumáticas, el tratamiento de estomatitis aftosa⁸¹ o de la lengua geográfica⁸². Parece ser que mejoran la inmunidad del individuo y reduce el riesgo de infecciones.

2.4.8. El zinc y el cáncer oral

Desde hace algún tiempo numerosos investigadores han observado cambios ultraestructurales en el epitelio de animales de experimentación con dietas deficientes en zinc, produciéndose una hiperplasia epitelial, una proliferación e incremento en la actividad mitótica, una carcinogénesis oral marcada etc.^{83,84,85,86}. El grado de displasia que se observa en la fibrosis submucosa puede verse aumentado por la disminución de la concentración de zinc en la sangre. Por ello, algunos investigadores⁸⁷, sostienen que el zinc puede ser útil como bioindicador en lesiones y estados precancerosos.

⁷⁸ Tvinnereim HM, Eide R, Riise T, Fosse G, Wesenberg GR. Zinc un primary teeth from children in Norway. *Science Total Environ* 1999; 226: 201-12.

⁷⁹ Tvinnereim HM, Eide R, Riise T. Heavy metals in human primary teeth: some factors influencing the metal concentration. *Science Total Environ* 2000; 227: 21-7.

⁸⁰ Brody I. Topical treatment of recurrent herpes simple and post-herpetic erythema multiforme whit low concentration of zinc sulphate solution. *Dermatol* 1981; 104: 191-94.

⁸¹ Endre L. Recurrent aphthous ulceration with zinc deficiency and cellular immune deficiency. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1991; 123: 503-07.

⁸² Sweeney MP, Bagg J, Fell, Yip B. The relation between micronutrient depletion and oral health in geriatrics. *J Oral Pathol Med* 1994; 23: 168-71.

⁸³ Mathur A, Wallenius K, Abdulla M. Influence of zinc on the onset and progression of oral carcinogenesis in rats. *Act Odontol Scand* 1979; 37: 277-84.

⁸⁴ Stoncius LV, Asharafi SH, Meyer J. Ultrastructure of mast cells in the hyperplastic buccal mucosa of the zinc deficient rat. *J Oral Pathol* 1985; 14: 375-82.

⁸⁵ Hsu D, Meyer J, Gerson S, Daniel J. Sequence of changes in rat buccal mucosa induced by zinc deficiency. *J Oral Pathol* 1988; 17: 186-90.

⁸⁶ Hsu DJ, Daniel J, Gerson SJ. Effect of zinc deficiency on keratins in buccal epithelium of rats. *Arch Oral Biol* 1991; 36: 759-63.

⁸⁷ Paul RR, Chatterjee J, Das AK, Dutta SK, Roy D. Zinc and iron as bioindicators of precancerous nature of submucous fibrosis. *Biol Trace Elem Res* 1996; 54: 213-30.

2.5. DEFICIENCIA DE ZINC

El déficit de zinc puede producirse por^{88,89}:

- Cualquier disminución en la ingesta, mal absorción o alteración debida a alguna enfermedad gastrointestinal (alcoholismo, cirrosis hepática, enfermedad celíaca, enfermedad de Cröhn) o mutación genética, pueden conducir a la deficiencia de zinc.
- Terapias de alimentación parenteral total, cuya fórmula no incluya la administración de zinc, o que los requerimientos del paciente sean mayores a la dosis promedio que se aplica.
- Dietas basadas en cereales como fuente proteica. Es el caso de los vegetarianos, ya que los cereales tienen alto contenido de fitatos, los cuales son compuestos que fijan el zinc, impidiendo su absorción.
- Pérdidas aumentadas por sudoración excesiva, por quemaduras extensas, o debido al uso de fármacos diuréticos, cafeína y alcohol.
- Consumo aumentado del elemento como en las infecciones y traumatismos severos.
- Cuando existen patologías que condicionan una mayor pérdida de zinc tales como insuficiencia renal, cirrosis hepática o síndrome nefrítico.
- La vejez por sí misma es un factor de riesgo para bajos niveles séricos de zinc, ya que se asocian los factores nutricionales, trastornos de absorción y patologías asociadas⁹⁰.
- El embarazo y la lactancia aumentan los requerimientos de zinc de forma importante. En el primer caso debido al metabolismo anabólico que caracteriza el proceso de gestación, donde hay síntesis de proteínas y formación de tejidos nuevos para el desarrollo fetal mediado por el zinc. En el segundo caso, porque la hormona prolactina requiere del zinc para su funcionamiento^{91,92}.

⁸⁸ Prasad AS, Oberleas D. Deficiency of zinc in man. *Lancet* 1973 30:1520-1.

⁸⁹ Christian P. Micronutrients and reproductive health issues: an international perspective. *J Nutr* 2003; 133: 1969S-73S.

⁹⁰ Abbasi A, Shethy K, Zinc: pathophysiological effects, deficiency status and effects of supplementation in elderly persons-an overview of the research. *Z Gerontol Geriatr* 1999; 32: 175-9.

⁹¹ Harper H, Rodwell V, Mayes P. *Manual de Química Fisiológica*. México DF: Editorial Moderno; 1980.

- En los pacientes diabéticos hay déficit de zinc; se piensa que la razón es por una mayor excreción urinaria⁹³
- Por causas genéticas como la enfermedad acrodermatitis enteropática, que resulta de una alteración de la absorción y transporte del zinc.

Según el grado de afectación, la deficiencia de zinc puede ser^{94,95,96,97,98}:

A. Leve. Caracterizada por:

- Oligoespermia, debido a bajos niveles de testosterona.
- Disminución de la resistencia a las infecciones.
- Enfermedades de la piel como psoriasis, dermatitis herpetiforme, acné.
- Ligera pérdida de cabello.

B. Moderada

- Diarrea, muy común en países subdesarrollados donde la dieta no aporta cantidades suficientes de este oligoelemento.
- Trastornos del crecimiento.
- Hipogonadismo.
- Trastornos de la cicatrización.
- Enfermedades de la piel como la dermatitis ampollosa-pustular.
- Trastornos inmunológicos con mayor susceptibilidad a las enfermedades infecciosas.

⁹² Pathak P, Kapil U. Role of trace elements zinc, copper and magnesium during pregnancy and its outcome. Indian J Pediatr 2004; 71: 1003-5.

⁹³ Faure P. Protective effects of antioxidant micronutrients (vitamin E, zinc and selenium) in type 2 diabetes mellitus. Clin Chem Lab Med 2003; 41: 995-8.

⁹⁴ Hambridge M. Human zinc deficiency. J Nutr 2000; 130: 1344S-49S

⁹⁵ Golden M. The Diagnosis of Zinc Deficiency. In: Mills CF, editor. Zinc in Human Biology. London: Springer-Verlag; 1989.

⁹⁶ World Health Organization WHO. Zinc. In: Trace Elements in Human Nutrition and Health. Geneva: WHO; 1996.

⁹⁷ Hernández C, Estévez A. Función del zinc en la recuperación inmunonutricional de los lactantes malnutridos. Rev Cub Alim Nutr 2000; 14: 65-70.

⁹⁸ Black RE. Zinc deficiency, infectious disease and mortality in the developing world. J Nutr 2003; 133: 1485S-9S.

- Disminución del sentido del gusto, con supresión del apetito que lleva a pérdida de peso.
- Trastornos cognitivos leves con apatía y fatiga mental.
- Puede ser un elemento condicionante en la depresión postparto.

C. Severa. Se manifiesta con:

- Retardo en el crecimiento físico y desarrollo psicomotor.
- Retardo en la maduración sexual.
- Alteraciones en la piel tales como eritema o eczema.
- Diarrea severa y crónica.
- Alteraciones del sistema inmunológico, con mayor susceptibilidad a las infecciones.
- Dificultad para la cicatrización de heridas.
- Disminución del apetito.
- Alteraciones del sentido del gusto y olfato.
- Ceguera nocturna.
- Inflamación y opacidad de la córnea.
- Trastornos de conducta.

En los casos de deficiencia, la administración del oligoelemento conduce a la total remisión del cuadro clínico. En condiciones normales, el déficit de zinc por carencia dietética nunca llevará a un cuadro clínico severo, algunas patologías que produzcan mal absorción y/o pérdidas aumentadas de zinc (quemaduras severas o diarrea crónica), pueden producir síntomas de importancia.

2.6. TOXICIDAD DEL ZINC

La toxicidad del zinc es relativamente baja y su control homeostático es bastante eficiente, así que la intoxicación crónica es poco probable. La intoxicación aguda se manifiesta con anorexia, náuseas, vómitos, sangrado de la mucosa gástrica, diarrea, vértigos, somnolencia y fiebre⁹⁹. En el adulto, estas manifestaciones sobrevienen tras la ingesta de más de 2 g de zinc en una

⁹⁹ Fosmire G. Zinc toxicity. Am J Clin Nutr 1990; 51: 225-28.

única toma. Igualmente, la sobredosificación por vía intravenosa puede conducir a una insuficiencia renal aguda y, en algunos casos, a la muerte.

La intoxicación crónica se produce por aportes excesivos y prolongados de zinc (75-300 mg/día), favoreciendo la aparición de una carencia de cobre (Cu) que se manifiesta en forma de anemia microcítica y de trombocitopenia. Los indicadores de este exceso podrían ser el aumento en las concentraciones de zinc en los tegumentos (cabellos, piel, uñas) y la baja actividad de la enzima Cu-Zn superóxido dismutasa¹⁰⁰.

¹⁰⁰ Brunetto MR, Alarcon OM, Davila E, Contreras Y, Gallignani M, Rondon C, Burguera JL, Burguera M, Angarita C. Serum trace elements and fat-soluble vitamins A and E in healthy pre-school children from a Venezuelan rural community. *J Trace Elem Med Biol* 1999; 13: 40-50.

3. LA SALIVA

3.1. GENERALIDADES DE LA SALIVA

La saliva es una mezcla de secreciones de composición compleja, producida principalmente por las glándulas salivares mayores (parótidas, submaxilares y sublinguales) y las menores o accesorias (linguales, bucales o yugales, labiales, palatinas y retromolares)^{1,2,3}. La saliva “total” contiene además, un gran número de constituyentes no-salivares como fluido crevicular, células sanguíneas, bacterias, virus, restos alimentarios y secreciones bronquiales expectoradas. Es un líquido de naturaleza mucoserosa, incoloro, insípido, claro y ligeramente ácido, cuyo volumen diario oscila entre 0.5 y 1.0 litros). Este volumen puede aumentar considerablemente durante la ingesta de alimentos u otro estímulo⁴.

3.2. pH SALIVAL

El pH salival depende primariamente del equilibrio del complejo ión bicarbonato (HCO_3^-) / ácido carbónico (H_2CO_3) que a su vez depende, en cierta medida, de sus proporciones en la sangre. El pH salival normal oscila entre 5.6 y 7.9 con un valor medio de 6.4. Niveles de pH por encima o por debajo de estos valores podrían representar deficiencias de algún oligoelemento o la presencia de alguna alteración sistémica.

3.3. COMPOSICIÓN SALIVAL

Existen varios factores que influyen en la composición salival:

- i) el aumento de la concentración total de proteínas y de electrolitos
- ii) el tipo de glándula salival

¹ Edweng AM, Rally JB. Essential of dental caries: the Diseases and its management. London: Wright; 1987.

² FDI Working Group 10, CORE, Saliva: its role in health and disease, Int Dent J 1992; 42: 291-304.

³ Todd WR. Digestión de alimentos. En: Staunton E, Todd WR, Mason HS, Van Bruggen JT, editores. Bioquímica médica. Barcelona: Editorial Interamericana; 1966. p. 39-56.

⁴ Diccionario de ciencias médicas. Buenos Aires: Editorial Panamericana; 1999.

- iii) la naturaleza del estímulo empleado y
- iv) la duración del mismo.

La saliva esta compuesta en un 99% por agua. El 1% restante lo conforman moléculas orgánicas grandes (albúmina, carbohidratos, enzimas, hormonas y vitaminas); moléculas orgánicas pequeñas (lípidos, glucosa, urea, fenoles, ácidos láctico y ascórbico, etc.) y compuestos inorgánicos (calcio, fosfato, sodio, potasio, magnesio, cloruro, sulfato, tiocianato, yoduros, zinc, cobre, hierro, nitratos, etc.)^{5,6,7}.

Actualmente, se conoce que la concentración de los iones inorgánicos salivales guarda poca relación con su concentración en el suero sanguíneo, excepto en el caso de algunos iones como el sodio (Na^+) y el cloro (Cl^-). Sin embargo, existe una buena correlación entre los niveles plasmáticos y salivales de un gran numero de otros componentes comunes, que permiten el uso de la saliva en el monitoreo de hormonas, fármacos, drogas, anticuerpos anti-VIH o algunos contaminantes ambientales. Este fluido es utilizado como herramienta en el diagnóstico de enfermedades y alteraciones de las glándulas salivales; así como medio auxiliar para el diagnóstico y seguimiento de diversas enfermedades sistémicas^{8, 9, 10}.

3.4. FUNCIONES DE LA SALIVA

La principal función de la saliva es la de mantener la integridad de la cavidad bucal. Por la gran cantidad de agua que contiene, la saliva mantiene la boca húmeda y limpia a un pH aproximadamente constante. Los otros

⁵ Christian P. Micronutrients and reproductive health issues: an international perspective. *J Nutr* 2003; 133: 1969S-73S

⁶ Hansonn A. Extracellular zinc ions induce mitogen-activated protein kinase activity and protein tyrosine phosphorylation in bombesin-sensitive Swiss 3T3 fibroblasts. *Arch Biochem Biophys* 1996; 328: 233-38.

⁷ Walker CF, Black RE. Zinc and the risk for infectious disease. *Ann Rev Nutr* 2004; 24: 255-75.

⁸ Aguirre A, Testa-Weintraub LA, Banderas JA, Haraszthy GG, Reddy MS. Sialochemistry: a diagnostic tool? *Crit Rev Oral Biol Med* 1993; 4: 343-50.

⁹ Medina M, Merino I, Gorodner J. Utilidad de la saliva como fluido diagnóstico. Resistencia-Chaco (Argentina): Instituto de Medicina Regional, Universidad Nacional del Nordeste; 2002.

¹⁰ Amerongen AV, Nieuw AD, Veerman ECI. Saliva: the defender of the oral cavity. *Oral Dis* 2002; 8: 12-22.

numerosos componentes de la saliva tienen papel primordial y específico en las diversas funciones que desarrolla este fluido oral^{11,12}.

1. Función digestiva de la saliva.

- Participa en la formación del bolo alimenticio solubilizando los alimentos sólidos. Dada su acción lubricante, ayuda a la masticación y a la deglución.
- Ayuda a la estimulación de los receptores gustativos a través de la gustina.
- Inicia la digestión de los alimentos mediante la amilasa salival, alfa-amilasa o ptialina, que convierte la amilasa en malasa y la malasa en dextrina, la cual inicia la digestión de los almidones en la boca.
- Elimina los restos de comida de la boca; en este proceso se forman ácidos, por lo tanto, es un componente cariogénico.
- Además, participa en la neutralización del ácido clorhídrico gástrico en la luz esofágica y estomacal.

2. Función protectora de la saliva.

- Mantiene lubricados los tejidos duros y blandos de la cavidad bucal por su alto contenido de mucinas, prolinas y agua.
- Mantiene la integridad de la mucosa oral por la presencia de mucinas, electrolitos y agua.
- Mantiene saludables los tejidos blandos de la cavidad oral por su contenido en enzimas proteolíticas, anticuerpos y otras sustancias antibacterianas que favorecen la acción defensiva (cistatinas, histatinas, lisozima, lactoferrina, lactoperoxidasa). La inmunoglobulina A le confiere una acción inmunitaria por proteger las superficies del

¹¹ Stallard L, Reeves PG. Zinc deficiency in adult rats reduces the relative abundance of testis-specific angiotensin-converting enzyme mRNA. *J Nutr* 1997; 127: 25-9.

¹² Takeda A. Movement of zinc and its functional significance in the brain. *Brain Res Rev* 2000; 34: 137-48

ataque de los microorganismos impidiendo la adherencia de los mismos^{13, 14, 15}.

- Por estar saturada en calcio y fosfato, la saliva tiene capacidad remineralizante de los dientes. Muchas de las glicoproteínas presentes en la saliva se unen a la hidroxiapatita, inhibiendo la precipitación espontánea de calcio y fosfato. El fluoruro juega un papel importante en la prevención de la formación de la caries dental. Su concentración en la saliva depende del consumo de agua y de productos de uso odontológico (dentífricos y colutorios). El calcio es importante en el sistema de equilibrio con el fosfato en el diente y ayuda en la actividad de numerosas enzimas a nivel bucal¹⁶.
- Por su propiedad amortiguadora, vinculada con el contenido de bicarbonato que ayuda a mantener el pH bucal relativamente constante, la saliva previene el efecto nocivo de los ácidos producidos por las bacterias y por la descomposición de los azúcares sobre el esmalte. La anhidrasa carbónica contribuye a la acción amortiguadora de la saliva al producir la hidratación reversible del dióxido de carbono, reacción importante, cuyo producto es el bicarbonato¹⁷.
- Por contener los factores de la coagulación (VIII, IX, X y XII), la saliva tiene efecto coagulante. Frente a cualquier lesión en la boca, se acelera el proceso de coagulación y se evita así la penetración bacteriana en las heridas.
- Inicia la formación de la placa dental a raíz de la combinación de la saliva con restos de alimentos y líquidos que conducen a la formación de un depósito de bacterias, pegajoso e incoloro (*biofilm* o bioplaca),

¹³ Bogden JD. Influence of zinc on immunity in the elderly. *J Nutr Health Aging* 2004; 8: 48-54.

¹⁴ Liu B, Rayment SA, Gyurko C, Oppenheim FG, Offner GD, Troxler RF. The recombinant N-terminal region of human salivary mucin MG2 (MUC7) contains a binding domain for oral *Streptococci* and exhibits candidacidal activity. *Biochem J* 2000; 345: 557-64.

¹⁵ Situ H, Bobek LA. *In vitro* assessment of antifungal therapeutic potential of salivary histatin-5, two variants of histatin-5, and salivary mucin (MUC7) domain 1. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 1485-93.

¹⁶ McCall KA, Huang Ch-Ch, Fierke CA. Function and mechanism of zinc metalloenzymes. *J Nutr* 2000; 130: 1437S-46S.

¹⁷ Marcantoni M. Ecología de la cavidad bucal. En: Negroni M, editor. *Microbiología estomatológica. fundamentos y guía práctica*. Buenos Aires: Editorial Panamericana; 1999. p. 23-44.

que favorece la colonización de bacterias. Esto puede ser prevenido con una adecuada higiene dental¹⁸.

- Participa en la excreción de metales pesados como plomo y mercurio¹⁹, así como en la de otras sustancias como yodo y tiocianato^{20,21,22}. Por ejemplo, la peroxidasa salival cataliza la oxidación del ion tiocianato por el peróxido de hidrógeno, lo que produce la intoxicación directa de gran cantidad de microorganismos, incluido el *Streptococcus mutans*²³.
- Una de las funciones más importantes de la saliva es la antimicrobiana. La lactoferrina actúa sobre un amplio espectro de microorganismos por su capacidad de secretar hierro hasta niveles incompatibles con el desarrollo bacteriano. La lisozima destruye las paredes celulares de las bacterias gram-positivas al hidrolizar los uniones glucosídicas beta 1-4 entre el ácido N-acetilmurámico y N-acetilglucosamina. La fibronectina se localiza a lo largo de la interfase diente - tejido conjuntivo gingival y en la interfase epitelio-cemento e inhibe la colonización epitelial por bacterias gram-negativas²⁴.

En la figura 3 se observa un diagrama donde se resumen las funciones de la saliva.

¹⁸ Maestre M, Maestre Vera JR. Biofilm: modelo de comunicación bacteriana y resistencia a los antimicrobianos. Rev Esp Quimioterap 2004; 7: 26-8.

¹⁹ Monaci F, Bargagli E, Bravi F, Rottoli P. Concentrations of major elements and mercury in unstimulated human saliva. Biol Trace Elem Res 2002; 89: 193-203.

²⁰ Hammond GL, Avvakumov GV, Muller YA. Structure/function analyses of human sex hormone-binding globulin: effects of zinc on steroid-binding specificity. J Steroid Biochem Mol Biol 2003; 5: 195-200.

²¹ Shear M. The structure and function of myoepithelial cells in salivary gland. Arch Oral Biol 1966; 11: 769-80.

²² Liébana J, Rodríguez JM, Insinilla S, Álvarez M. Determinantes ecológicos orales. En: Negroni M, editor. Microbiología estomatológica. Fundamentos y guía práctica. Buenos Aires: Editorial Panamericana; 1999. p. 61-87.

²³ Walker CF, Black RE. Zinc and the risk for infectious disease. Ann Rev Nutr 2004; 24: 255-75.

²⁴ Mayoral LG. Fisiología digestiva. Secreción salival. Cali (Colombia): Universidad del Valle; 1996.

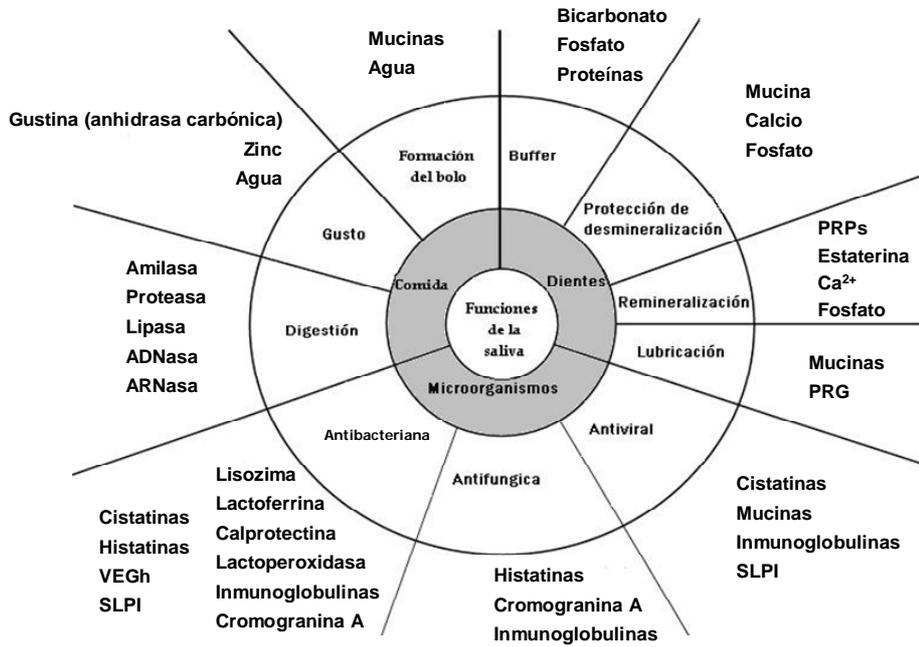


Figura 3. Funciones de la saliva. Modificado de: Amerongen AV, Nieuw AD, Veerman ECI. Saliva: the defender of the oral cavity. Oral Dis 2002; 8:12-22.

4. MICROBIOTA ORAL

4.1. GENERALIDADES SOBRE LAS BACTERIAS

La gran variedad anatómica y tisular existente en la cavidad bucal, junto con otros factores, hace posible la convivencia de diferentes ecosistemas microbianos, cada uno de ellos con sus características metabólicas específicas y todos, coexistiendo dentro de un delicado equilibrio ecológico^{25,26}.

La aplicación de un amplio rango de pruebas bioquímicas, sobre todo las de fermentación de azúcares, la de la enzima glicosidasa y más recientemente el análisis de las secuencias del ácido ribonucleico ribosómico (ARNr), han puesto en evidencia el reconocimiento de 19 géneros distintos que engloban más de 500 microorganismos.

La proporción de las distintas bacterias orales varían en función de múltiples factores tales como la edad, la higiene, la dieta, la presencia de caries o enfermedad periodontal, los tratamientos antimicrobianos previos, el estado de inmunosupresión y determinados factores genéticos y raciales²⁷.

Dentro del amplio espectro de bacterias de la microbiota oral, las especies del género *Streptococcus* son las más importantes y prevalentes.

4.2. GÉNERO *STREPTOCOCCUS*. CLASIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN

Los estudios genéticos y fenotípicos han llevado a los investigadores a la conclusión de que dentro del género *Streptococcus* se pueden distinguir seis grupos: *pyogenic*, *anginosus*, *mitis*, *salivarius*, *bovis* y *mutans*; cada uno de

²⁵ Chow AW. Infection of the Oral Cavity, Neck and Head. In: Mandell GL, Benett JE, Dolin R, editors. Principles and Practices of Infectious Diseases. 5th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2000. p. 278-326.

²⁶ Brading MG, Marsh PD. The oral environment: the challenge for antimicrobials in oral care products, Int Dent J 2003; 53: 353-63

²⁷ Marcantoni M. Ecología de la Cavidad Bucal. Negroni M, editor. Microbiología Estomatológica. Fundamentos y Guía Práctica. Buenos Aires: Editorial Panamericana; 1999. p. 23-44.

ellos con sus respectivas especies. Kamoura y cols²⁸, han agrupado las diferentes especies de estreptococos en estos grupos, tal como se indica en la figura 4.²⁹

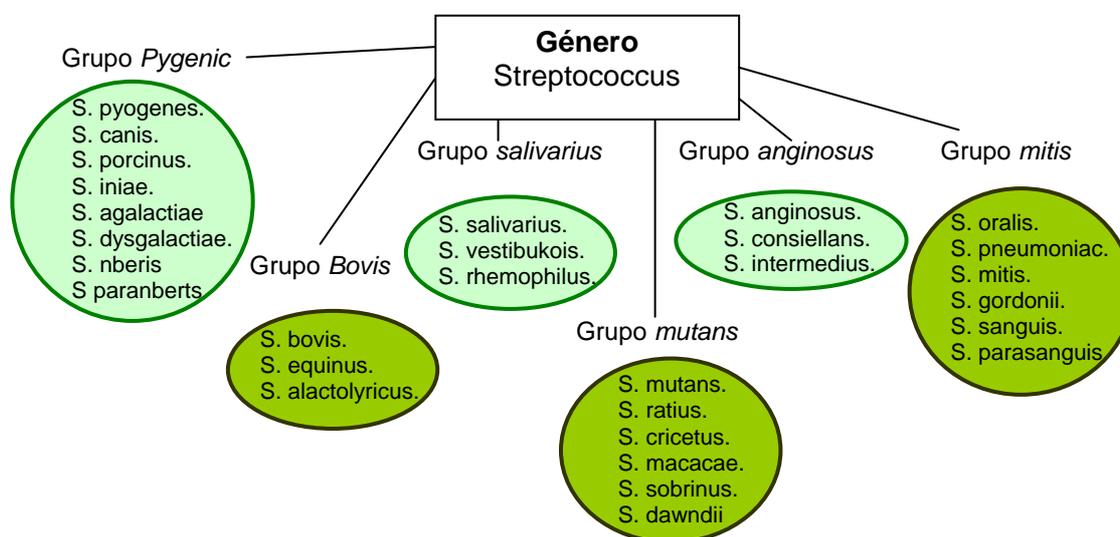


Figura 4. Clasificación de los *estreptococos*. Modificado de Kawamura Y et al. Determination of 16S rRNA sequences of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus gordonii* and phylogenetic relationships among members of the genus *Streptococcus*. *Int J Syst Bact* 1995; 45: 406-8.

También se han utilizado otros criterios para clasificar los estreptococos. Entre ellos cabe destacar las pruebas bioquímicas por hemólisis. Lancefield³⁰ estudió los estreptococos β -hemolíticos asociados a importantes enfermedades y los clasificó según sus antígenos de superficie celular estableciendo los antígenos A-E. Estudios posteriores de otros estreptococos condujeron al descubrimiento de otros antígenos denominados H, K, M y D^{31,32}.

²⁸ Kawamura Y, Hou XG, Sultana F, Miura H, Ezaki T. Determination of 16S rRNA sequences of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus gordonii* and phylogenetic relationships among members of the genus *Streptococcus*. *Int J Syst Bact* 1995; 45: 406-8

²⁹ Krause RM. Symposium on relationship of structure of microorganisms to their immunological properties. Antigenic and biochemical composition of hemolytic streptococcal cell walls. *Bacteriol Rev* 1963; 27: 369-80.

³⁰ Lancefield RC. Specific relationships on cells composition to biological activity of hemolytic streptococci. *Harvey Lectures* 1941; 36: 250-90.

³¹ Rotta J, Krause RM, Lancefield RC, Everly W, Lackland H. New approaches for the laboratory recognition of M types of group A streptococci. *J Exp Med* 1971; 134: 1298-315

³² Schlegel L, Grimont F, Grimont P, Bouvet A. New group D streptococcal species. *Indian J Med Res* 2004; 119: 252-6.

Los estreptococos orales no son un grupo taxonómico independiente como tal sino que se caracterizan todos por habitar la cavidad oral. Los primeros microbiólogos que cultivaron muestras de saliva en medio agar sangre observaron un halo verde estrecho después de la incubación de las muestras. Por esta razón denominaron a esta especie *Streptococcus viridans* (del latín *viridis*, que significa verde)³³.

Existen muchas especies de estreptococos que pertenecen al grupo *viridans*. Las más abundantes se encuentran en la cavidad oral, siendo uno de sus miembros, el *Streptococcus mutans*^{34,35}, el principal agente etiológico relacionado con la caries dental; mientras que otras, están asociadas con infecciones gingivales o del resto de la mucosa oral.

Los estudios epidemiológicos han demostrado una relación directa entre el número de *Streptococcus mutans* en la placa dental o en la saliva y la presencia de caries dental. En la actualidad, esta relación se usa para predecir el riesgo de caries dental a partir del recuento bacteriano salival. Los recuentos bacterianos altos, en torno a 1×10^6 de unidades formadoras de colonias por mL de saliva (UFC/mL), indican un alto riesgo de caries dental^{36,37}.

Estas bacterias, habitualmente presentes en la microbiota oral normal, al ponerse en contacto con los azúcares que contienen los alimentos, forman ácidos que rápidamente atacan al esmalte dental, iniciando el proceso de caries dental y favoreciendo la infección gingival. Si estos microorganismos pasan al torrente sanguíneo, pueden producir alteraciones importantes como la

³³ Liébana J, González MP, Liébana MJ, Parra L. Composición y ecología de la microbiota Oral. En: Liébana J, editor. Microbiología oral. 2ª ed. Madrid: Editorial Interamericana McGraw-Hill; 2002. p. 515-25.

³⁴ Thibodeau EA, O'Sullivan DM. Salivary mutans streptococci and incidence of caries in preschool children. *Caries Res* 1995; 29: 148-53.

³⁵ Zero DT. Sugars: the arch criminal? *Caries Res* 2004; 38: 277-85.

³⁶ Marsh P.D. Antimicrobial strategies in the prevention of the dental caries. *Caries Res* 1993; 27: 72-6.

³⁷ Peretz B, Sarit F, Eidelman E, Steinberg D. Mutans streptococcus counts following treatment for early childhood caries. *J Dent Child (Chic)* 2003; 70: 111-4.

endocarditis, particularmente en individuos con válvulas cardíacas defectuosas^{38,39}.

En la literatura científica se pone de manifiesto que el mecanismo de acción antimicrobiana del zinc no está del todo elucidado, probablemente porque su efecto sobre las bacterias se desarrolla gracias a más de un mecanismo^{40,41,42}:

1. Los iones Zn^{2+} se unen al grupo tiol (-SH) de algunas enzimas y altera su actividad de biosíntesis, afectando así a la supervivencia de las bacterias.
2. Los iones Zn^{2+} penetran la pared celular e interfieren en la producción de azúcares y por ende con la producción de ácidos. Este proceso es pH-dependiente.
3. Los iones Zn^{2+} disminuyen los niveles celulares de ATP y polisacáridos, lo que indica pérdida del potencial metabólico y eventual muerte de la bacteria.

Sin embargo, el mecanismo más ampliamente aceptado y con mayor sustentación bibliográfica es el de la inhibición de la glicólisis^{98,117,129}.

La glicólisis es el proceso por el cual cualquier microorganismo, y en particular bacterias como el *Streptococcus mutans*, metaboliza los carbohidratos con producción de ácido, que es el principal responsable de la desmineralización del esmalte y a la larga de la aparición de caries dental. Este

³⁸ Banas JA. Virulence properties of *Streptococcus mutans*. *Front Biosci* 2004; 1: 1267-77.

³⁹ Cohen DJ, Malave D, Ghidoni JJ, Iakovidis P, Everett MM, You S, Liu Y, Boyan BD. Role of oral bacterial flora in calcific aortic stenosis: an animal model. *Ann Thorac Surg* 2004; 77: 537-43.

⁴⁰ Zero DT. Sugars: the arch criminal? *Caries Res* 2004; 38: 277-85.

⁴¹ Zeelie JJ, McCarthy TJ. Effects of copper and zinc ions on the germicidal properties of two popular pharmaceutical antiseptic agents cetylpyridinium chloride and povidone-iodine. *Analyst* 1998; 123: 503-7.

⁴² He G, Pearce EIF, Sissons CH. Inhibitory effect of $ZnCl_2$ on glycolysis in human oral microbes. *Arch Oral Biol* 2002; 47: 117-29.

proceso es complejo y ocurre en varias etapas, tal como se indica en el siguiente esquema⁴³ (figura 5).

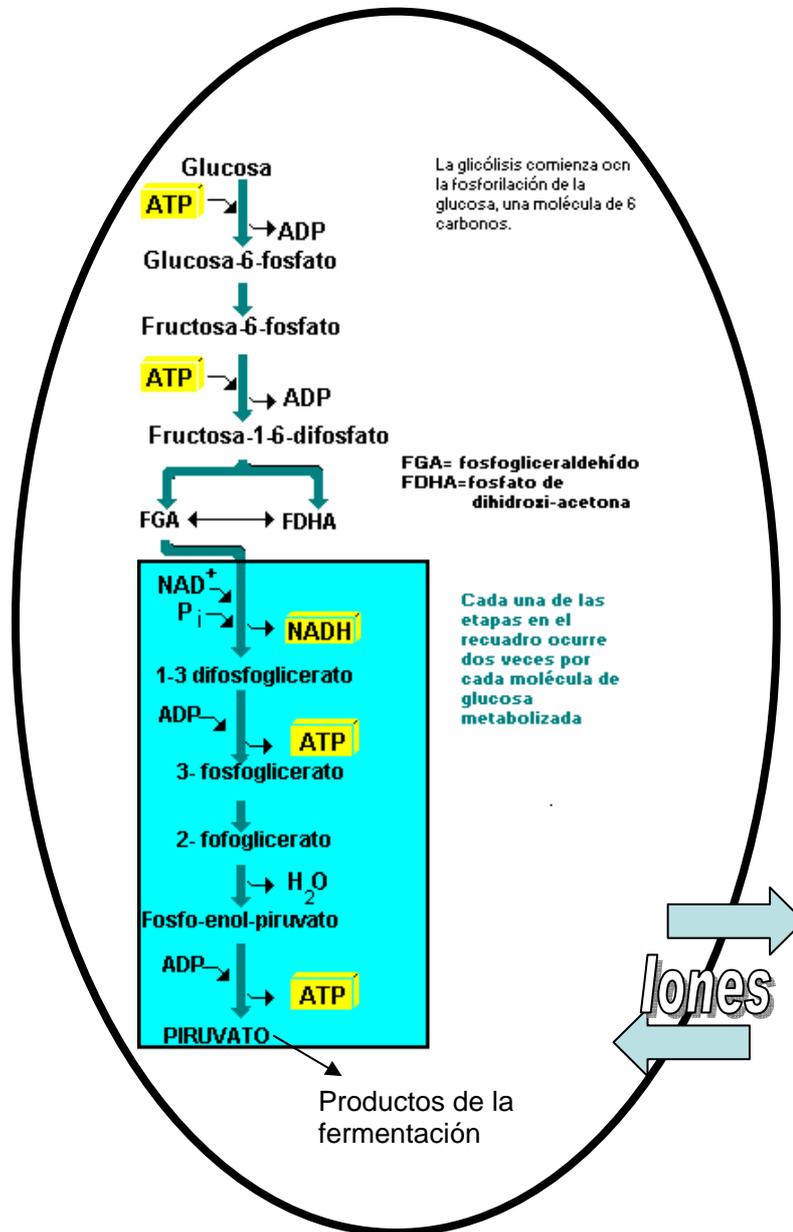
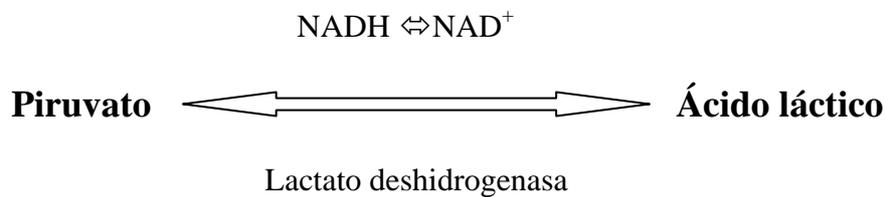


Figura 5. Esquema de la glicólisis en célula bacteriana.

⁴³ Devlin T. Bioquímica: Libro de Texto con Aplicaciones Clínicas. Vol II. 3ª ed. México DF: Editorial Reverte, SA; 2000.

Los carbohidratos son fermentados en la cavidad oral y transformados enzimáticamente, en azúcares. El sistema de transporte de fosfotransferasa (PTS) permite que los azúcares pasen la barrera celular de las bacterias y que sean transformados en azúcares. Dentro de la célula, el proceso de glicólisis empieza con la fosforilación de los azúcares, principalmente mono- y disacáridos, que son transformados finalmente en ácido pirúvico junto con ATP.

El piruvato sufre una fermentación láctica que lo transforma en ácido láctico según la siguiente reacción:



Finalmente, el ácido láctico es expulsado de las células.

Cada una de estas etapas puede inhibirse con el uso de agentes adecuados, como la clorhexidina, la hexetidina, el triclosán o los iones metálicos⁴⁴.

4.3. FACTORES QUE CONDICIONAN LAS CARACTERÍSTICAS Y LA COMPOSICIÓN DE LA MICROBIOTA ORAL

Estos factores son:

- Variabilidad: el ecosistema oral presenta diferencias cuantitativas y cualitativas entre sí, entre los individuos e incluso, en un mismo

⁴⁴ Dahlman P. Anti-microbial agents and treatments with special reference to dental caries. Malmo (Sweden): Malmo University Press, Faculty of Odontology; 2003.

sujeto con idéntico ecosistema en distintos momentos del día. Esta variabilidad se debe a:

- Factores propios del hospedador (higiene oral, hábitos dietéticos, flujo salival o fuerza de la masticación)
 - La naturaleza de los propios microorganismos de la microbiota oral y su capacidad de adherirse a superficies tisulares
 - Factores fisicoquímicos (pH, disponibilidad de micronutrientes o humedad).
- Heterogeneidad: se refiere a la diversidad de especies distintas que pueden aislarse de los diferentes microbiotas.
 - Cantidad: es muy elevada en la cavidad bucal debido al fácil acceso de las diferentes especies a la boca.
 - Especificidad: algunos microorganismos tienen una tendencia especial para colonizar determinadas superficies orales. Así por ejemplo, *S. mutans* y *S. sanguis* tienen una especial afinidad para adherirse a superficies duras, mientras que el *S. salivarius* coloniza, sobre todo, el dorso de la lengua⁴⁵.

La nutrición y el metabolismo de las bacterias orales no difieren mucho del metabolismo celular de los organismos superiores. Sus nutrientes son las sustancias que debe incorporar cualquier microorganismo para garantizar su supervivencia, es decir que le proporcionen energía y los elementos necesarios para realizar la síntesis de sus elementos principales. Pueden encontrarse entonces nutrientes de tipo esencial o básico que incluyen: fuentes de carbono y nitrógeno, fosfato en forma de sales, otros nutrientes como iones de potasio,

⁴⁵ Chow AW. Infections of the oral cavity, neck, and head. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. Principles and practice of infectious diseases. 5th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2000.

magnesio, etc. y oligoelementos necesarios en pequeñas concentraciones (hierro, cobre, cobalto, zinc u otros)⁴⁶.

⁴⁶ Negroni M. Crecimiento, nutrición y metabolismos bacterianos. En: Negroni M, editor. Microbiología Estomatológica. fundamentos y Guía Práctica. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 1999. p. 115-40.

5. AGENTES ANTISÉPTICOS ORALES

5.1. MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS ANTISÉPTICOS ORALES

Los agentes antimicrobianos orales disminuyen la incidencia de caries y permiten controlar la enfermedad periodontal inhibiendo la formación de la placa dental. Reducen las especies cariogénicas e inhiben el metabolismo bacteriano a través de distintos mecanismos:

- Acción directa sobre las células, disolviéndolas.
- Penetrando en las células y causando coagulación de los constituyentes celulares, destruyendo así al microorganismo.
- Inactivando la membrana que transporta elementos esenciales, interfiriendo con su metabolismo, alterando la reproducción y la supervivencia celular.

5.2. PROPIEDADES IDEALES DE UN AGENTE ANTISÉPTICO ORAL

La naturaleza compleja de los agentes antisépticos orales (pastas dentales, colutorios, etc.) ha producido un número enorme de formulaciones diferentes, muchas de las cuales, no han sido correctamente evaluadas y no se ha comprobado su eficacia.

La eficacia de un agente antimicrobiano oral depende de su potencia y su substantividad. La substantividad de una sustancia es la habilidad para permanecer en los fluidos y en las superficies orales. De igual forma, la substantividad puede ser determinada por la duración y la magnitud de reducción en el número de bacterias a nivel salival⁴⁷, así como la inhibición de los factores de virulencia bacterianos (producción de ácidos, síntesis de glucanos, etc.)⁴⁸.

⁴⁷ Elworthy A, Greenman J, Doherty FM, Newcombe RG, Addy M. The substantivity of a number of oral hygiene products determined by the duration of effects on the salivary bacteria. *J Periodontol* 1996; 67: 572-6.

⁴⁸ Marsh PD. Antimicrobial strategies in the prevention of dental caries. *Caries Res* 1993; 27: 72-6.

Así, un agente con buena substantividad tiene una mayor retención en la boca a pesar de su interacción con las superficies orales. Sin embargo, aún no están totalmente aclarados los mecanismos por los que estos agentes pueden mantenerse en la boca. Parecen estar implicadas las fuerzas de van der Waals, las fuerzas iónicas o la interrelación covalente. El tiempo de retención de un agente en la boca depende de la habilidad y el vehículo de aplicación sobre los tejidos orales, la composición y el flujo salival del sujeto, la concentración del agente aplicado, el tiempo de contacto y la frecuencia de aplicación⁴⁹.

5.3. PRINCIPALES AGENTES ANTISÉPTICOS DE USO ODONTOLÓGICO

Dentro de ellos cabe destacar la clorhexidina, el triclosán, los aceites esenciales, los compuestos metálicos y la combinación de varios de ellos⁵⁰.

5.3.1. Clorhexidina

Es un miembro del grupo de las biguanidas, considerado como el agente antiséptico oral más eficaz. Al debilitar la membrana celular de las bacterias, favorece la reducción de placa y caries; asimismo es efectiva en el tratamiento de la gingivitis y otras infecciones orales. Entre sus principales inconvenientes se incluye la producción de tinción de dientes y encías, junto con la alteración de las poblaciones bacterianas orales normales con el uso prolongado. En consecuencia no debe usarse de manera continuada⁵¹ y no se debe incorporar en las pastas dentales por ser incompatible con algunos de sus otros componentes.

⁴⁹ Afseth J, Helgeland K, Bonesvoll P. Retention of Cu and Zn in the oral cavity following rinsing whit aqueous solution of copper and zinc salts. *Scand J Dent Res* 1983; 91: 42-5.

⁵⁰ Brading MG, Marsh PD. The oral environment: the challenge for antimicrobials in oral care products. *Int Dent J* 2003; 53: 353-62.

⁵¹ Sanz M, Vallcorba SF, Muller I, Herkstroter F. The effect of a dentifrice containing chlorhexidine and zinc on plaque, gingivitis, calculus and tooth staining. *J Clin Periodontol* 1994; 21: 431-7.

5.3.2. Triclosán

Es un agente antiséptico muy utilizado por su capacidad multifuncional, aunque su acción antimicrobiana es moderada. Esta cualidad mejora al combinarse con otros agentes antimicrobianos como es el caso de las sales de zinc.

Cuando se utiliza en cremas dentales se asocia con polivinil metil éter y ácido málico para mejorar su retención en la boca. En combinación con el citrato de zinc (0,3 % triclosán y 0,75 % citrato de Zn) reduce la acumulación de placa y mantiene la salud gingival⁵². Su mecanismo de acción se basa en la inhibición de la glicólisis y la reducción de formación de ácidos, inhibiendo el crecimiento bacteriano.

5.3.3. Aceites esenciales

Dentro de este grupo se incluyen el timol, el eucalipto, el metil salicilato y el mentol. Su uso a largo plazo reduce significativamente la placa.

5.3.4. Sales metálicas

Estas sales, solas o junto a otros conocidos agentes antimicrobianos, poseen actividad anti-placa al inhibir la proliferación de bacterias orales. El citrato⁵³, lactato⁵⁴ y sulfato de zinc⁵⁵ así como el nitrato de plata⁵⁶ o el fluoruro de estaño⁵⁷ tienen una demostrada actividad antimicrobiana contra los patógenos periodontales. El ión plata y el ión estaño son efectivos reductores de placa aunque manchan los dientes después de aplicaciones repetidas y

⁵² Finney M, Walker JT, Marsh PD, Brading MG. Antimicrobial effects of a novel Triclosan/Zn citrate dentifrice against mixed culture oral biofilms. *Int Dent J* 2003; 53: 371-8.

⁵³ Santos SL, Conforti N, Mankodi S, Kohut BE, Yu D, Wu MM, Parikh R. Anticalculus effect of two zinc citrate/essential oil-containing dentifrice. *Am J Dent* 2000; 13: 11C-13C

⁵⁴ Winkel EG, Roldan S, Van Winkelhoff AJ, Herrera D, Sanz M. Clinical effects of a new mouthrinse containing chlorhexidine, cetylpyridinium chloride and zinc lactate on oral halitosis. A dual-center, dual-blind placebo-controlled study. *J Clin Periodontol* 2003; 30: 300-6

⁵⁵ Merchant HW, Gangarosa LP, Glassman AB, Sobel RE. Zinc sulfate supplementation for treatment of recurring oral ulcers. *South Med J* 1977; 70: 559-61.

⁵⁶ Spacciapoli P, Buxton D, Rothstein D, Friden P. Antimicrobial activity of silver nitrate against periodontal pathogens. *J Periodontal Res* 2001; 36: 108-13.

⁵⁷ Jackson RJ. Metal salts, essential oils and phenols: old or new? *Periodontol* 2000 1997; 15: 63-73.

alteran el sentido del gusto. En este aspecto, el zinc presenta sobradas ventajas sobre estos iones metálicos⁵⁸. El zinc:

- no mancha los dientes,
- no sensibiliza los tejidos blandos de la cavidad bucal,
- inhibe el crecimiento de la placa y por ende la proliferación bacteriana,
- disminuye la producción de ácido por parte del *Streptococcus mutans* presente en la placa dentaria.

5.4. ANTISÉPTICOS ORALES CON ZINC

El zinc es un excelente antiséptico para las bacterias gram-positivas y *negativas*, posiblemente debido a la astringencia de sus sales, condición poco favorable para el crecimiento bacteriano⁵⁹. El citrato de zinc es un agente antimicrobiano efectivo para prevenir la gingivitis y su progresión hacia la periodontitis⁶⁰. Izaguirre-Fernández y cols⁶¹, han puesto de manifiesto la capacidad inhibitoria del zinc sobre el crecimiento de *S. mutans*, debido al descenso de la acidogénesis de la placa dental. Igualmente, Gallagher y Cutress^{62,63}, han sugerido que el *S. mutans* es el más sensible al zinc de diversas bacterias: *S. mutans*, *S. sanguis*, *S. salivarius*, *Actinomyces viscosus* y *Actinomyces naeslundii*.

Existen estudios que revelan el efecto inhibitorio de los iones de zinc sobre la producción de ácidos en las microbiota oral, demostrándose que, a medida que aumenta la concentración de zinc, se inhibe significativamente la

⁵⁸ Brading MG, Marsh PD. The oral environment: the challenge for antimicrobials in oral care products. *Int Dent J* 2003;53: 353-62.

⁵⁹ Clarke D. Clinical and microbiological effects of oral zinc ascorbate gel in cats. *Vet Dent* 2001; 18: 177-83.

⁶⁰ Sheiham A. Is the chemical prevention of gingivitis necessary to prevent severe periodontitis? *Periodontol* 2000 1997; 15: 15-24.

⁶¹ Izaguirre-Fernandez EJ, Eisenberg AD, Curzon MEJ. Interactions of zinc whit fluoride on growth, Glicólisis and Survival of *Streptococcus mutans* GS-5, *Caries Res* 1989; 23: 18-25.

⁶² He G, Pearce EIF, Sissons CH. Inhibitory effect of ZnCl₂ on glycolysis in human oral microbes. *Arch Oral Biol* 2002; 47: 117-29.

⁶³ Aranha H, Strachan RC, Arceneaux JEL, Byers BR. Effect of trace metals on growth of *Streptococcus mutans* in Teflon chemostat. *Infect Immun* 1982; 35: 456-60.

concentración de bacterias⁶⁴. El cloruro de zinc usado en enjuagues bucales produce un descenso en la acidez de la placa⁶⁵.

También, los iones de Zn^{2+} mejoran la actividad antimicrobiana de algunos agentes antisépticos en las aplicaciones tópicas, debido al hecho de que las sales son solubles en agua y penetran más fácilmente en la piel⁶⁶.

Estas características y la acción antimicrobiana demostrada por el zinc en las enfermedades orales, ha hecho que se estudiara su incorporación en enjuagues o colutorios para disminuir la carga bacteriana en la cavidad oral.

Posiblemente el efecto antimicrobiano del zinc se desarrolle disminuyendo la biosíntesis de las células bacteriana, al reaccionar con el radical monovalente $-SH$ unido al carbono (tiol) contenido en las enzimas. El zinc inhibe la actividad enzimática que controla la glicólisis, protegiendo a los dientes de la actividad de las bacterias después del consumo de carbohidratos fermentables. Produce una reducción de la placa dental por inhibición extracelular de las enzimas productoras de polisacáridos⁶⁷. Actúa en el equilibrio ácido-base durante la producción de placa y en la hidrólisis de la urea a amonio. Este último proceso puede ser favorecer la producción de caries aunque es positivo para la inhibición de la placa dental⁶⁸.

Los iones metálicos (Sn, Ag, Cu y Zn) son agentes con buena substantividad ya que tienen receptores semejantes a los de la clorhexidina a nivel oral, aunque esta última tiende a permanecer por periodos más prolongados en boca. En el caso particular del zinc, éste presenta una buena

⁶⁴ Brody I. Topical treatment of recurrent herpes simplex and post-herpetic erythema multiforme with low concentration of zinc sulphate solution. *Br J Dermatol* 1981; 104: 191-4.

⁶⁵ He G, Pearce EIF, Sissons CH. Inhibitory effect of $ZnCl_2$ on glycolysis in human oral microbes. *Arch Oral Biol* 2002; 47: 117-29.

⁶⁶ Zeelie JJ, McCarthy TJ. Effects of copper and zinc ions on the germicidal properties of two popular pharmaceutical antiseptic agents cetylpyridinium chloride and povidone-iodine. *Analyst* 1998; 123: 503-7.

⁶⁷ Brading MG, Cromwell VJ, Bebington J, Baldeck JD, Marquis RE. Anti-microbial efficacy and more of action studies on a new zinc/triclosan formulation. *Int Dent J* 2003; 53: 363-70.

⁶⁸ Wong L, Sissons CH, Pearce EI, Cutress TW. Calcium phosphate deposition in human dental plaque microcosm biofilms induced by a ureolytic pH-rise procedure. *Arch Oral Biol* 2002; 47: 779-90.

substantividad en boca. La retención de zinc se incrementa más de 10 veces después de aplicaciones repetidas⁶⁹. Finney y cols⁷⁰ han demostrado que el zinc contenido en las pastas dentales en forma de citrato de zinc con triclosán es retenido en boca durante más tiempo que el triclosán por si solo. La penetración de zinc en la placa se ve facilitada cuando se realiza un enjuague con mayores concentraciones de zinc a un pH más bajo⁷¹.

5.5. PRODUCTOS DE USO ODONTOLÓGICO COMERCIALIZADOS EN ESPAÑA QUE CONTIENE ZINC

→ Colutorios:

- Acetato de zinc (0,34 g) y digluconato de clorhexidina (0,006 g) (*orthokin*®)
- Lactato de zinc (0,14%), digluconato de clorhexidina (0,05%) y cloruro de cetilpiridinio (0,05%), (*Halita*®).
- Cloruro de zinc (0,20 g), triclosán (0,15 g), alantoína (0,20 g); (*Gingilacer*®)
- Cloruro de zinc 0,05 g, triclosán (0,15 g), fluoruro sódico (0,05 g) y xilol (1 g); (*Lacer*®).
- Citrato de zinc (0,5 g), triclosán (0,3 g), nitrato potásico (5 g), monofluorofosfato sódico (0,8 g), fluoruro sódico (0,32 g), pantenol (1 g) aldioxa (0,2 g); (*Lacer Oros*®).
- Cloruro de zinc (0,09%., aceites esenciales (*Listerine plus*®).
- Cloruro de zinc (0,05 g), fluoruro sódico (0,05 g); (*Listerkid*®)

→ Pastas dentales:

- Citrato de zinc (0,5 g), triglosan (0,3 g), monofluorofostafa sódico (1,13 g), sacarina sódica (0,1 g) (*Gingilacer*®).

⁶⁹ Brading MG, Marsh PD. The oral environment: the challenge for antimicrobials in oral care products. *Int Dent J* 2003; 53: 353-362.

⁷⁰ Finney M, Walker J, Marsh P, Brading M. Antimicrobial effects of a novel triclosan/zinc citrate dentifrice against mixed culture oral biofilms. *Int Dent J* 2003; 53: 371-378.

⁷¹ He G, Pearce EIF, Sissons CH. Inhibitory effect of ZnCl₂ on glycolysis in human oral microbes. *Arch Oral Biol* 2002; 47: 117-129.

- Citrato de zinc (0,5 g), triglosan (0,3 g), monofluorofosfato sódico (0,8 g), nitrato potásico (5 g), pantenol (1 g), aldioxo (0,2 g) (*Lacer Oros®*)⁷²

⁷² Sociedad Española de Periodoncia y Osteointegración. Vademecum de Higiene Oral. Madrid: Editorial Dital, SAL; 2000.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Muchos de los productos odontológicos presentes actualmente en el mercado contienen además de zinc, otros agentes antisépticos como la clorhexidina o el triclosán. Sin embargo, el conocimiento sobre el comportamiento específico del zinc, fundamentalmente sobre su substantividad en boca, es escaso. Al zinc se le atribuyen dos acciones principales en la cavidad oral: acción antimicrobiana y acción cicatrizante.

Por ello, la determinación de los niveles de zinc en la saliva podría servir como un indicador del estado microbiológico bucal y de la salud oral. Al mismo tiempo, la administración de zinc, potenciaría el efecto antimicrobiano, disminuyendo la cantidad de microorganismos en boca y reduciendo su potencial patógeno.

El pH salival es uno de los factores que más condicionan el desarrollo de enfermedades en la mucosa oral y de la caries dental. Además, las variaciones del pH influyen en el tiempo de permanencia del zinc en la cavidad oral, aumentando por tanto su substantividad.

Los objetivos planteados en el presente estudio son:

- Determinar la substantividad del zinc, el tiempo de permanencia en la saliva, después de realizar enjuagues con dos sales de zinc a distintas concentraciones.
- Cuantificar el posible efecto antimicrobiano del zinc sobre la microbiota oral, específicamente sobre el *Streptococcus mutans*, el principal agente etiológico implicado en la caries dental, mediante el recuento de las unidades formadoras de colonias por mililitro de saliva (UFC/mL).

- Establecer la concentración de zinc con un mayor efecto antimicrobiano atendiendo al porcentaje de reducción de UFC/mL de saliva.
- Analizar las posibles variaciones del pH de la saliva tras los enjuagues con diferentes sales de zinc a distintas concentraciones.

MATERIAL Y MÉTODOS

El diseño y desarrollo de este trabajo se estructuró en dos fases:

- Un estudio preliminar, que tuvo como objeto escoger diferentes sales de zinc y fijar la/s concentración/es más adecuada/s para ser utilizadas como enjuague bucal según su substantividad y su acción antimicrobiana. En este estudio se determinaron los niveles medios de zinc en saliva a distintos intervalos de tiempo.
- Un estudio definitivo en el que, del grupo de sales de zinc anteriores, se escogieron dos sales (sulfato y acetato de zinc) a tres concentraciones diferentes (0,1%, 0,5% y 1%). En este estudio se establecieron en distintos intervalos de tiempo los niveles medios de zinc en saliva, se evaluó la sensación astringente, el porcentaje de reducción de las unidades formadoras de colonias de *Streptococcus mutans* por mililitro de saliva (UFC/mL) y se midieron los niveles medios de pH salival.

En ambos estudios se aplicó el mismo protocolo de recogida de datos, la misma metodología para la determinación de las concentraciones de zinc en saliva.

1. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA

1.1 ESTUDIO PRELIMINAR

La muestra estaba compuesta por 20 miembros de la comunidad universitaria (alumnos/as, profesores/as y personal de administración y servicios) 10 mujeres y 10 hombres, con edades comprendidas entre los 20 y los 45 años y una edad media de $29,80 \pm 7,16$ años, de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

1.2 ESTUDIO DEFINITIVO

En el estudio definitivo, la población estaba compuesta por miembros de la comunidad universitaria (alumnos/as, profesores/as y personal de administración y servicios) de la Facultad de Odontología de la Universidad de Granada, España. Un total de 44 sujetos: 29 mujeres (el 65,9%) y 15 hombres (el 34,1%), con edades comprendidas entre los 20 y los 62 años y una edad

media de $30,84 \pm 9,42$ años (mujeres: $30,0 \pm 9,9$ años; hombres: $32,0 \pm 7,8$ años) fueron incluidos. No existen diferencias significativas entre los grupos de población en cuanto a su edad y su sexo.

A todos los sujetos incluidos en ambos estudios se les proporcionó la información necesaria acerca de los propósitos de los mismos con el fin de obtener su consentimiento.

Entre los criterios de exclusión para ambos estudios se encontraban:

- Sujetos que habían tomado antibióticos en los 10 días anteriores a la realización del muestro.
- Mujeres que estaban menstruando, que tomaban anticonceptivos o que estaban embarazadas.
- Individuos que presentaran alteraciones gastrointestinales que pudieran interferir con el metabolismo del zinc.
- Aporte adicional de zinc (complejos vitamínicos, productos odontológicos, etc.)

2. PROTOCOLO DE RECOGIDA DE DATOS CLÍNICOS

En ambos estudios consistió en la cumplimentación de una ficha clínica (Anexo 1), en la que se recogieron los siguientes datos:

- Datos personales: filiación completa del sujeto, edad, sexo y ocupación.
- Antecedentes personales:
 - Padecimiento de enfermedades sistémicas.
 - Ingesta de medicamentos (tipo; dosis y vía de administración).
 - Ingesta de complejos vitamínicos, composición de los mismos y frecuencia de uso.
 - Consumo de tabaco: cantidad diaria y tiempo.

- Ingesta de alcohol: cantidad diaria y tiempo.
 - En el caso de mujeres: uso de anticonceptivos orales, embarazo o menstruación.
-
- Datos sobre los hábitos de higiene oral y los productos odontológicos utilizados (tipo de dentífrico y/o colutorio; frecuencia).

3. PREPARACIÓN DE LOS ENJUAGUES CON DISTINTAS SALES DE ZINC A DIFERENTES CONCENTRACIONES

3.1. ESTUDIO PRELIMINAR

En este estudio se utilizaron 4 sales a 5 concentraciones diferentes (tabla 4):

Tabla 4: Sales utilizadas en el estudio preliminar.

Sales	Concentraciones
Cloruro de zinc (Merck, Alemania)	0,05%; 0,1%; 0,3%; 0,5%; 1,0%
Nitrato de zinc (Merck, Alemania)	0,05%; 0,1%; 0,3%; 0,5%; 1,0%
Acetato de zinc (Guinama, SL, España)	0,05%; 0,1%; 0,3%; 0,5%; 1,0%
Sulfato de zinc (Guinama SL, España)	0,05%; 0,1%; 0,3%; 0,5%; 1,0%

3.2. ESTUDIO DEFINITIVO

Para este estudio, de las 4 sales del estudio preliminar se seleccionaron dos: el acetato y el sulfato de zinc. Se desechó el uso del nitrato de zinc ya que no mostró una permanencia significativa en boca; y del cloruro de zinc, puesto que, a pesar de tener excelente comportamiento, en España no está permitido su uso en humanos.

Por tanto, para el estudio definitivo, se prepararon enjuagues de sulfato y acetato de zinc (ver especificaciones de las sales en el anexo 2). Para cada sal se determinaron 3 concentraciones de zinc: 0,1%, 0,5% y 1,0% (tabla 5). Se

calculó la cantidad de sal necesaria para preparar 500 mL de solución en cada una de las concentraciones. Igualmente se preparó una solución placebo con agua destilada para su administración al grupo control.

Tabla 5: Sales utilizadas en el estudio definitivo.

Sales	Concentraciones
Acetato de zinc (Guinama, SL, España)	0,1%; 0,5%; 1,0%
Sulfato de zinc (Guinama SL, España)	0,1%; 0,5%; 1,0%

Como en ambos estudios se utilizan sales de zinc, para calcular las concentraciones en base al zinc, se hace necesario calcular la cantidad de sal a utilizar tomando en cuenta la masa atómica del zinc (65,4 g/mol), y el peso molecular de la sal a utilizar, teniendo en cuenta que en cada molécula de sal hay un átomo de zinc, siguiendo la siguiente formula:

Peso molecular de la sal / Peso atómico del Zinc = gramos de sal necesarios para obtener una solución al 1% de zinc (1 gramo de zinc en 100 mL de agua destilada). Para preparar 500 mL se multiplica por 5.

Para preparar 500 mL de solución 1 % de Zn, se necesitan:

$$287,54/65,4= 4,3966 \text{ g} \times 5 = 21,9832 \text{ g de sulfato de zinc y}$$

$$219,50/65,4= 3,356 \text{ g} \times 5 = 16,7813 \text{ g de acetato de zinc.}$$

De la misma manera se calcula la cantidad de cada sal necesaria para preparar las siguientes concentraciones: 0,05%, 0,1%, 0,3%, 0,5% y 1% de zinc (Tabla 6).

Tabla 6. Preparación de los enjuagues (gramos de sal en 500 mL)

Tipo de sal		Peso Molecular (g/mol)	0,05%	0,1%	0,3%	0,5%	1,0%
Cloruro de zinc	ZnCl ₂ (seco)	136,28	0,5215	1,0431	3,1293	5,2155	10,4309
Nitrato de zinc	Zn(NO ₃) ₂ 4H ₂ O	261,44	0,9997	1,9994	5,9983	9,9972	19,9943
Sulfato de zinc	ZnSO ₄ 7H ₂ O	287,54	1,0992	2,1983	6,5949	10,9916	21,9832
Acetato de zinc	Zn(CH ₃ COO) ₂ 2H ₂ O	219,50	0,8391	1,6781	5,0343	8,3907	16,7813

La cantidad de sal determinada se pesa en una balanza de precisión (AND. Modelo HM 202. A&D Company Engineering, Inc Mel pins, CA, USA), se coloca en un frasco Erlenmeyer y se añade agua destilada hasta completar los 500 mL de solución mezclando hasta su disolución completa (figura 6). Los distintos enjuagues de zinc preparados se guardan en envases de plástico con cierres herméticos idénticos y adecuadamente marcados.

**Figura 6.** Preparación de los enjuagues.

4. RECOGIDA DE MUESTRAS DE SALIVA Y REALIZACIÓN DE LOS ENJUAGUES CON DIFERENTES SALES DE ZINC

La recogida de muestra de saliva total es una técnica no invasiva, indolora, rápida y de fácil ejecución. Para cada individuo se tienen preparados dos conillos de plástico tipo Eppendorf de 1,5 mL destinados a la recolección de las muestras, para el estudio analítico del zinc y microbiológico del *Streptococcus mutans* con el objeto de minimizar las variaciones circadianas.

Para minimizar la posibilidad de contaminación de la muestra con restos de comida, antes de iniciar el proceso de recolección, el sujeto es instruido para que realice tres enjuagues consecutivos con porciones de 10 mL de agua destilada.

Se recogió la saliva total no estimulada, donde todos los sujetos estaban sentados y con la cabeza inclinada un poco hacia delante; con la boca cerrada, sin mover la lengua y los labios y sin tragar durante 1 minuto. La saliva acumulada, denominada muestra basal, se escupe en el envase correspondiente, debidamente codificado.

A continuación se procede a la realización de los enjuagues con distintas sales de zinc a diferentes concentraciones e intervalos de tiempo. Para ello se le indica al individuo que realice un enjuague con 10 mL de la solución asignada durante un minuto. Inmediatamente después se recoge una nueva muestra de saliva. Se repite este mismo procedimiento de muestreo cada 30 minutos por un lapso de dos horas.

4.1. ESTUDIO PRELIMINAR

A los veinte sujetos involucrados en este estudio se les repartieron al azar las soluciones de zinc preparados a las distintas concentraciones. Una vez realizados los enjuagues, se recogieron muestras de saliva a los 30 minutos,

60 minutos, 90 minutos y 120 minutos tras el enjuague. De esta manera, junto de la muestra basal, para cada individuo hay un total de 5 muestras de saliva según los periodos establecidos en el diseño inicial del estudio.

4.2. ESTUDIO DEFINITIVO

La muestra de este estudio fue dividida en dos grupos, para la aplicación del enjuague:

- Grupo I. Compuesto por 23 sujetos (15 mujeres y 8 varones) con edades entre 21 y 51 años al cual se le aplicó el colutorio de sulfato de zinc (n=23) a diferentes concentraciones (0,1%; 0,5% y 1%) y un control en cada concentración al que se le aplicó un colutorio placebo de agua destilada.
- Grupo II. Formado por 21 sujetos (14 mujeres y 7 varones) con edades comprendidas entre 20 y 45 años al cual se le aplicó colutorio de acetato de zinc (n=21) a diferentes concentraciones (0,1%; 0,5% y 1%); y un control en cada concentración al que se le aplicó un colutorio placebo de agua destilada. La distribución de los sujetos en los grupos se detalla en el anexo 3.

A todos los sujetos de estos grupos se les recogió también una muestra basal antes del enjuague con la solución asignada; este proceso se repitió en cada individuo a los 30 minutos, 60 minutos, 90 minutos, 120 minutos y 24 horas tras el único enjuague. De esta manera, para cada sujeto hay un total de 6 muestras de saliva según los periodos establecidos en el diseño del estudio.

Un pool de saliva obtenido de varios donantes escogidos al azar se utilizó para optimización de los parámetros instrumentales de las técnicas analíticas empleadas para la determinación de zinc.

Antes de iniciar el procesamiento de las muestras, las mismas se sacaron del congelador (Radiber S.A., España) donde se guardaron a -20°C y se dejaron alcanzar la temperatura ambiente sin ningún tipo de calentamiento.

Justo antes de realizar las medidas analíticas, cada muestra fue homogeneizada al agitarla en un vortex (Heidolph, modelo Reax 1). Esta acción se ha incluido en el procedimiento, ya que las muestras se han podido estratificar durante el almacenamiento debido al fraccionamiento gravitacional vertical de los componentes orgánicos de la saliva, que podrían enlazar parte del zinc contenida en la muestra¹⁷³

5. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE ZINC EN SALIVA

5.1. ASPECTOS TEÓRICOS

La espectroscopia atómica comprende tres técnicas analíticas: absorción, emisión y fluorescencia atómica¹⁷⁴. Para entender sus fundamentos, es necesario tener conocimientos básicos mínimos sobre el átomo y su interacción con la luz, proceso específico para cada una de estas técnicas.

El átomo está constituido por un núcleo rodeado de electrones. Cada elemento tiene una estructura electrónica única. La configuración más estable y de mas bajo contenido energético para cualquier átomo se conoce como “estado fundamental”. Si al átomo se le proporciona una energía adecuada, este la absorbe y sus electrones más externos saltan a un nivel de energía superior pero menos estable, llamado “estado excitado”. El electrón tratará de volver a su estado de estabilidad energética de manera espontánea, emitiendo la energía correspondiente a la diferencia de energía entre el nivel excitado que lo albergó y el fundamental desde donde se excitó (figura 7).

¹⁷³ Siginolfi GP, Gorgona C, Bonori O, Canton E, Martelli M, Somonetti L. Comprehensive determination of trace elements in human saliva by ET-AAS. *Microchim Acta* 1989; 1: 171-9

¹⁷⁴ Welz B, Sperling M. *Atomic Absorption Spectrometry*. 3rd ed. Weinheim (Germany): Willey-VCH; 1999.

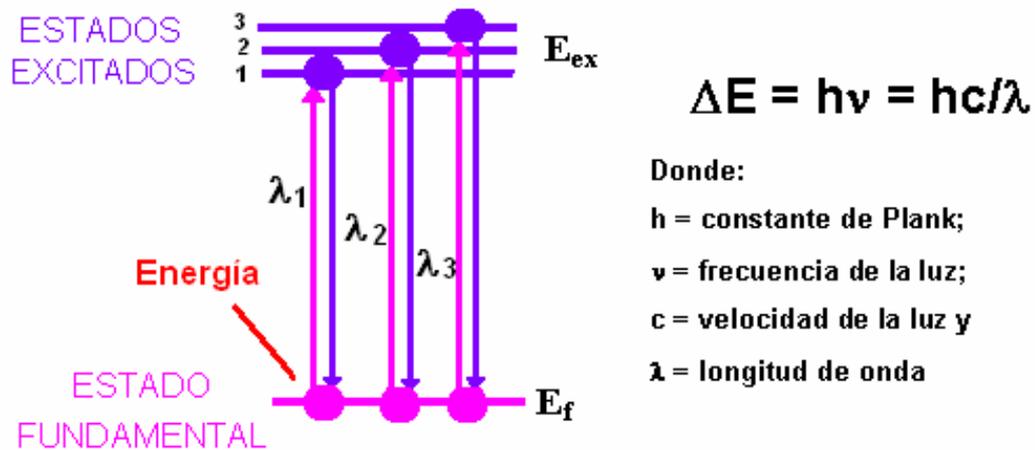


Figura 7. Proceso de excitación y decaimiento de un átomo

Cualquier elemento tiene numerosas transiciones electrónicas posibles, y cada una puede resultar en absorción y emisión de luz de una determinada longitud de onda ($\lambda_1, \lambda_2, \lambda_3$). La energía absorbida o emitida a cierta longitud de onda es proporcional a la cantidad de átomos en estado fundamental o excitado, respectivamente y, en consecuencia, es proporcional a la concentración del elemento en una muestra.

Estos procesos forman el fundamento teórico de las mencionadas técnicas espectroscópicas que son capaces de detectar y determinar cuantitativamente la mayoría de los elementos de la tabla periódica

Centramos nuestro interés en la espectroscopia de absorción atómica (EAA), que mide la energía absorbida en el paso de excitación (figura 8). La EAA utiliza como fuente energética de atomización (atomización térmica a través de EEA-llama) o un horno de grafito (atomización electrotérmica o EAA-AE). En ambos casos, los átomos en estado fundamental absorben energía proveniente de la lámpara cuyo cátodo está fabricado del elemento analizado. Esta particularidad le impone un carácter selectivo a esta técnica.

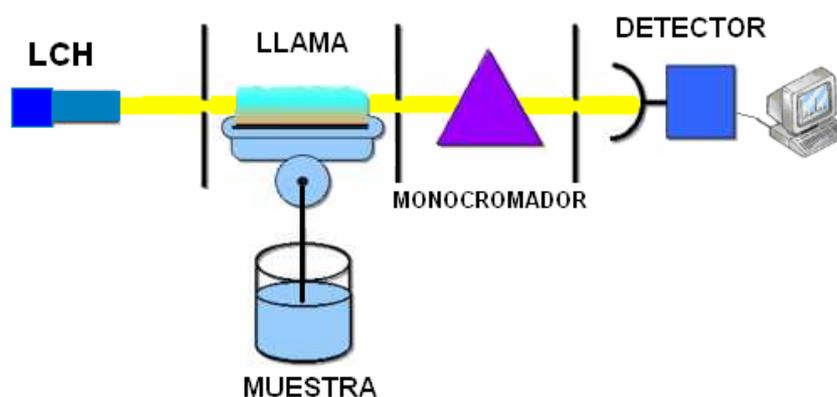


Figura 8. Componentes del equipo usado en espectroscopia de absorción atómica.

Los campos de aplicación de esta técnica son muy diversos: últimamente se emplea sobre todo en el análisis de trazas de elementos metálicos en minerales, muestras biológicas, metalúrgicas, petroquímicas, farmacéuticas, alimentos y del medio ambiente.

5.2. DETERMINACIÓN DE ZINC EN SALIVA POR EAA-AE.

La concentración de zinc en la mayoría de los fluidos y tejidos biológicos es relativamente alta (en el rango de los mg/L o $\mu\text{g/g}$, respectivamente), por lo que la técnica de EAA-llama es suficientemente sensible para medir los niveles de este elemento en tales muestras.

En algunos otros especímenes biológicos, tales como constituyentes crepusculares de la sangre, fluido seminal, saliva, etc., los niveles de zinc son muy bajos (en el rango de los $\mu\text{g/L}$), lo que demanda el uso de técnicas analíticas mucho más sensibles para su detección. EAA-AE tiene una sensibilidad extrema para el zinc ya que son conocidas las bajas energías de disociación de las sales de zinc, comparadas con las de otros elementos de transición; por esta razón, el número de átomos de zinc en estado fundamental dentro del horno de grafito es muy grande.

Con EAA-EA, se puede detectar hasta una concentración de 10 ng Zn/L o una cantidad de 0,1 pg de Zn, si se toma en consideración que para la determinación en el tubo de grafito se inyectan 10 μ L de solución patrón o de muestra¹⁷⁵. En vez de ser una ventaja, esta alta sensibilidad causa graves problemas por efectos de contaminación; por lo tanto, el muestreo se debe hacer con los utensilios adecuados, las muestras se deben manipular bajo estrictas condiciones de limpieza y los aditivos y/o reactivos usados deben ser de alta pureza.

El riesgo de contaminación de las muestras por aditivos o por el mal manejo de los procedimientos de muestreo y procesamiento de las muestras está siempre latente y se deben tomar todas las precauciones necesarias para evitarlo¹⁷⁶. Adicionalmente, son conocidos los problemas de interferencias debidas a la complejidad de la matriz de la muestra que producen absorción no-atómica con el consecuente aumento de la señal de fondo. Existen varias formas que pueden evitar estos problemas, tales como: la dilución o digestión de la muestra, el uso de modificadores de matriz o el empleo de un corrector adecuado de la señal de fondo¹⁷⁷. En este trabajo, no fue posible el digerir las muestras con ácidos minerales (ácido nítrico), o usar modificadores de matriz (nitrateo de paladio) debido al contenido relativamente alto de zinc en estos reactivos, que resultó en una señal de fondo alta.

Agua Milli-Q de alta pureza (con una resistividad de 18 m Ω /cm) obtenida en un sistema Millipore se utilizó para preparar la solución patrón (1000 mg/L) o los estándares diarios en el rango de 0-6,0 μ g/L de zinc, necesarios para construir la curva de calibración. Las soluciones se guardaron en envases de poliestireno con tapas herméticas del mismo material que habían sido lavados con EDTA al 2% y abundante agua para eliminar cualquier traza de zinc.

¹⁷⁵ Slavin W, Graphite Furnace AAS. A Source Book. Norwalk (USA): Perkin-Elmer Corporation, Order n°. 0993-8139; 1984.

¹⁷⁶ Welz B, Sperling M. Atomic Absorption Spectrometry, 3rd ed. Weinheim (Germany): Wiley-VCH; 1999.

¹⁷⁷ Sighinolfi GP, Gorgona C, Bonori O, Canton E, Martelli M, Simonetti L. Comprehensive determination of trace elements in human saliva by ETAAS. Microchim Acta 1989; 1: 171-9.

Para la determinación de zinc en saliva basal y en la de 24 horas después del enjuague se utilizó el equipo de EAA marca Perkin-Elmer modelo 4100 ZL con corrector de la señal de fondo Zeeman, una lámpara de cátodo hueco de zinc, tubos de grafito pirolíticos con plataformas de L'vov integradas y calentamiento transversal.

Los patrones o la muestra se inyectan en el horno de grafito por intermedio de un automuestrador modelo AS-71, también marca Perkin-Elmer (figura 9).

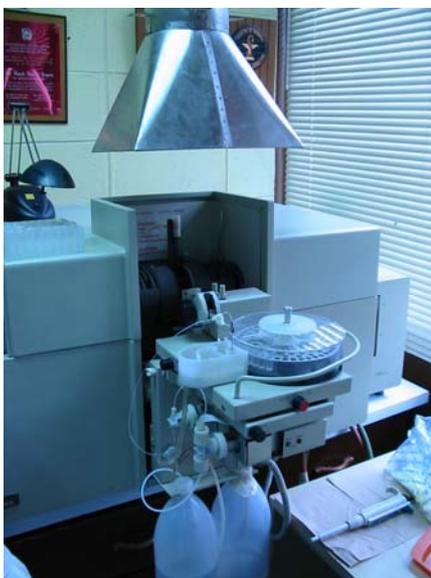


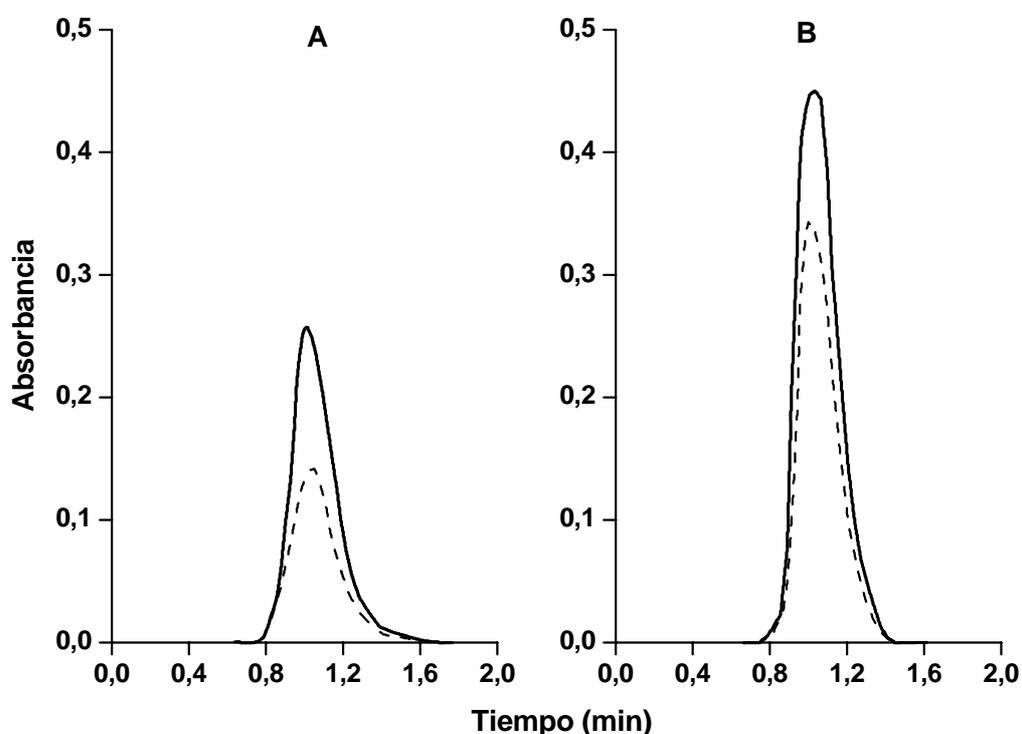
Figura 9. Equipo de espectroscopia de absorción atómica con atomización electrotérmica PE 4100.

Se utilizó gas argón con 99,99% de pureza para purgar y enfriar el interior del tubo de grafito. El control del instrumento lo tiene un ordenador marca Epson modelo EL 486 UC dotado del software PE4100PC versión 7.3 bajo el sistema Gem Desktop, versión Gem/3.

Los valores de absorbancia integrada (área de pico), el perfil de las señales analíticas (Gráfica 2) y los datos estadísticos, se imprimen en una impresora Epson LX-810.

El procedimiento analítico consiste en lo siguiente:

- A. Las muestras descongeladas y homogeneizadas con el Vortex por 1 minuto, se diluyen 1:20 (50 μL de saliva en 950 μL de agua) o 1:50 (20 μL de saliva en 980 μL de agua), según su contenido de zinc.



Gráfica 2. Perfiles de las señales analíticas para (A) una solución patrón de zinc (1 $\mu\text{g/L}$) y (B) una muestra de saliva.

- B. Para cada medida, se inyectan 10 μL de muestra diluida en el tubo de grafito, que luego se somete a dos pasos de secado (uno

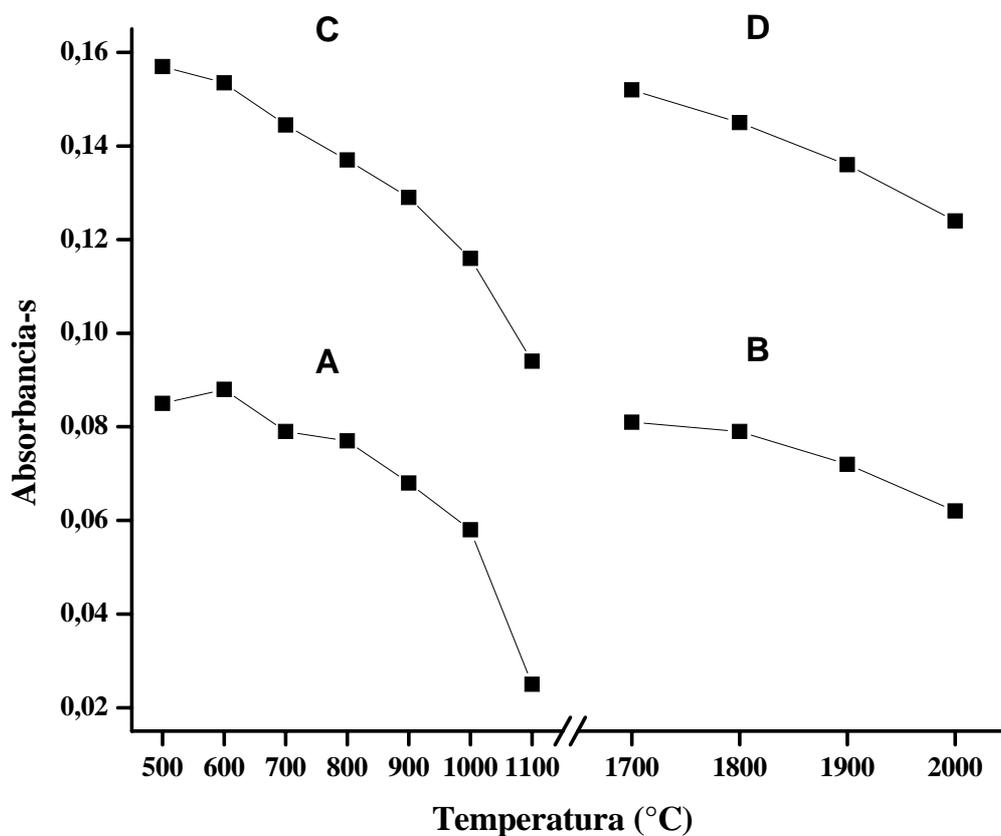
a 90 °C y el otro a 130 °C) seguidos por uno de pirolisis a 700 °C y uno de atomización a 1700 °C.

Para encontrar estos valores óptimos se determinaron las temperaturas y los tiempos de secado, pirolisis y atomización de los patrones de zinc y de las muestras de saliva siguiendo el criterio de un factor a la vez, y empezando con el programa de temperatura recomendada en el manual de operación de la Perkin-Elmer.

Se asegura un secado eficiente y sin pérdidas por salpicaduras al aplicar dos pasos largos de 20 y 30 segundos respectivamente a 90°C y a 130°C combinados con rampas rápidas (<5 segundos). Estas condiciones mejoran la precisión considerablemente (>3%).

Se pudo usar una temperatura de pirolisis de 700°C sin pérdidas de zinc tanto en los patrones como en las muestras, indicando una estabilización térmica similar.

Con respecto a la atomización, se observó un incremento de la respuesta con el aumento de la temperatura hasta 1700°C después de la cual, la señal disminuye abruptamente (Gráfica 3).



Gráfica 3. Curvas de pirolisis (A y C) y atomización (B y D) para zinc en solución patrón y en una muestra de saliva, respectivamente

Los perfiles de absorción para patrones acuosos son similares a los de saliva con respecto a la forma y el tiempo de aparición, lo que confirma que la matriz salival actúa como modificador de matriz sin la necesidad de aditivos externos que podrían introducir contaminación.

Entre los ciclos de tratamiento térmico de una muestra y otra se intercala un paso de limpieza a 2400°C por 3 segundos para volatilizar cualquier resto de sales inorgánicas o de material orgánico en el tubo de grafito. Los resultados obtenidos se indican en la tabla 7.

Tabla 7. Condiciones instrumentales para la determinación de Zn por EAA-AE

Temperatura (°C)	Tiempo (s)		Flujo de argón (mL/min.)	Etapa
	Rampa	Permanencia		
110 (120)	1 (10)	20 (5)	250(300)	(secado)
130 (240)	5 (15)	30 (5)	250(300)	(secado)
700 (700)	10 (10)	20 (5)	250 (300)	(pirólisis)
1700 (2200)	0 (1)	5 (4)	50 (0)	(atomización)
2400 (2200)	1 (1)	3 (3)	250 (300)	(limpieza)

Otras condiciones: Longitud de onda: 213,9 nm; rendija: 0,7nm; corriente de lámpara: 15 mA; tiempo de lectura: 2,5 s. En paréntesis se presentan las condiciones recomendadas por el manual del equipo.

C. Para disminuir la sensibilidad, se usa un flujo de argón de 50 mL/min durante el paso de atomización.

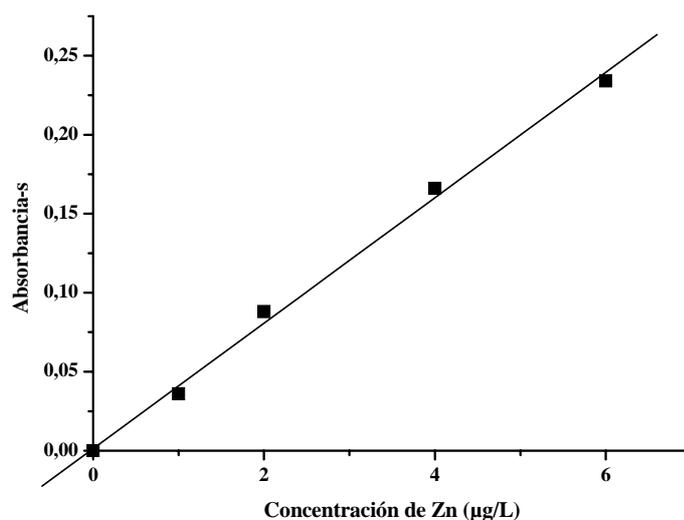
Existen diferentes maneras de disminuir la sensibilidad de la EAA-AE:

- Mediante el uso de una línea atómica alternativa a la resonante.
- La dilución con un reactivo apropiado.
- La introducción de un flujo de argón durante la etapa de atomización.

La línea atómica del zinc a 307,6 nm; es mil veces menos sensible que la resonante a 213,9 nm, lo que la hace demasiado insensible para ser usada en este trabajo. El uso de ácidos minerales para digerir o diluir las muestras se mostró inapropiado debido a señales irreproducibles de blanco, mientras que la dilución con agua pura por encima de las proporciones indicadas en el procedimiento, conduce a la pérdida de la reproducibilidad aceptada en las medidas analíticas (<3%). La tercera alternativa es menos riesgosa: un flujo de argón de 50 mL/min disminuyó la sensibilidad al nivel deseado, sin necesidad de utilizar altas diluciones.

Se utilizó el promedio de tres determinaciones de la absorbancia integrada para los cálculos finales de la concentración de zinc. Obviamente, se tomó en consideración el factor de dilución.

Bajo estas condiciones, se construyó la curva de calibración (Gráfica 4) en el rango 0,0 a 6,0 $\mu\text{g/L}$ que obedece la ecuación: $\text{Abs} = 0,00132 + 0,0397 [\text{Zn}]$ con un coeficiente de correlación (r) de 0,9984 y que se usó para calcular los niveles de Zn en las muestras de saliva basal, en las muestras recogidas después de 24 horas de realizar el enjuague y en todas las muestras obtenidas de los voluntarios que se enjuagaron con agua destilada (controles).



Gráfica 4. Curva de calibración para la determinación de Zn en saliva por EAA-AE

Con el objeto de estimar el efecto de las proteínas salivales que enlazan parte del zinc en las muestras, se construyeron curvas de adición estándar. Las pendientes de estas curvas no fueron estadísticamente distintas a la pendiente de la curva preparada con patrones acuosos, por lo que esta curva se utilizó para estimar la concentración de zinc en las muestras de saliva.

El límite de detección, calculado como tres veces la desviación estándar de diez medidas consecutivas del blanco fue de 0,35 $\mu\text{g/L}$ que corresponde a 3,5 pg en los 10 μL de muestra introducida en el horno de grafito. Por otra parte, la sensibilidad, definida como la cantidad de zinc necesaria para producir

una respuesta instrumental de 0,00044 unidades de absorbancia, es de 4,8 pg de zinc.

La precisión, expresada como la desviación estándar relativa (DER%) se determinó midiendo la absorbancia de diez muestras de saliva escogidas al azar del total de 44 muestras de saliva basal. En todos los casos, la DER fue <3%. Un control periódico de la señal del blanco es mandatorio, ya que cualquier aumento de este valor es un indicativo claro de contaminación.

La validez del procedimiento propuesto se demostró de dos maneras:

- Mediante pruebas de recuperación en el rango lineal. Para tales efectos, se añadieron cantidades conocidas de zinc a muestras de saliva previamente analizadas. El promedio de recuperación del zinc añadido fue de $97,8 \pm 1,3\%$ (nunca menor a 95%). La formula para el calculo del porcentaje de recuperación (R) fue la siguiente:

$$R(\%) = \frac{[\text{Zn}] \text{ recuperado}^*}{[\text{Zn}] \text{ añadido}^{**}}$$

*[Zn] recuperado= [Zn] total - [Zn] endógeno

** [Zn] endógeno = [Zn] en las muestras, obtenido previamente.

- Mediante el uso de una técnica alterna como EAA-llama. Se determinó la concentración de zinc en diferentes muestras de saliva después de añadirles cantidades conocidas del elemento. Se demostró de esta manera la exactitud del procedimiento propuesto al encontrarse coincidencias en los resultados. No se encontraron diferencias entre los valores obtenidos por ambos métodos, con una ecuación de represión lineal $Y=1,005 + 0,08 (r= 0,9970)$, donde X y Y son concentraciones de zinc determinadas por EAA-AE y por EAA-llama con adición estándar, respectivamente.

5.3. DETERMINACIÓN DE ZINC EN SALIVA DESPUÉS DEL ENJUAGUE POR EAA- LLAMA

Dadas las relativamente altas concentraciones de zinc en las muestras recolectadas después de usar el colutorio, las mismas fueron procesadas por la técnica de EAA-llama (Equipo de espectroscopia de absorción atómica con atomización en llama. Marca Perkin-Elmer Modelo 3100 con lámpara de cátodo hueco de Zn y mechero para llama de aire/acetileno controlado por un software Gem Desktop de la Perkin-Elmer), (figura 10).



Figura 10. Equipo de espectroscopia de absorción atómica con llama.

El método de inyección en flujo continuo (IFC) acoplado a la técnica EAA-llama permite la incorporación de pequeños volúmenes de muestra (microlitros) en un flujo portador (agua) propulsado por una bomba peristáltica que lo lleva al detector¹⁷⁸ (figura 11).

¹⁷⁸ Burguera JL. Flow Injection Atomic Spectrometry. Practical Spectroscopy Series, Vol. 7. New York: Marcel Dekker; 1989.



Figura 11. Sistema IFC-EAA-llama para la determinación de Zn en saliva

Después de agitar las muestras en un Vortex por aproximadamente 5 min., un volumen de 40 μ l, medidos cuidadosamente con una jeringa Hamilton, se inyecta en el sistema de flujo continuo a través del septum de un inyector doméstico (tipo cromatografía de gases) cuyo esquema se muestra en la figura 11. La longitud del tubo de dispersión que une el inyector con el nebulizador del equipo detector puede variarse para cumplir su propósito: de disminuir (cuando es muy largo) o aumentar (cuando es muy corto) la sensibilidad del equipo para el elemento en estudio (por dilución y/o dispersión). Para el propósito de este trabajo, la longitud de este tubo se debe mantener lo más corto posible para evitar la dilución y/o dispersión del segmento de muestra antes de llegar al detector.

Las señales analíticas (Figura 12) son procesadas por un ordenador personal dotado del software adecuado.

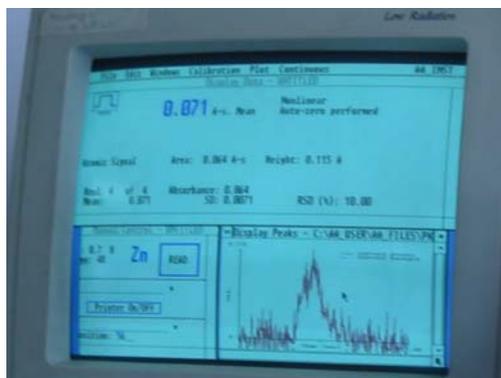


Figura 12. Respuesta instrumental en el sistema IFC-EAA-llama.

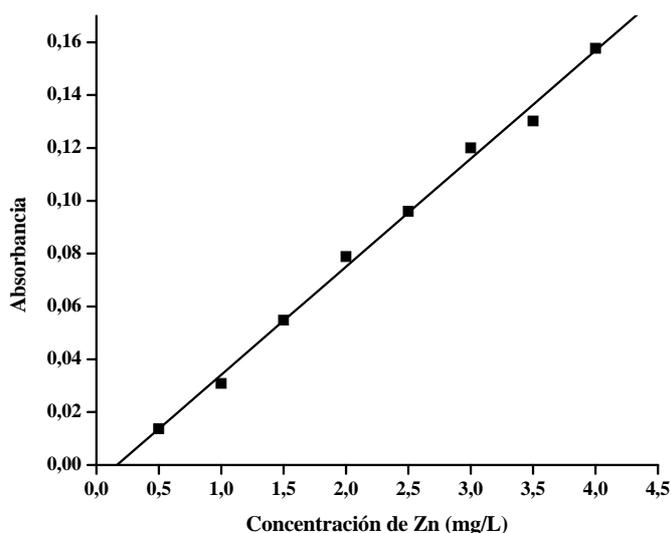
Los parámetros experimentales óptimos correspondientes al sistema de inyección en flujo continuo (velocidad del flujo portador, volumen de inyección, dimensiones del tubo de dispersión) y espectroscópicos (longitud de onda, corriente de la lámpara de cátodo hueco, ancho de rendija de entrada al monocromador, posición del mechero y composición de la llama) se optimizaron usando también la estrategia de un parámetro a la vez hasta obtener la mejor señal analítica en términos de sensibilidad y precisión. Los mismos se listan en la tabla 8.

Tabla 8. Parámetros óptimos para la determinación de zinc en saliva por EAA-llama.

PARAMETRO	VALOR
Longitud de onda (nm)	213,9
Rendija del monocromador (nm)	0,7
Corriente de la lámpara de Zn (mA)	15
Energía	48
Flujo de la bomba peristáltica (mL/min)	5,2
Flujo de oxidante (aire) (L/min.)	16,5
Flujo de combustible (acetileno) (L/min)	1,5
Volumen de inyección (µL)	40
Respuesta instrumental	Absorbancia
Tiempo de agitación de la muestra (min)	5

nm: nanometros, mA: miliamperios, mL/min.: mililitros por minutos, L/min.: litro por minuto, µL: microlitros, min.: minutos.

Bajo estas condiciones se obtuvo una curva de calibración lineal en el rango 0,2 a 4,0 mg Zn/L que obedece a la ecuación: $Abs. = 0,00293 + 0,03764 \times [Zn]$ con $R = 0,9998$ (Gráfico 5) que se usó para calcular los niveles de Zn en las muestras de saliva obtenidas entre los 30 y los 120 minutos después del enjuague.



Gráfica 5. Curva de calibración para la determinación de Zn en saliva por IFC-EAA-llama

6. EVALUACIÓN DE LA SENSACIÓN ASTRINGENTE

Tras la realización del enjuague con las sales de zinc, se valoró en cada sujeto, la posible aparición de un efecto astringente, sensación mixta entre la sequedad intensa y el amargor que producen ciertas sales metálicas al contacto con la lengua. Además, se evaluó el tiempo de duración de ese efecto tras el enjuague considerando 5 intervalos: no astringente; entre 0 y 1 horas; entre 1 y 3 horas; entre 3 y 6 horas y más de 6 horas.

7. PROTOCOLO MICROBIOLÓGICO. RECUENTO BACTERIANO (UFC/mL)

El recuento bacteriano en unidades formadoras de colonias por mililitro de saliva UFC/mL se realizó en dos tiempos: previo al enjuague (basal) y a las 2 horas después del enjuague. Se establecieron estos dos períodos, debido a que, en un estudio preliminar realizado por nosotros donde se incluían más intervalos de tiempo, se observó que a los 30 minutos o a las 24 horas del enjuague, no había diferencias apreciables. Dado el alto costo de este procedimiento de laboratorio, se desechó la idea de considerar más intervalos de tiempo.

Se le informa al sujeto que, durante las dos horas que dura el estudio microbiológico, no debe comer, ingerir bebidas o fumar.

Del conillo donde se encuentra almacenada la muestra, se recoge un volumen de 100 μ L de saliva, se dispersa en un agitador o Vortex (Agimatic-N, P Selecta) durante aproximadamente 30 segundos con un imán en el interior para romper los filamentos de mucina y con un agente tampón de fosfato a pH 7,3. Posteriormente se procede a hacer diluciones progresivas (10^1 - 10^2) para cada muestra de saliva (figura 13).



Figura 13. Dispersión y dilución de las muestras

La siembra o inoculación de saliva se realizó con la técnica de siembra por diseminación de la superficie que consiste en colocar 100 μ L de saliva en el centro de la placa de Petri con el medio de cultivo; se extendió sobre la superficie del medio mediante un asa hacia delante y hacia atrás, se invirtió la placa y se llevó a incubar (Raypa, mod. I-280, España) (figura 14).



Figura 14. Siembra o inoculación de saliva

Con tal fin, se utilizó como medio de cultivo el **Agar MSB** (agar de bacitracina mitis salivarius, Difco, bioMérieux SA, Francia)¹⁷⁹, suplementado con 15,0 % de sacarosa (PA-ACS, Panreac Química S.A., España) y 1,0 mL de cada una de las siguientes soluciones estériles: telurito de potasio al 1,0 % (bioMérieux SA, Francia) y 0,2 U/mL de bacitracina (Sigma chemical CO, Alemania). Este medio cumple las características de ser sólido, artificial, enriquecido y selectivo para el *Streptococcus mutans*, este preparado intenta:

- reproducir artificialmente las condiciones del hábitat natural,
- cubrir todas las necesidades nutricionales,
- permitir su crecimiento y multiplicación en el laboratorio.

Para la incubación, las cápsulas de Petri se colocan en una olla de presión por un período de 48 horas a 37°C en atmósfera anaerobia (GENbaganaer. BioMerieux SA, Francia), lo cual permite el desarrollo de las bacterias (figura 15).

¹⁷⁹ Gold OG, Jordan HV, Van Houte VJ. A selective medium for *Streptococcus mutans*. Arch Oral Biol 1973; 18: 1357-64.



Figura 15. Incubación.

Posteriormente se procedió a la identificación y recuento de las colonias basándose en la morfología y en la cantidad de unidades formadoras de colonias por mililitro de saliva (UFC/mL saliva) (Figura 16).

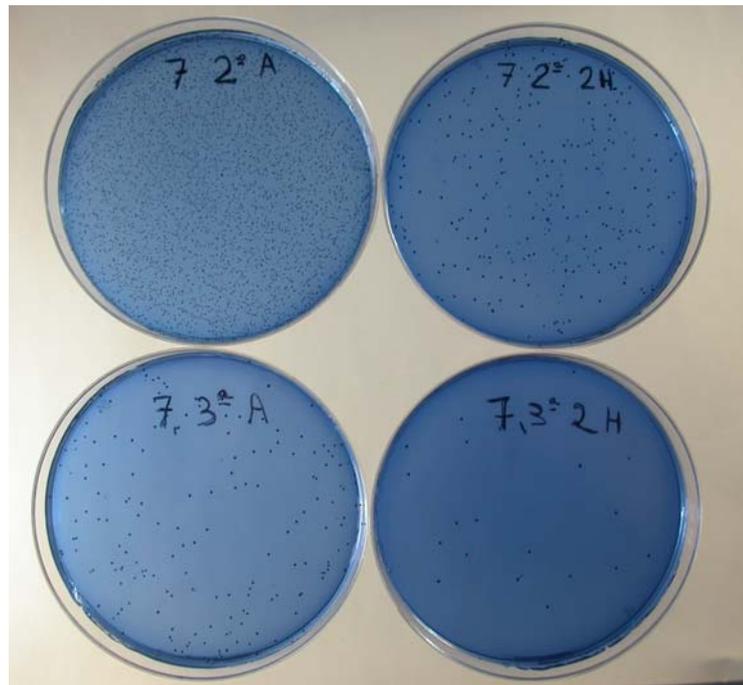


Figura 16. Recuento de bacterias.

8. DETERMINACIÓN DEL pH SALIVAL

Inmediatamente después de la recogida de cada una de las diferentes muestras de saliva, se midió el pH salival para cada sujeto del estudio con el pH-metro (micro-pH 2001, Crison, España) (figura 17). Antes de iniciar la medición del pH de las muestras, el equipo se calibró con una solución búfer. Como este parámetro depende de la razón $\text{HCO}_3^-/\text{H}_2\text{CO}_3$ en la saliva, se debe evitar la ventilación de la muestra y así la pérdida de CO_2 que reduciría la fracción de H_2CO_3 y no permitiría la determinación exacta del pH.



Figura 17. Medición del pH salival

9. MÉTODO ESTADÍSTICO

En este trabajo se realizó:

- Estadística descriptiva (Media aritmética, desviación estándar y porcentajes).
- Estadística analítica

Para la comparación de variables cuantitativas se utilizó el test de student (t-student) para la comparación de dos medias y el ANOVA

para el análisis de la varianza. Cuando no se cumplían las condiciones de aplicación del ANOVA se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis para la comparación de varias medias.

Se consideró como nivel mínimo de significación un valor de $p < 0,05$.

Los datos fueron procesados con el programa estadístico SPSS versión 12.0.1 para Windows (Statistical Package for the Social Sciences; SPSS Inc. Chicago, Illinois, USA).

Las variables consideradas fueron:

- Edad [años].
- Sexo [hombre/mujer].
- Tipo de solución utilizada para el enjuague [sulfato y acetato de zinc].
- Concentración del zinc [0,1%, 0,5 % y 1,0 %] como sulfato y acetato, respectivamente.
- Intervalos de tiempo para la determinación de los niveles medios de zinc (mg/L) [basal (antes del enjuague), 30 minutos, 60 minutos, 90 minutos, 120 minutos y 24 horas después del enjuague].
- Sensación astringente [Sí/No]
- Duración de la sensación astringente [Ninguno, 0-1 horas, 1-3 horas, 3-6 horas, >6 horas]
- Recuento de unidades formadoras de colonias por mililitro de saliva (UFC/mL) en dos tiempos: basal (antes del enjuague) y a los 120 minutos tras el enjuague.
- Porcentaje de reducción de UFC/mL saliva [%].
- pH salival en los distintos intervalos de tiempo [basal (antes del enjuague), 30 minutos, 60 minutos, 90 minutos, 120 minutos y 24 horas después del enjuague].

RESULTADOS

Los resultados se presentarán de acuerdo al orden establecido en el apartado de material y métodos. En primer lugar se expondrán los resultados de las concentraciones de zinc encontradas en saliva en el estudio preliminar y en el definitivo tras la realización de enjuagues con las sales a distintas concentraciones. Seguidamente, se señalarán los resultados del estudio de la sensación astringente derivada del uso de sales metálicas. A continuación, se mostrarán los resultados obtenidos en el estudio microbiológico en el que se cuantificó las unidades formadoras de colonias por mililitro de saliva (UFC/mL) y el porcentaje de reducción en los intervalos de tiempo considerados. Finalmente, se detallarán los niveles de pH salival encontrados en los diferentes grupos analizados.

1. DETERMINACIÓN DE ZINC EN SALIVA

1.1. ESTUDIO PRELIMINAR

Los resultados del estudio de las concentraciones de zinc en saliva expresadas en miligramos/litro (mg/L) se presentan en el gráfico 6. Los mismos muestran el comportamiento de cada sal de zinc a lo largo del tiempo según la concentración utilizada. En todos los casos se observa una drástica disminución de la concentración con el tiempo después del enjuague, con excepción del nitrato de zinc que mostró un comportamiento distinto a las demás sales. En este caso, la concentración de zinc en saliva fue muy baja, disminuyendo aún más al aumentar la concentración de zinc en la sal usada. Por esta razón se presume que la retención del nitrato en saliva podría ser mínima y por lo tanto no sería recomendado su uso como material odontológico.

El cloruro, sulfato y acetato de zinc se eliminan en saliva con el siguiente orden: cloruro de zinc → sulfato de zinc → acetato de zinc.

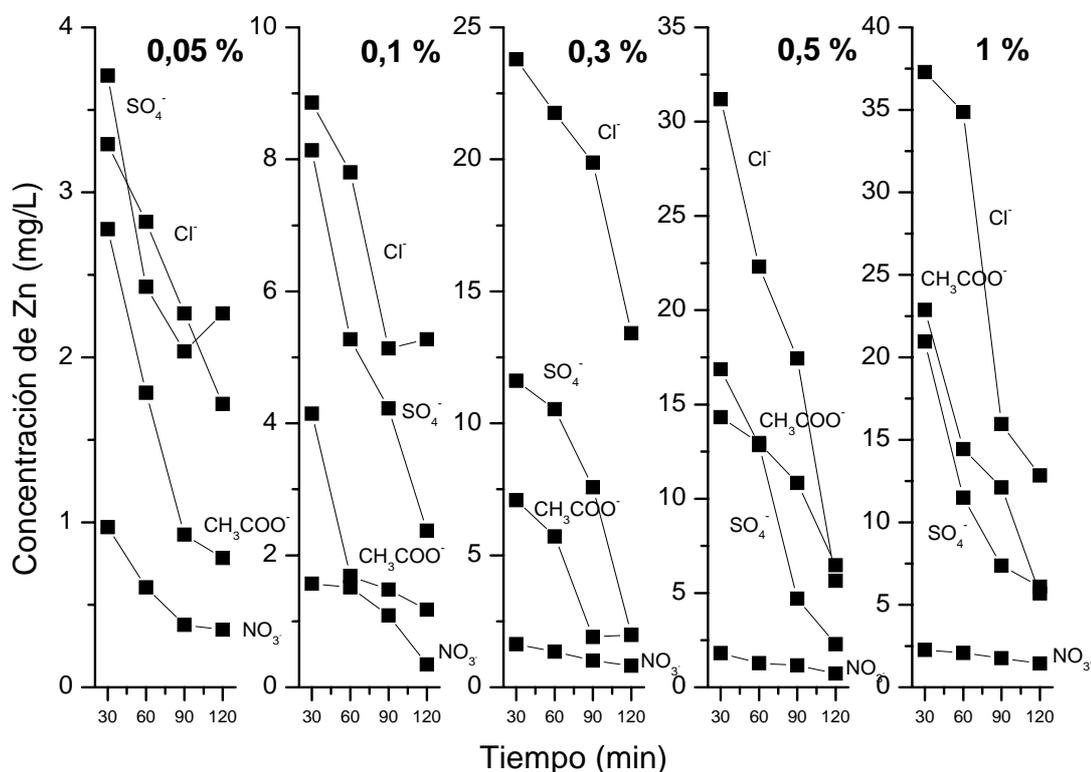


Gráfico 6. Variación de la concentración de zinc en saliva (mg/L) a distintos tiempos después del enjuague con concentraciones (%) distintas de sales de zinc. SO_4 : Sulfato de zinc; CH_3COO : Acetato de zinc; NO_3 : Nitrato de zinc; Cl : Cloruro de zinc;

1.2. ESTUDIO DEFINITIVO

Los niveles de zinc (mg/L) encontrados en cada uno de los sujetos incluidos en este estudio según las distintas sales y concentraciones utilizadas, en diferentes intervalos de tiempo se muestran en los anexos 4 al 10.

La concentración basal media de zinc en saliva global es de $0,055 \pm 0,017$ mg/L. Las concentraciones medias en los distintos intervalos de tiempo (basal, 30, 60, 90, 120 minutos y 24 horas) en el total de la población y por grupos según la sal empleada (sulfato y acetato de zinc) se muestran en la tabla 9.

Tabla 9. Concentraciones medias de Zn (mg/L) en la población total y en los grupos a los que se les aplicó diferentes sales de zinc, según los distintos intervalos de tiempo.

Grupo	N	Concentraciones de Zn (X±DE)					
		Basal	30 min.	60 min.	90 min.	120 min.	24 horas
Total	44	0,055±0,017	2,650±1,881	1,793±1,197	1,337±0,925	1,045±0,734	0,078±0,032
Sulfato de Zn	20	0,049±0,017	2,581±1,211	1,831±0,871	1,356±0,754	1,080±0,616	0,078±0,034
Acetato de Zn	18	0,059±0,016	3,588±2,005	2,327±1,191	1,741±0,885	1,332±0,715	0,082±0,035
Control	6	0,063±0,021	0,066±0,022	0,068±0,026	0,065±0,023	0,065±0,020	0,070±0,021

X±DE: media ± desviación estándar; **n:** número de casos; **min:** minutos.

En la tabla 9 se observa que el valor medio más elevado de zinc en la población total se encuentra a los 30 minutos del enjuague ($2,650 \pm 1,881$ mg/L). Esto ocurre de igual forma en cada una de las sales: sulfato de zinc ($2,581 \pm 1,211$ mg/L) y acetato de zinc ($3,588 \pm 2,005$ mg/L); teniendo ésta última, la media de concentración de zinc más elevada en todos los intervalos de tiempo estudiados. Estos valores van disminuyendo a lo largo del tiempo sin llegar, a las 24 horas, a los niveles iniciales obtenidos en el muestreo basal. En el grupo control que se enjuagó con el placebo, se mantienen los niveles basales de zinc a lo largo del tiempo, sin presentar variaciones reseñables.

En la tabla 10 se presentan los valores medios de zinc encontrados en la población distribuida según haya realizado el enjuague con una de las sales (sulfato o acetato) o con el placebo (grupo control).

Tabla 10. Concentraciones medias de Zn (mg/L) encontradas en la población distribuida según realizaran enjuagues con sulfato o acetato de Zinc o enjuagues con el placebo (grupo control), en los distintos intervalos de tiempo.

Grupo	N	Concentraciones de Zn (X±DE)					
		Basal	30 min.	60 min.	90 min.	120 min.	24 horas
Sulfato/ Acetato de Zn	38	0,054±0,017	3,058±1,691	2,066±1,051	1,538±0,831	1,119±0,668	0,080±0,034
Control	6	0,063±0,021	0,066±0,022	0,068±0,026	0,065±0,023	0,065±0,020	0,070±0,021
Sig. (p)		NS (p=0,24)	p<0,001	P<0,001	p<0,001	P<0,001	NS (p=0,49)

X±DE: media ± desviación estándar; **n:** número de casos; **min:** minutos; **Sig.:** Significación; **NS:** No significativo.

La máxima concentración de zinc se logra a los 30 minutos del enjuague con sales de zinc ($3,058 \pm 1,691$). Al comparar las medias de los sujetos que se

enjuagaron con sales de zinc y los sujetos control en los distintos tiempos incluidos en el estudio, no se observan diferencias significativas entre estos, en la determinación basal y a las 24 horas; en cambio, se encuentran diferencias muy significativas ($p < 0,001$) a los 30, 60, 90 y 120 minutos.

En la tabla 11 y el gráfico 7, se observa en los distintos grupos de sulfato de zinc (0,1%, 0,5% y 1%) una misma tendencia, alcanzando la máxima concentración media de zinc salival a los 30 minutos del enjuague ($2,635 \pm 1,335$ mg/L para la concentración de 0,1%; $2,826 \pm 1,354$ mg/L para 0,5% y $2,315 \pm 1,091$ mg/L para 1%), siendo el 0,5% quien presenta la mayor concentración de zinc, teniendo posteriormente una reducción paulatina a lo largo del tiempo (60, 90, 120 min. y 24 horas), aunque siempre por encima del nivel basal inicial.

En el análisis estadístico, los valores medios de las distintas concentraciones de zinc como sulfato en cada uno de los intervalos de tiempo estudiados, se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$). Al mismo tiempo, al comparar las distintas concentraciones entre sí, no se observan diferencias significativas para ninguno de los tiempos analizados.

Tabla 11. Concentraciones medias de zinc como sulfato [$ZnSO_4$] a diferentes tiempos y distintas concentraciones

Tiempo	Concentraciones de Zn ($X \pm DE$)			Sig. (p)
	Sulfato Zn 0,1% (n=7)	Sulfato Zn 0,5% (n=6)	Sulfato Zn 1% (n=7)	
Basal	0,046 \pm 0,011	0,058 \pm 0,022	0,046 \pm 0,017	NS (p=0,22)
30 min	2,635 \pm 1,335	2,826 \pm 1,354	2,315 \pm 1,091	NS (p=0,86)
60 min	1,805 \pm 0,757	2,106 \pm 1,235	1,620 \pm 0,656	NS (p=0,90)
90 min	1,322 \pm 0,730	1,512 \pm 1,134	1,247 \pm 0,393	NS (p=0,93)
120 min	1,110 \pm 0,613	1,093 \pm 0,885	1,038 \pm 0,412	NS (p=0,85)
24 horas	0,073 \pm 0,040	0,094 \pm 0,041	0,068 \pm 0,015	NS (p=0,93)
Sig. (p)	p<0,001	p<0,001	p<0,001	

X \pm DE: media \pm desviación estándar; **n:** número de muestra; **min:** minutos; **Sig.:** Significación; **NS:** No significativo.

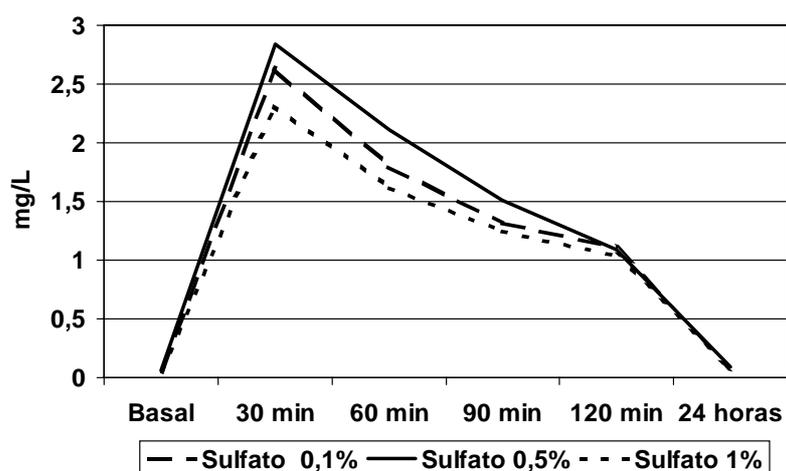


Gráfico 7.- Concentraciones medias de sulfato de zinc en los distintos intervalos de tiempo

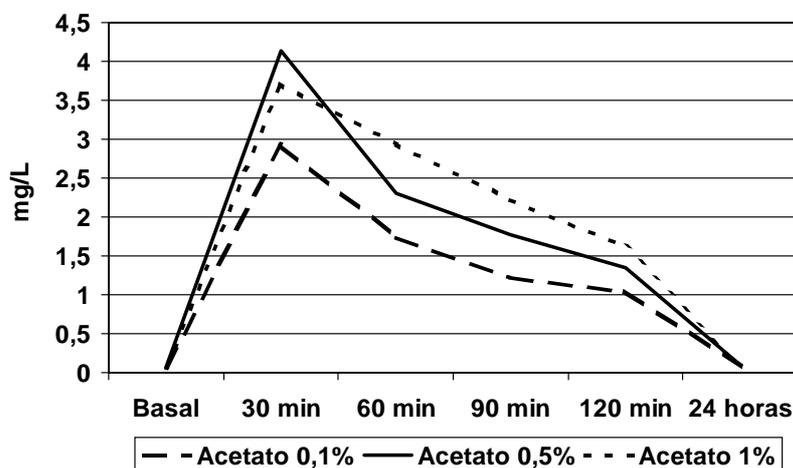
En la tabla 12 y el gráfico 8, se observa en los distintos grupos de acetato de zinc (0,1%, 0,5% y 1%) resultados muy similares a los obtenidos en el grupo con enjuague de sulfato de zinc. La máxima concentración media de zinc a nivel salival se logra a los 30 minutos del enjuague ($2,923 \pm 2,358$ mg/L para 0,1% $4,130 \pm 1,242$ mg/L para 0,5% y $3,713 \pm 2,379$ mg/L para concentraciones del 1%). Con el enjuague al 0,5% se alcanza la mayor concentración de zinc a los 30 minutos, teniendo posteriormente una reducción paulatina a lo largo del tiempo (60, 90, 120 min. y 24 horas), siempre por encima del nivel basal inicial.

Al comparar los valores medios basales con los valores obtenidos en cada uno de los intervalos de tiempo estudiados para los sujetos que realizaron enjuagues con cualquiera de las concentraciones de acetato de zinc (0,1%, 0,5% y 1%) se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$), respectivamente. De igual forma, no se observaron diferencias significativas para ninguno de los tiempos analizados, al comparar los valores de las distintas concentraciones de acetato de zinc.

Tabla 12. Concentraciones medias de acetato de zinc $[(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Zn}]$ a diferentes tiempos y distintas concentraciones

Tiempo	Concentraciones de Zn ($\bar{X} \pm \text{DE}$)			Sig. (p)
	Acetato Zn 0,1% (n=6)	Acetato Zn 0,5% (n=6)	Acetato Zn 1% (n=7)	
Basal	0,059 \pm 0,020	0,062 \pm 0,017	0,057 \pm 0,011	NS (p=0,18)
30 min	2,923 \pm 2,358	4,130 \pm 1,242	3,713 \pm 2,379	NS (p=0,52)
60 min	1,736 \pm 0,603	2,306 \pm 0,604	2,940 \pm 1,797	NS (p=0,38)
90 min	1,230 \pm 0,753	1,766 \pm 0,487	2,228 \pm 1,124	NS (p=0,37)
120 min	1,040 \pm 0,806	1,343 \pm 0,353	1,615 \pm 0,876	NS (p=0,35)
24 horas	0,076 \pm 0,038	0,092 \pm 0,036	0,079 \pm 0,035	NS (p=0,34)
Sig. (p)	p<0,001	p<0,001	p<0,001	

$\bar{X} \pm \text{DE}$: media \pm desviación estándar; **n:** número de muestra; **min:** minutos; **Sig.:** Significación; **NS:** No significativo.

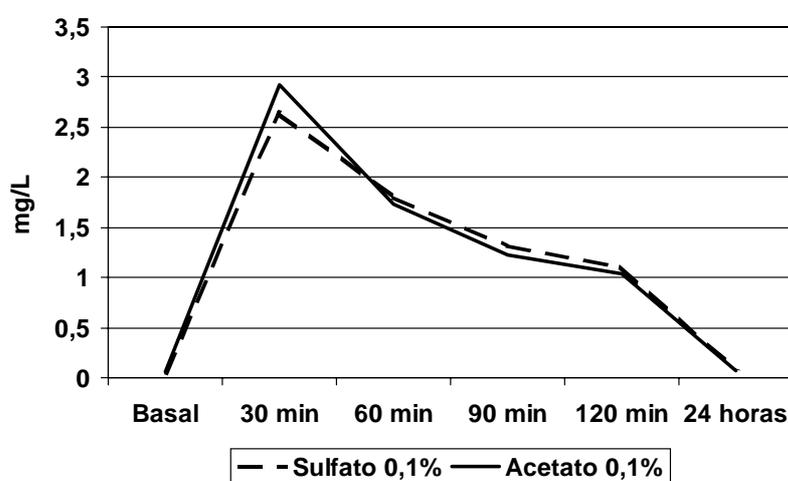
**Gráfico 8.-** Concentraciones medias de Acetato de Zinc en los distintos intervalos de tiempo.

En la tabla 13 y el gráfico 9, se detalla las concentraciones medias de sulfato y acetato de zinc al 0,1%, dónde la máxima concentración de zinc se encuentra a los 30 minutos del enjuague (2,635 \pm 1,335 y 2,923 \pm 2,358) respectivamente, para posteriormente producirse una reducción a lo largo del tiempo analizado. Al analizar estadísticamente las sales en cada uno de los tiempos, no hay relación significativa entre ellas.

Tabla 13. Concentraciones medias de sulfato de zinc al 0,1% y acetato de zinc al 0,1% en los distintos intervalos de tiempo.

	N	Concentraciones de Zn al 0,1% (X±DE)					
		Basal	30 min.	60 min.	90 min.	120 min.	24 horas
Sulfato al 0,1%	7	0,046±0,011	2,635±1,335	1,805±0,757	1,322±0,730	1,110±0,613	0,073±0,040
Acetato al 0,1%	6	0,059±0,020	2,923±2,358	1,736±0,603	1,230±0,753	1,040±0,806	0,076±0,038
Sig. (p)		NS (p=0,17)	NS (p=0,78)	NS (p=0,86)	NS (p=0,82)	NS (p=0,86)	NS (p=0,89)

X±DE: media ± desviación estándar; **n:** número de muestra; **min:** minutos; **Sig.:** Significación; **NS:** No significativo

**Gráfico 9.-** Concentraciones medias de sulfato de zinc al 0,1% y acetato de zinc al 0,1% en los distintos intervalos de tiempo

En la tabla 14 y el gráfico 10, se muestran las concentraciones medias de sulfato y acetato de zinc al 0,5%. El nivel máximo de zinc se consigue a los 30 minutos del enjuague (2,826±1,354 y 2,106±1,235) respectivamente. Posteriormente se produce una reducción a lo largo del tiempo analizado, de igual manera a lo observado en las concentraciones al 0,1%. Al analizar estadísticamente las sales en cada uno de los tiempos, no se encontraron diferencias significativas entre éstas.

Tabla 14. Concentraciones medias de sulfato de zinc al 0,5% y acetato de zinc al 0,5% en los distintos intervalos de tiempo

	N	Concentraciones de Zn al 0,5% (X±DE)					
		Basal	30 min.	60 min.	90 min.	120 min.	24 horas
Sulfato al 0,5%	6	0,058±0,022	2,826±1,354	2,106±1,235	1,512±1,134	1,093±0,885	0,094±0,041
Acetato al 0,5%	6	0,062±0,017	4,130±1,242	2,306±0,604	1,766±0,487	1,343±0,353	0,092±0,036
Sig. (p)		NS (p=0,72)	NS (p=0,11)	NS (p=0,73)	NS (p=0,64)	NS (p=0,54)	NS (p=0,91)

X±DE: media ± desviación estándar; **n:** número de muestra; **min:** minutos; **Sig.:** Significación; **NS:** No significativo.

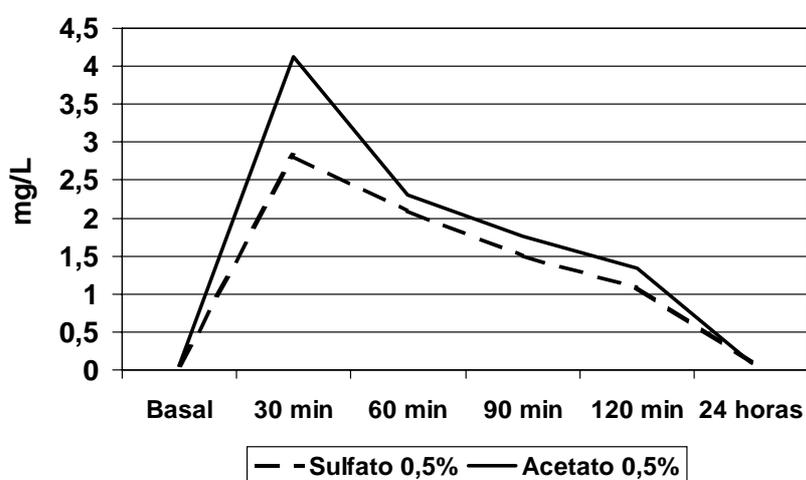


Gráfico 10.- Concentraciones medias de sulfato de zinc al 0,5% y acetato de zinc al 0,5% en los distintos intervalos de tiempo.

Para las distintas sales, sulfato y acetato de zinc al 1% (tabla 15, gráfico 11), se observa que el pico máximo de concentración de zinc se sitúa a los 30 minutos del enjuague (2,315±1,091 y 3,713±2,379) respectivamente. El análisis estadístico no mostró asociación significativa entre ambas sales.

Tabla 15. Concentraciones medias de sulfato de zinc al 1% y acetato de zinc al 1% en los distintos intervalos de tiempo.

	N	Concentraciones de Zn al 1% (X±DE)					
		Basal	30 min.	60 min.	90 min.	120 min.	24 horas
Sulfato al 1%	7	0,046±0,017	2,315±1,091	1,620±0,656	1,247±0,393	1,038±0,412	0,068±0,015
Acetato al 1%	6	0,057±0,011	3,713±2,379	2,940±1,797	2,228±1,124	1,615±0,876	0,079±0,035
Sig. (p)		NS (p=0,21)	NS (p=0,23)	NS (p=0,13)	NS (p=0,09)	NS (p=0,19)	NS (p=0,51)

X±DE: media ± desviación estándar; **n:** número de muestra; **min:** minutos; **Sig.:** Significación; **NS:** No significativo.

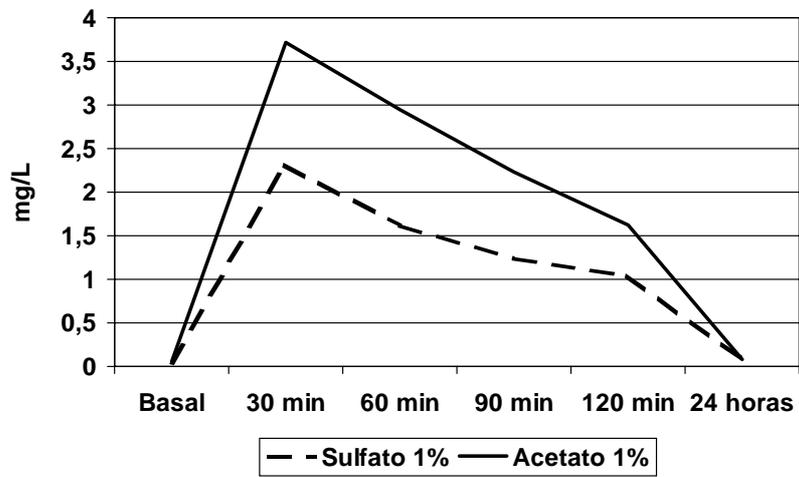


Gráfico 11.- Concentraciones medias de sulfato de zinc al 1% y acetato de zinc al 1% en los distintos intervalos de tiempo

2. SENSACIÓN ASTRINGENTE DE LOS ENJUAGUES CON SALES DE ZINC

Cuando se analiza la aparición de sensación de astringencia al contacto con la lengua, en la totalidad de la población estudiada se observa, que 39 de los 44 sujetos estudiados (88,6%) referían sensación astringente tras el enjuague. Por sexos, el 86,7% de los varones (13 de 15) y el 89,6% de las mujeres (26 de 29) manifestaron presentar sensación astringente. No obstante, no se encontró relación estadísticamente significativa entre el sexo y la sensación de astringencia (tabla 16).

Tabla 16. Sensación astringente por sexos.

Sexo	Sensación astringente		Total
	No	Sí	
Varones	2 (13,3%)	13 (86,7%)	15 (100%)
Mujeres	3 (10,4%)	26 (89,6%)	29 (100%)
Total	5 (11,4%)	39 (88,6%)	44 (100%)

$\chi^2=0,042$; $p>0,05$ (NS)

En la tabla 17 se muestra la distribución de ambos sexos (varones y mujeres) en función del tiempo de duración de la sensación astringente. La sensación astringente se prolonga durante más tiempo en las mujeres que en los hombres. El 77% de los varones que manifestaron sensación astringente, 10 de 13 ésta no duraba más de una hora tras el enjuague. Por el contrario, el mayor porcentaje de mujeres 62,1% sitúa la duración de la sensación astringente entre 1 y 3 horas y un 26,1% de ellas (7 de 29) refiere una duración superior a 3 horas. Existen diferencias altamente significativas ($p<0,001$) entre ambos grupos de población con respecto a la duración de la sensación astringente. Sin embargo, es de hacer notar que los cinco sujetos que no reportaron sensación astringente pertenecen al grupo control.

Tabla 17. Duración de la sensación astringente con respecto al sexo

Sexo	Tiempo de duración					Total
	No astringente	0-1 horas	1-3 horas	3-6 horas	>6 horas	
Varones	2 (13,3%)	10 (66,7%)	2 (13,3%)	1 (6,7%)	0 (0%)	15 (100%)
Mujeres	3 (10,4%)	1 (3,4%)	18 (62,1%)	6 (20,7%)	1 (3,4%)	29 (100%)
Total	5 (11,4%)	11 (25,0%)	20 (45,4%)	7 (15,9%)	1 (2,3%)	44 (100%)

$$\chi^2=22,78; p<0,001$$

La distribución de los sujetos según presenten o no sensación astringente atendiendo a los diferentes enjuagues con sales de zinc (sulfato o acetato) a distintas concentraciones (0,1%, 0,5% y 1%) o con el placebo (agua destilada) se expone en la tabla 18.

Tabla 18. Sensación astringente en función de los distintos tipos de enjuague empleados en el estudio.

Sal	Sensación astringente		Total
	No	Sí	
Sulfato 0,1%	0 (0%)	7 (100%)	7 (100%)
Sulfato 0,5%	0 (0%)	6 (100%)	6 (100%)
Sulfato 1%	0 (0%)	7 (100%)	7 (100%)
Acetato 0,1%	0 (0%)	6 (100%)	6 (100%)
Acetato 0,5%	0 (0%)	6 (100%)	6 (100%)
Acetato 1%	0 (0%)	6 (100%)	6 (100%)
Control	5 (83,3%)	1 (16,7%)	6 (100%)
Total	5 (11,4%)	39 (88,6%)	44 (100%)

$$\chi^2=35,72; p<0,001$$

La totalidad de los sujetos (100%) que realizaron enjuagues con sales de zinc a diferentes concentraciones y el 20% de los sujetos del grupo control que se enjuagó con el placebo de agua destilada manifestaron sensación astringente. Existen diferencias altamente significativas entre los sujetos que se enjuagaron con sales de zinc y los sujetos que se enjuagaron con el placebo en cuanto a la sensación astringente ($p<0,001$).

En la tabla 19 se presenta la distribución de los individuos incluidos en el estudio en función del tipo de enjuague utilizado y el tiempo de duración de la sensación astringente.

Tabla 19. Intervalos de tiempo de duración de la sensación astringente según el tipo de enjuague utilizado.

Sal	Tiempo de duración					Total
	Ninguno	0-1 horas	1-3 horas	3-6 horas	>6 horas	
Sulfato 0,1%	0 (0%)	0 (0%)	4 (57,1%)	2 (28,6%)	1 (14,3%)	7 (100%)
Sulfato 0,5%	0 (0%)	1 (16,7%)	4 (66,6%)	1 (16,7%)	0 (0%)	6 (100%)
Sulfato 1%	0 (0%)	3 (42,8%)	3 (42,8%)	1 (14,2%)	0 (0%)	7 (100%)
Acetato 0,1%	0 (0%)	2 (33,3%)	4 (66,7%)	0 (0%)	0(0%)	6 (100%)
Acetato 0,5%	0 (0%)	2 (33,3%)	3 (50,0%)	1 (16,7%)	0 (0%)	6 (100%)
Acetato 1%	0 (0%)	2 (33,3%)	2 (33,3%)	2 (33,4%)	0 (0%)	6 (100%)
Control	5 (83,3%)	1 (16,7%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	6 (100%)
Total	5 (11,4%)	11 (25,0%)	20 (45,4%)	7 (15,9%)	1 (2,3%)	44 (100%)

$\chi^2=48,56$; $p<0,01$

Veinte de los 44 sujetos del estudio (45,4%) manifestaron una duración del efecto astringente entre 1 y 3 horas, con porcentajes en los que realizaron enjuagues con sales de zinc, que oscilan entre el 33,3% del grupo que se enjuagó con acetato de zinc al 1% y el 66,6% de los sujetos que se enjuagaron con sulfato de zinc al 0,5% y acetato al 0,1%, respectivamente. Sólo una paciente que se enjuagó con sulfato de zinc al 0,1% refirió una duración de la sensación astringente superior a 6 horas. En el grupo control que se enjuagó con el placebo (agua destilada), el 83,3% de los individuos no manifestó sensación astringente y únicamente 1 sujeto indicó que ésta no duró más de una hora. En el análisis estadístico se encontró relación muy significativa ($p<0,01$) entre el tipo de enjuague y el tiempo de duración de la sensación astringente.

3. NÚMERO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS EN SALIVA

Los datos individualizados del estudio microbiológico se detallan en el anexo 11. El número medio de unidades formadoras por mililitro de saliva (UFC/mL) en la determinación basal y a las 2 horas del enjuague con las distintas sales, se muestra en las tablas 20 y 21.

En la tabla 20 se especifican los valores medios de UFC/mL en la población total estudiada y en los distintos grupos. En la determinación basal, se observa una gran variabilidad entre los valores medios, independientemente del enjuague al cual fue sometido durante el estudio. Sin embargo, a los 120 minutos tras el enjuague, se consigue una importante reducción de las UFC/mL, excepto en el grupo control, donde apenas hay reducción.

Tabla 20. Número de unidades formadoras de colonias (UFC/mL) en la población total y en los grupos a los que se les aplicó diferentes sales de zinc, según los distintos intervalos de tiempo.

Grupo	n	Número UFC (X±DE)	
		Basal	120 min.
Total	32	411,37±914,91	66,21±93,57
Sulfato de Zn	8	783,12±1142,41	79,25±122,48
Acetato de Zn	18	366,05±937,61	57,94±92,97
Control	6	78,33±110,25	73,66±57,50

X±DE: media ± desviación estándar; **n:** número de muestra; **min:** minutos.

En la tabla 21 se muestran los valores medios de UFC/mL del grupo de sujetos que se enjuagó con sales de zinc (acetato y sulfato) y con el enjuague placebo (grupo control), observándose una reducción de las UFC/mL del 86,95% y 5,95% respectivamente. Cuando se compararon ambos parámetros (basal y 2 horas); en el grupo control no se encontraron diferencias significativas ($p=0,92$); mientras que, en el grupo que se enjuago con distintas sales de zinc sí se hallaron ($p=0,039$).

Tabla 21. Número de unidades formadoras de colonias (UFC/mL) en la población distribuida según realizaran enjuagues con sulfato o acetato de zinc o enjuagues con el placebo (grupo control), en los distintos intervalos de tiempo.

Tiempo	Número UFC (X±DE)	
	Sulfato/Acetato de Zn (n=26)	Control (n=6)
Basal	494,38±1000,88	78,33±110,25
120 min,	64,50±100,89	73,66±57,50
% reducción	86,95%	5,95%
Sig. (p)	p<0,05	NS (p=0,92)

X±DE: media ± desviación estándar; **% reducción:** Porcentaje de reducción de UFC/mL; **n:** número de muestra; **min:** minutos; **Sig.:** Significación; **NS:** No significativo.

El número medio de UFC/mL en la determinación basal, en todas las concentraciones de zinc, es mayor al obtenido a las 2 horas del enjuague con sulfato de zinc, existiendo una reducción de 98,28% para 0,1%; 90% para 0,5% y 83,04% para 1% (tabla 22). No obstante, en el análisis estadístico no se hallaron diferencias significativas.

Tabla 22. Número de unidades formadoras de colonias (UFC/mL) en las diferentes concentraciones de sulfato de zinc [ZnSO₄] y en los diferentes tiempos.

Tiempo	Número UFC (X±DE)			Sig. (p)
	Sulfato Zn 0,1% (n=3)	Sulfato Zn 0,5% (n=2)	Sulfato Zn 1% (n=3)	
Basal	1011,66±982,55	1500,00±2121,32	76,66±107,85	NS (p=0,49)
120 min	98,33±131,94	150,00±212,13	13,00±21,65	NS (p=0,73)
% reducción	98,28%	90,00%	83,04%	

X±DE: media ± desviación estándar; **% reducción:** Porcentaje de reducción de UFC/mL; **Sig.:** Significación; **NS:** No significativo.

En el gráfico 12 se observa la reducción de las UFC/mL a lo largo del tiempo de estudio en los sujetos que se enjuagaron con sulfato de zinc a distintas concentraciones.

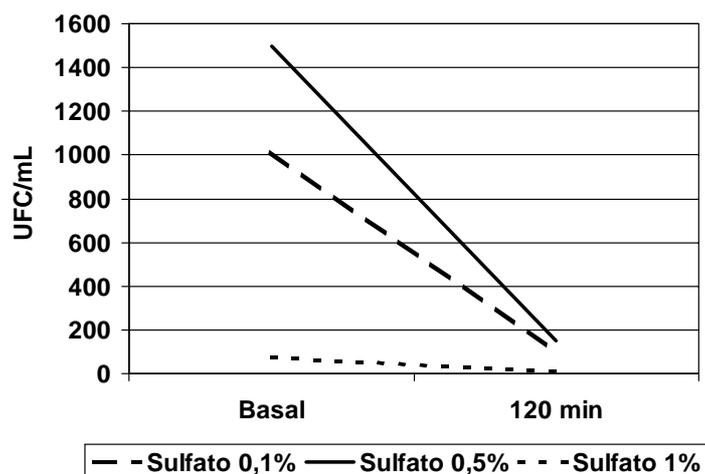


Gráfico 12.- Valores medios de UFC/mL en los distintos intervalos de tiempo según las diferentes concentraciones de Sulfato de Zinc

En la tabla 23 y el gráfico 13, se presenta el número medio de UFC/mL de saliva tanto basal como a los 120 minutos encontrados en los sujetos que se enjuagaron con acetato de zinc. En todas las determinaciones basales, los valores de UFC/mL son mayores a los obtenidos a las 2 horas, existiendo una reducción de 83,85% para 0,1%; 89,24% para 0,5% y 83,16% para 1%. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los distintos grupos.

Tabla 23. Número de unidades formadoras de colonias (UFC/mL) en las diferentes concentraciones de acetato de zinc $[(CH_3COO)_2Zn]$ y en los diferentes tiempos.

Tiempo	Número UFC ($X \pm DE$)			Sig. (p)
	Acetato Zn 0,1% (n=6)	Acetato Zn 0,5% (n=6)	Acetato Zn 1% (n=6)	
Basal	988,50±1508,82	76,00±111,17	33,66±40,89	NS (p=0,67)
120 min	159,66±102,77	8,50±10,65	5,66±9,13	NS (p=0,82)
% reducción	83,85%	89,24%	83,16%	

$X \pm DE$: media \pm desviación estándar; **n:** número de muestra; **min:** minutos; **% reducción:** Porcentaje de reducción de UFC/mL; **Sig.:** Significación; **NS:** No significativo.

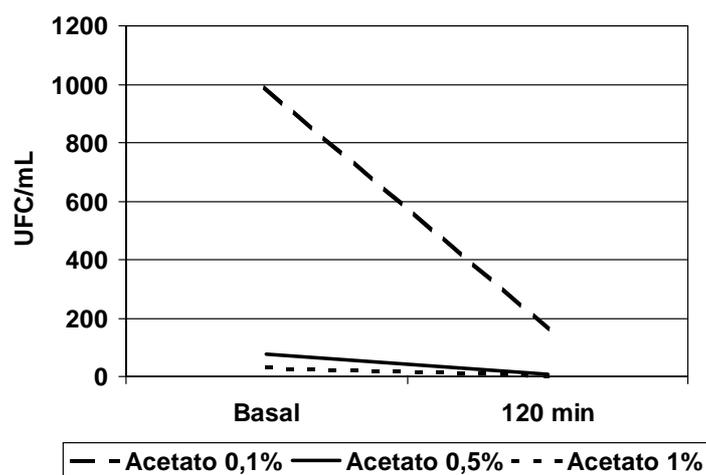


Gráfico 13.- Valores medios de UFC/mL en los distintos intervalos de tiempo según las diferentes concentraciones de acetato de zinc

En la tabla 24 y el gráfico 14, se exponen los valores medios de UFC/mL de las distintas sales al 0,1% de concentración. Los valores basales son superiores a los obtenidos a las 2 horas del estudio. Al realizar el análisis estadístico, no se encontraron diferencias significativas.

Tabla 24. Número de unidades formadoras de colonias (UFC/mL) en la población distribuida según realizara enjuagues con sulfato de zinc al 0.1% o con acetato de zinc al 0,1% en los distintos intervalos de tiempo.

Grupo	n	Número UFC ($\bar{X} \pm DE$)		% Reducción
		Basal	120 min.	
Sulfato de Zn al 0,1%	9	1011,66±982,55	98,33±131,94	91%
Acetato de Zn al 0,1%	9	988,50±1508,82	159,66±102,77	84%
Sig. (p)		NS (p=0,96)	NS (p=0,28)	

$\bar{X} \pm DE$: media \pm desviación estándar; **n:** número de muestra; **min:** minutos; **Sig.:** Significación; **NS:** No significativo.

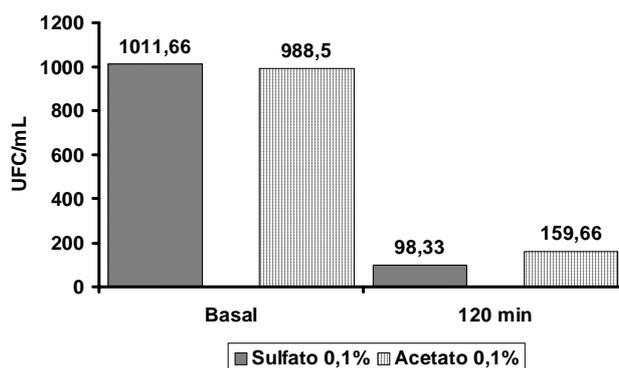


Gráfico 14.- Niveles medios de UFC/mL (basal y 120 minutos) en los sujetos que realizaron enjuagues con sulfato de zinc al 0,1% y acetato de zinc al 0,1%

En la tabla 25 y el gráfico 15, se presentan los valores medios de las distintas sales utilizadas en el estudio a una concentración de 0,5% de zinc donde los valores basales son mayores a los obtenidos a las 2 horas de estudio. El análisis estadístico no mostró asociación significativa.

Tabla 25. Número de unidades formadoras de colonias (UFC/mL) en la población distribuida según realizara enjuagues con sulfato de zinc al 0,5% o con acetato de zinc al 0,5% en los distintos intervalos de tiempo.

Grupo	n	Número UFC ($X \pm DE$)		% de reducción
		Basal	120 min.	
Sulfato de Zn al 0,5%	8	1500,00 \pm 2121,32	150,00 \pm 212,13	90%
Acetato de Zn al 0,5%	8	76,00 \pm 111,17	8,50 \pm 10,65	89%
Sig. (p)		NS (p=0,09)	NS (p=0,10)	

X \pm DE: media \pm desviación estándar; **n:** número de muestra; **min:** minutos; **Sig.:** Significación; **NS:** No significativo.

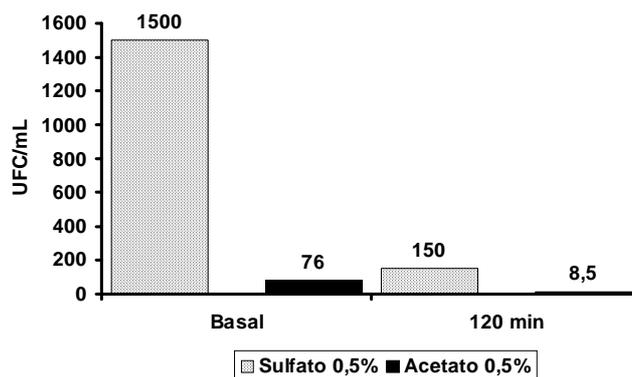


Gráfico 15.- Niveles medios de UFC/mL (basal y 120 minutos) en los sujetos que realizaron enjuagues con sulfato de zinc al 0,5% y acetato de zinc al 0,5%

En la tabla 26 y el gráfico 16, se muestran los valores medios de las distintas sales de zinc al 1% utilizadas en el estudio. Los niveles basales de UFC/mL son mayores a los obtenidos a las 2 horas. No obstante, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos, al igual que ocurre en los grupos con concentraciones de 0,1% y 0,5%.

Tabla 26. Número de unidades formadoras de colonias (UFC/mL) en la población distribuida según realizara enjuagues con sulfato de zinc al 1% o con acetato de zinc al 1% en los distintos intervalos de tiempo.

Grupo	n	Número UFC ($X \pm DE$)		% Reducción
		Basal	120 min.	
Sulfato de Zn al 1%	9	76,66 \pm 107,85	13,00 \pm 21,65	84%
Acetato de Zn al 1%	9	33,66 \pm 40,89	5,66 \pm 9,13	84%
Sig. (p)		NS (p=0,28)	NS (p=0,37)	

$X \pm DE$: media \pm desviación estándar; **n:** número de muestra; **min:** minutos **Sig.:** Significación; **NS:** No significativo

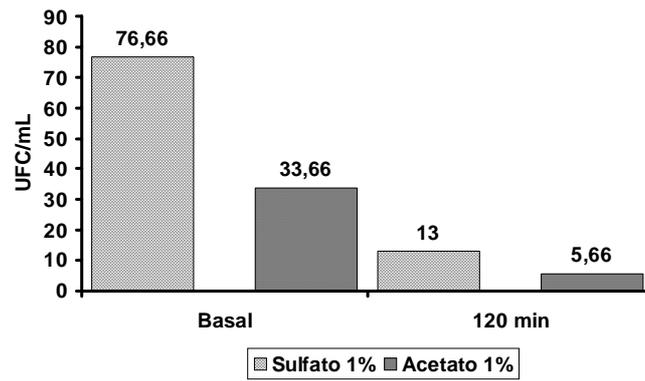


Gráfico 16.- Niveles medios de UFC/mL (basal y 120 minutos) en los sujetos que realizaron enjuagues con sulfato de zinc al 1% y acetato de zinc al 1%

4. DETERMINACIÓN DE pH SALIVAL

En los anexos 12 al 18 se muestran los valores individuales de pH salival encontrados en cada uno de los sujetos incluidos en el estudio según las distintas sales y concentraciones utilizadas, en los diferentes intervalos de tiempo. En los 44 sujetos estudiados, el valor medio de pH salival es de 7,03 con un rango que se sitúa entre 5,8 y 7,8.

En la tabla 27 se exponen los valores medios de pH en saliva encontrados en el total de la población y dividida por grupos según la sal empleada (sulfato o acetato de zinc) y los distintos intervalos de tiempo considerados (basal, 30, 60, 90, 120 minutos y 24 horas).

Tabla 27. Valores medios de pH salival en la población total y en los grupos a los que se les aplicó diferentes sales de zinc, según los distintos intervalos de tiempo.

Grupo	n	Concentraciones de pH ($\bar{X} \pm DE$)					
		Basal	30 min.	60 min.	90 min.	120 min.	24 horas
Total	44	7,10 \pm 0,41	7,03 \pm 0,38	6,97 \pm 0,38	7,02 \pm 0,38	7,04 \pm 0,34	7,02 \pm 0,38
Sulfato de Zn	20	7,16 \pm 0,40	7,12 \pm 0,35	7,04 \pm 0,38	7,08 \pm 0,35	7,09 \pm 0,29	7,04 \pm 0,39
Acetato de Zn	18	7,04 \pm 0,41	6,95 \pm 0,40	6,92 \pm 0,37	6,96 \pm 0,40	7,01 \pm 0,38	7,01 \pm 0,38
Control	6	6,85 \pm 0,58	6,80 \pm 0,44	6,81 \pm 0,37	6,83 \pm 0,32	6,81 \pm 0,35	6,85 \pm 0,45

X \pm DE: media \pm desviación estándar; **n:** número de casos; **min:** minutos.

Los valores medios de pH más elevados se encuentran en la determinación basal, tanto en la totalidad de la población (7,10 \pm 0,41) como dividida por grupos: sulfato de zinc (7,16 \pm 0,40), acetato de zinc (7,04 \pm 0,41) y grupo control (6,85 \pm 0,58). Este último grupo, en cada intervalo de tiempo presenta valores más bajos de pH en comparación con los grupos que realizaron enjuagues con sales de zinc. En términos absolutos, el valor medio de pH más bajo (6,80 \pm 0,44) se observa en el grupo control a los 30 minutos tras en el enjuague.

Los valores medios de pH encontrados en la población, distribuida según haya realizado el enjuague con una de las sales de zinc (sulfato o acetato) o

con la solución placebo de agua destilada (grupo control) se muestran en la tabla 28.

Tabla 28. Valores medios de pH en la población distribuida según realizaron enjuagues con sales de zinc (sulfato o acetato) o con el placebo (grupo control), en los distintos intervalos de tiempo.

Grupo	n	Concentraciones de pH ($\bar{X} \pm DE$)					
		Basal	30 min.	60 min.	90 min.	120 min.	24 horas
Sulfato/ Acetato de Zn	38	7,13 \pm 0,37	7,07 \pm 0,37	7,00 \pm 0,37	7,06 \pm 0,38	7,08 \pm 0,33	7,05 \pm 0,37
Control	6	6,85 \pm 0,58	6,80 \pm 0,44	6,81 \pm 0,37	6,83 \pm 0,32	6,81 \pm 0,35	6,85 \pm 0,45
Sig. (p)		NS(p=0,29)	NS(p=0,11)	NS(p=0,26)	NS(p=0,17)	NS(p=0,78)	NS(p=0,22)

X \pm DE: media \pm desviación estándar **n:** número de casos; **min:** minutos; **Sig.:** Significación; **NS:** No significativo.

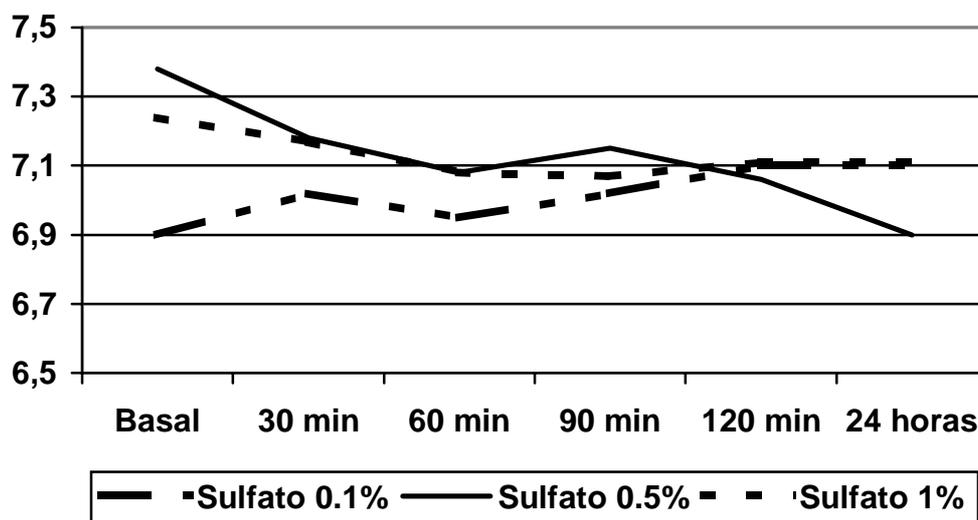
En el grupo de sujetos que realizaron enjuagues con cualquier sal de zinc (sulfato o acetato) se observa que la determinación basal es la que presenta el valor más elevado de pH. En las determinaciones del pH en los diferentes intervalos de tiempo, estos siempre son menores al pH basal. Sin embargo, entre los valores promedios de pH correspondientes a los sujetos a los cuales se les suministraron cualquiera de las dos sales, bien sea sulfato o acetato de zinc o bien, agua destilada (grupo control), no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$). Tampoco existen diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los niveles medios de pH en saliva en los distintos tiempos después del enjuague.

En la tabla 29 y el gráfico 17, se observan los distintos valores medios de pH, para los individuos que realizaron enjuagues con sulfato de zinc al 0,1%, 0,5% y 1%.

Tabla 29. Valores medios de pH de sujetos con enjuagues de zinc como sulfato [ZnSO₄] a diferentes tiempos y distintas concentraciones

Tiempo	Valores de pH (X±DE)			Sig. (p)
	Sulfato Zn 0,1% (n=7)	Sulfato Zn 0,5% (n=6)	Sulfato Zn 1% (n=7)	
Basal	6,98±0,26	7,38±0,38	7,24±0,43	NS (p=0,55)
30 min	7,02±0,45	7,18±0,36	7,17±0,26	NS (p=0,33)
60 min	6,95±0,48	7,08±0,39	7,08±0,29	NS (p=0,55)
90 min	7,02±0,41	7,15±0,28	7,07±0,37	NS (p=0,61)
120 min	7,10±0,33	7,06±0,38	7,11±0,20	NS (p=0,59)
24 horas	7,10±0,26	6,98±0,35	7,11±0,38	NS (p=0,88)
Sig. (p)	NS (p=0,43)	NS (p=0,31)	NS (p=0,57)	

X±DE: media ± desviación estándar; **n:** número de muestra; **min:** minutos; **Sig.:** Significación; **NS:** No significativo.

**Gráfica 17.** Valores medios de pH salival en los distintos intervalos de tiempo para sujetos que realizaron enjuagues con sulfato de zinc a distintas concentraciones.

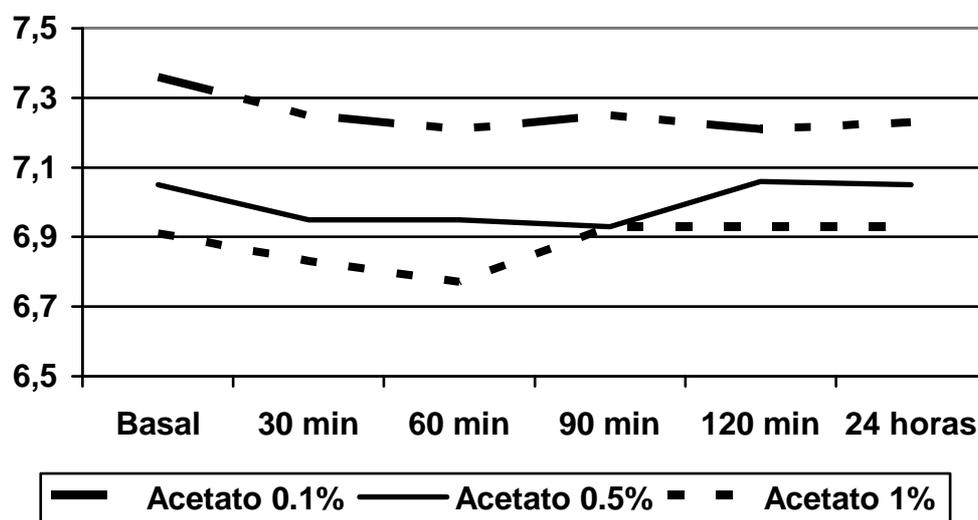
Cuando se comparan estadísticamente los valores medios de pH obtenidos para las distintas concentraciones de los enjuagues de sulfato de zinc en cada uno de los intervalos de tiempo estudiados, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$).

La tabla 30 y el gráfico 18, muestran los distintos valores medios de pH, para los individuos que utilizaron acetato de zinc al 0,1%, 0,5% y 1% para realizar el enjuague.

Tabla 30. Valores medios de pH de sujetos con enjuagues de acetato de zinc [(CH₃COO)₂Zn] a diferentes tiempos y distintas concentraciones

Tiempo	Valores de pH (X±DE)			Sig. (p)
	Acetato Zn 0,1% (n=6)	Acetato Zn 0,5% (n=6)	Acetato Zn 1% (n=7)	
Basal	7,36±0,28	7,05±0,30	6,91±0,23	NS (p=0,35)
30 min	7,25±0,36	6,95±0,33	6,83±0,41	NS (p=0,26)
60 min	7,21±0,31	6,95±0,28	6,77±0,42	NS (p=0,44)
90 min	7,25±0,10	6,93±0,35	6,93±0,63	NS (p=0,47)
120 min	7,21±0,17	7,06±0,28	6,93±0,58	NS (p=0,41)
24 horas	7,23±0,20	7,05±0,29	6,93±0,48	NS (p=0,66)
Sig. (p)	NS (p=0,23)	NS (p=0,61)	NS (p=0,52)	

X±DE: media ± desviación estándar; **n:** número de muestra; **min:** minutos; **Sig.:** Significación; **NS:** No significativo.

**Gráfica 18.** Valores medios de pH salival en los distintos intervalos de tiempo para sujetos que se enjuagaron con acetato de zinc a distintas concentraciones.

En los sujetos que realizaron enjuagues con acetato de zinc al 0,1%, el valor medio más alto de pH es el basal, descendiendo ligeramente en el resto de intervalos de tiempo. Entre los que realizaron enjuagues con acetato de zinc al 0,5%, el valor más alto se encuentra a los 120 minutos y en el grupo de acetato de zinc al 1%, éste valor se halla a los 90 minutos tras el enjuague. Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre los valores medios de pH obtenidos para las distintas concentraciones de los enjuagues de acetato de zinc en cada uno de los intervalos de tiempo estudiados.

En la tabla 31 se exponen los valores medios de pH encontrados en los sujetos que realizaron enjuagues con sulfato y acetato de zinc a una concentración del 0,1%, del 0,5% y del 1% respectivamente.

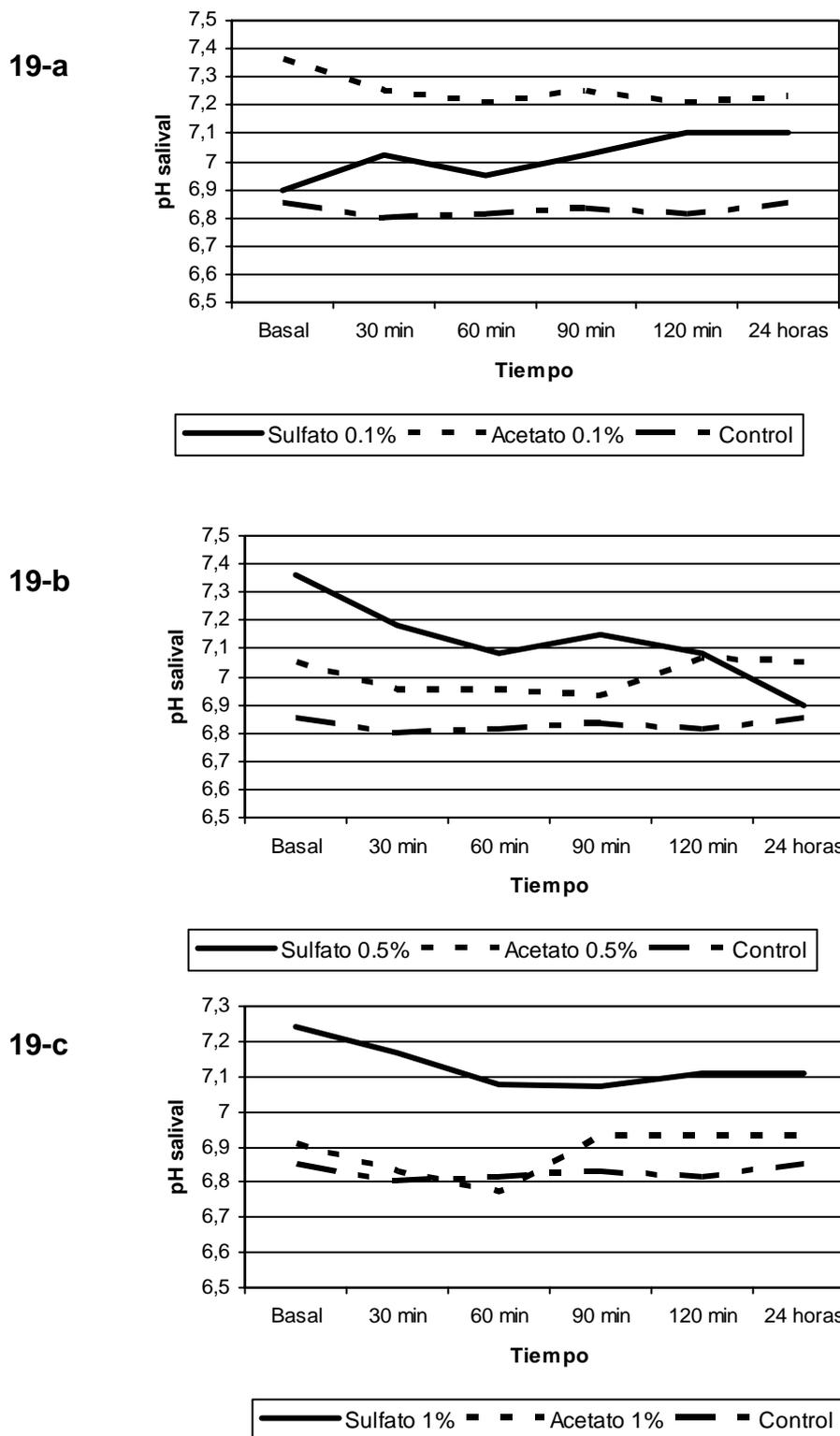
Tabla 31. Valores medios de pH en sujetos enjuagados con sulfato de zinc y acetato de zinc al 0,1%, 0,5% y 1% en los distintos intervalos de tiempo.

	n	Valores de pH salival (X±DE)					
		Basal	30 min.	60 min.	90 min.	120 min.	24 horas
Sulfato al 0,1%	7	6,96±0,26	7,02±0,45	6,95±0,48	7,02±0,41	7,10±0,33	7,10±0,26
Acetato al 0,1%	6	7,36±0,24	7,25±0,36	7,21±0,31	7,25±0,10	7,21±0,17	7,23±0,20
Sig. (p)		p<0,01	NS (p=0,34)	NS (p=0,28)	NS (p=0,22)	NS (p=0,45)	NS (p=0,30)
Sulfato al 0,5%	6	7,38±0,38	7,18±0,36	7,08±0,39	7,15±0,28	7,08±0,38	6,90±0,35
Acetato al 0,5%	6	7,05±0,30	6,95±0,33	6,95±0,28	6,93±0,25	7,06±0,28	7,05±0,29
Sig. (p)		NS (p=0,12)	NS (p=0,27)	NS (p=0,51)	NS (p=0,26)	NS (p=1,00)	NS (p=0,57)
Sulfato al 1%	7	7,24±0,43	7,17±0,26	7,08±0,29	7,07±0,37	7,11±0,20	7,11±0,38
Acetato al 1%	6	6,91±0,23	6,83±0,41	6,77±0,42	6,93±0,63	6,93±0,58	6,93±0,48
Sig. (p)		NS (p=0,16)	NS (p=0,10)	NS (p=0,10)	NS (p=0,63)	NS (p=0,49)	NS (p=0,47)

X±DE: media ± desviación estándar; **n:** número de muestra; **min:** minutos; **Sig.:** Significación; **NS:** No significativo

En ninguno de los casos, se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p>0,05$) entre los valores medios de pH, en los distintos intervalos de tiempo, de los sujetos que realizaron enjuagues con sulfato y acetato al 0,1%, en aquellos que los realizaron con las dos sales al 0,5% y en los que hicieron enjuagues con sulfato y acetato de zinc a una concentración del 1%,

En la gráfica 19 (a, b y c) se representan los valores medios de pH encontrados en los diferentes grupos: sulfato de zinc al 0,1%, acetato de zinc al 0,1% y control (gráfica a); sulfato de zinc al 0,5%, acetato de zinc al 0,5% y control (gráfica b) y sulfato de zinc al 1%, acetato de zinc al 1% y control (gráfica c).



Gráfica 19 a, b y c. Niveles medios de pH en los distintos intervalos de tiempo, distribuida la muestra según la solución y concentración de zinc utilizada.

Los valores medios de pH encontrados en el grupo control muestran una tendencia lineal sin variaciones significativas a lo largo del tiempo después del

enjuague, variando entre 6,80 y 6,85. No obstante, a pesar de no existir diferencias significativas entre los valores medios de pH en los distintos intervalos de tiempo se aprecia una disminución del pH hasta los 60 minutos tras el enjuague, para posteriormente aumentar hasta valores cercanos a un pH de 7.

La relación entre las concentraciones medias de zinc y los niveles medios de pH en los distintos intervalos de tiempo se reseña en la tabla 32. –se observa correlación negativa altamente significativa ($p < 0,01$) entre estos parámetros indicados desde los 60 min y hasta los 120 min después del enjuague (resaltado en el recuadro).

Tabla 32. Asociación entre los niveles de zinc y los valores de pH en saliva en los diferentes intervalos de tiempo.

		pH basal	pH 30 min.	pH 60 min.	pH 90 min.	pH 120 min.	pH 24horas
Zn basal	r	-0,015	-0,208	-0,228	-0,279	-0,223	-0,352
	p	0,950	0,635	0,321	0,221	0,330	0,128
Zn 30 min.	r	-0,260	-0,188	-0,353	-0,389	-0,416	-0,105
	p	0,255	0,414	0,117	0,081	0,061	0,659
Zn 60 min.	r	-0,351	-0,427	-0,539*	-0,594**	-0,595**	-0,328
	p	0,119	0,054	0,012	0,004	0,004	0,160
Zn 90 min.	r	-0,488*	-0,524*	-0,667**	-0,710**	-0,713**	-0,468*
	p	0,025	0,015	0,001	0,0001	0,0001	0,037
Zn 120 min.	r	-0,488*	-0,510*	-0,690**	-0,728**	-0,716**	-0,511*
	p	0,025	0,018	0,001	0,0001	0,0001	0,021
Zn 24 horas	r	-0,371	-0,120	-0,192	-0,237	-0,241	-0,178
	p	0,098	0,605	0,405	0,301	0,292	0,454

r: Coeficiente de Correlación de Pearson; p: significación; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$. min: minutos.

Se han encontrado diferencias significativas ($p < 0,001$) entre los valores del pH a todos los tiempos y la edad; es curioso destacar que los valores de pH para los sujetos mayores de 40 años son menores a 7 mientras que para los menores a 40 años son todos superiores a 7. No hay diferencias significativas entre el pH de hombres y mujeres incluidos en el estudio.

DISCUSIÓN

La eficacia de un enjuague bucal depende de su concentración, su substantividad, la duración del tratamiento y de la cooperación del paciente^{180,181}.

En general, la substantividad de un colutorio se determina por:

- su tiempo de permanencia en la cavidad oral
- la duración de su efecto sobre las bacterias salivares
- la reducción del número de bacterias en la placa dental

Tanto la permanencia del zinc en la cavidad oral como la eliminación del mismo en la saliva, son procesos que dependen intrínsecamente de cada individuo y también del anión que acompaña al metal en la sal. Este hecho justifica la utilización en este trabajo de varias sales de zinc, cuatro (nitrato, cloruro, sulfato y acetato) en el estudio preliminar y, finalmente, dos (sulfato y acetato) en el estudio definitivo.

La substantividad de un enjuague se define como la permanencia de su principio activo en la cavidad oral. La determinación directa de la proporción de zinc enlazado de alguna manera en la cavidad oral, que en realidad es la fracción del metal que permanece en la boca durante cierto período de tiempo, es metodológicamente imposible, a no ser que se usen marcadores radioactivos^{182,183}. Esta metodología no es de uso común y no está disponible con facilidad. Por tanto, la forma más sencilla de seguir la efectividad de los enjuagues que contengan zinc, es cuantificar sus niveles eliminados en la saliva y realizar recuentos bacterianos de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL) en saliva antes y después de cierto tiempo tras el enjuague.

¹⁸⁰ Elworthy A, Greenman J, Doherty FM, Newcombe RG, Addy M. The substantivity of a number of oral hygiene products determined by the duration of effects on salivary bacteria. *J Periodontol* 1996; 67: 572-6.

¹⁸¹ Loftsson T, Leeves N, Bjornsdottir B, Duffy L, Masson M. Effect of cyclodextrins and Polymers on Triclosan availability and substantivity in toothpastes in vivo. *J Pharm Sci* 1999; 88: 1254-58.

¹⁸² Afseth J, Oppermann RV, Rolla G. Accumulation of Cu and Zn in human dental plaque *in-vivo*. *Caries Res* 1983; 17: 310-14.

¹⁸³ Bonesvoll P, Lokken G, Rolla G, Paus PN. Retention of chlorhexidine in the human oral cavity after mouth rinses. *Arch Oral Biol* 1974; 19: 209-12.

En la literatura médica, existen pocos trabajos^{184,185,186,187} que estudien de forma individualizada los niveles de zinc y la substantividad de este oligoelemento en la cavidad oral. Se han encontrado niveles salivales medios de zinc que oscilan entre los $0,051\pm 0,014$ mg/L¹⁷⁸ y los $0,121\pm 0,480$ mg/L¹⁸¹ en saliva estimulada. En otros estudios, las determinaciones medias de zinc en saliva total no estimulada, establecen rangos entre $0,046$ a $0,23$ mg/L¹⁸⁰ o entre $0,028$ a $0,070$ mg/L¹⁸⁸.

En nuestro estudio, la concentración basal media de zinc, antes de realizar el enjuague es de $0,055\pm 0,017$ mg/L, un valor que se encuentra dentro de los límites normales publicados por los trabajos anteriormente mencionados. Entre los individuos estudiados existe una variación intrínseca en los niveles basales medios de zinc encontrados en saliva, los cuales oscilan entre los $0,020$ mg/L y los $0,100$ mg/L, con un coeficiente de variación del 30,9%.

Ninguno de los estudios previamente citados menciona correlación alguna entre la edad y el sexo con las concentraciones basales de zinc en la saliva. En el presente trabajo, no se encontró relación entre la edad y los valores medios basales de zinc en saliva. Sin embargo, sí se observó que los valores basales medios de zinc de los hombres ($0,065\pm 0,021$ mg/L) son estadísticamente más altos ($p < 0,05$) en relación con los encontrados en las mujeres ($0,050\pm 0,013$ mg/L). Esta diferencia podría deberse a la similitud en el comportamiento del zinc, el calcio y el estroncio en el organismo, y a la disposición de las mujeres a perder estos oligoelementos con mayor facilidad que los hombres¹⁸⁹.

¹⁸⁴ Henkin RI, Mueller CW, Wolf RO. Estimation of zinc concentration in parotid saliva by flameless atomic absorption spectrometry in normal subjects and in patients with idiopathic hypogeusia. *J Lab Clin Med* 1975; 86: 175-80.

¹⁸⁵ Watanabe M, Asatsuma M, Ikui A, Ikeda M, Yamada Y, Nombra S, Igarashi A. Measurements of several metallic elements and matrix metalloproteinases (mmps) in saliva from patients with taste disorder. *Chem Senses* 2005; 30:121-25.

¹⁸⁶ Menegario AA, Packer AP, Gine MF. Determination of Ba, Cd, Cu, Pb and Zn in saliva by isotope dilution direct injection inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analyst* 2001; 126: 1363-66.

¹⁸⁷ Kuraner T, Beksac MS, Kayakirilmaz K, Caglayan F, Onderoglu LS, Ozgunes H. Serum and parotid saliva testosterone, calcium, magnesium and zinc levels in males, with and without periodontitis. *Biol Trace Elem Res* 1991; 31: 43-9.

¹⁸⁸ Sighinolfi GP, Gorgona C, Bonori O, Canton E, Martelli M, Simonetti L. Comprehensive determination of trace elements in human saliva by ETAAS. *Microchim Acta* 1989; 1: 171-79.

¹⁸⁹ Burguera M, Burguera JL, Di Bernardo ML, Alarcon OM, Nieto E, Salinas JR, Burguera E. Age and sex-related calcium and strontium concentrations in different types of human bones. *Trace Elem Electrol* 2002; 19: 143-51.

Los valores medios de zinc en saliva, obtenidos en el presente trabajo a los 30 minutos de la administración de la única dosis de enjuague, son los más altos para posteriormente disminuir paulatinamente con el tiempo que dura el estudio (24 horas), independientemente de la sal utilizada (sulfato o acetato) (gráficos 7-9). Este hecho demuestra que los iones de zinc que quedan libres en la saliva se eliminan, posiblemente debido al reemplazo salival en la cavidad oral por la deglución. La semejanza en el comportamiento de las sales, es mayor para la concentración del 0,1% y se diferencia a medida que la concentración de zinc aumenta al 1%, siendo siempre los valores para acetato superiores a los de sulfato. Si bien estas diferencias sólo son significativas ($p < 0,05$) a los 30 minutos, indican, una vez más que el sulfato de zinc tendría mayor substantividad, hecho que podría tener implicaciones en su efecto sobre las bacterias.

El mecanismo de retención del zinc en la cavidad oral es electrostático; los iones positivos de zinc (Zn^{2+}) son atraídos por la pared celular de las bacterias, el *biofilm* formado sobre el esmalte de los dientes o por los grupos funcionales de las glicoproteínas de la mucosa oral que son cargados negativamente.

A pesar de que las concentraciones de zinc suministradas en los enjuagues fueron las mismas para los sujetos seleccionados en cada grupo experimental, los niveles de zinc medidos en las muestras de saliva en los distintos intervalos de tiempo después del enjuague fueron muy dispersos, subrayando la variabilidad individual con respecto al flujo salival y la frecuencia de deglución. Este hecho está evidenciado por los altos valores de los coeficientes de variación obtenidos a los 30 minutos (55,2%), 60 minutos (50,7%), 90 minutos (53,9%) y 120 minutos (59,8%) tras el enjuague.

Afseth y cols¹⁹⁰, analizaron la retención de zinc y cobre en la cavidad oral después de enjuague con soluciones acuosas de sulfato de cobre (0,1 mM) y acetato de zinc (2,5 mM). Coincidiendo con los resultados de nuestro trabajo, obtienen un buen comportamiento de ambos elementos en saliva a lo largo del tiempo, con un pico inicial para posteriormente disminuir paulatinamente hasta los

¹⁹⁰ Afseth J, Helgeland K, Bonesvoll P, Retention of Cu and Zn in the oral cavity following rinsing with aqueous solutions of copper and zinc salts. Scand J Dent Res 1983; 91: 42-45.

niveles basales después de 4 horas tras el enjuague. Estos autores sugieren que tal comportamiento representa la eliminación de los iones metálicos no absorbidos por las bacterias y/o los no enlazados a las glicoproteínas de la mucosa oral. En nuestro trabajo, los niveles medios de zinc se mantienen en la saliva en cantidades considerables a los 120 minutos después de usar un enjuague sin ningún otro agente antiséptico añadido. Incluso, después de 24 horas tras el enjuague, se observa que los niveles de zinc son superiores a los niveles basales del inicio del estudio, existiendo diferencias altamente significativas ($p < 0,001$). De igual forma, nuestros resultados, también reflejan que debe haber una fracción importante del ión Zn^{2+} adherido a los tejidos orales, y que es la responsable del efecto antimicrobiano.

La colonización microbiana de la cavidad oral es un proceso selectivo que depende de la capacidad intrínseca de cada microorganismo para adherirse a las superficies orales, de la disponibilidad de nutrientes y de las condiciones microambientales existentes¹⁹¹.

Los microorganismos obtienen la energía necesaria para su metabolismo gracias a reacciones de oxidación-reducción que tienen lugar a través de dos mecanismos fundamentales:

- Respiración (aerobia y/o anaerobia)
- Fermentación

La glucosa ocupa un lugar esencial en el metabolismo microbiano y su degradación conduce a una ruta metabólica de gran importancia: la glucólisis. En ella, la glucosa es degradada en dos moléculas de piruvato, con distintas acciones metabólicas¹⁹².

Los agentes antimicrobianos catiónicos están compuesto por iones cargados positivamente que tienen el potencial de interferir con el funcionamiento normal de la

¹⁹¹ Herrera E, editor. Bioquímica. Aspectos estructurales y vías metabólicas. 2ª ed. México DF: Interamericana McGraw-Hill; 1991.

¹⁹² Hans G, editor. General microbiology. 7th ed. Cambridge: Cambridge University Press; 1993.

pared bacteriana, con su capacidad de colonización y con el metabolismo de la glucosa¹⁹³.

Dentro de estos compuestos catiónicos se incluyen, entre otros, la clorhexidina, la hexetidina, el extracto de sanguinaria y algunos elementos metálicos como el zinc, el cobre o el estaño. La pared celular de las bacterias tiene carga negativa y en consecuencia atrae cualquier sustancia cargada positivamente. Las bacterias gram-positivas, dentro de las cuales se encuentra el *Streptococcus mutans*, son muy sensible a estos cationes, quienes probablemente alteran el funcionamiento de la membrana celular.

Adicionalmente, las glicoproteínas salivales contienen grupos funcionales cargados negativamente, que al atraer a los cationes, alteran la actividad enzimática, hecho que conduce a la inhibición de la producción de ácidos y álcalis por parte de las bacterias¹⁹⁴.

Existen diferentes formas de cuantificar la acción desarrollada por los compuestos catiónicos, dependiendo del objetivo perseguido en los diferentes estudios:

- Unos analizan el efecto antimicrobiano *in vivo*, realizando el recuento de las unidades formadoras de colonias (UFC) en saliva; o *in vitro*, estudiando el efecto en medios de cultivo.
- Otros, determinan los valores de pH de la placa bacteriana o del cultivo para analizar la inhibición de la glucólisis.
- En otros estudios sobre la halitosis, se cuantifican los niveles de compuestos sulfurados volátiles (VSC).
- Finalmente, otros estudios, entre los que se incluye el nuestro, miden en saliva los niveles de algunos oligoelementos u otros principios activos para evaluar su tiempo de permanencia en boca y su posible efecto antimicrobiano.

¹⁹³ Dahlman P. Antimicrobial agents and treatments with special reference to dental caries. 21 mayo 2005. Disponible en: URL: <http://www.db.od.mah.se/car/data/chemplaque.htm>

¹⁹⁴ Phan TN, Buckner T, Sheng J, Baldek JD, Marquis RE. Physiologic action of zinc related to inhibition of acid and alkali production by oral streptococci in suspensions and biofilms. *Oral Microbiol Immunol* 2004; 19: 31-8.

La clorhexidina es el agente antiséptico oral más estudiado en los últimos 30 años debido a su conocido efecto antimicrobiano inmediato. Consigue una reducción significativa de la cantidad de placa bacteriana y disminuye la inflamación gingival, incluso con una única aplicación diaria¹⁹⁵. Igualmente se le atribuye una destacada acción sobre la microbiota cutánea, reduciendo el número de bacterias de la piel¹⁹⁶.

Arweiler y cols¹⁹⁷, después de 12 horas del uso de dentífricos con clorhexidina al 0,1%, encontraron una importante reducción de la placa bacteriana, cifrada entre un 19% y 50%. Esto da una idea de la gran substantividad de este principio, constituyendo una de sus principales cualidades. Sin embargo, en este estudio, su uso prolongado presentó como efecto secundario la aparición de manchas en la lengua.

Bonesvoll y cols^{198,199} pusieron de manifiesto la gran substantividad de este agente, avalada por un porcentaje medio de retención en torno al 34±7% a las 24 horas después del enjuague. Asimismo, demostraron que la retención del gluconato de clorhexidina en la cavidad oral está condicionada por:

- Su concentración. Conforme aumenta la concentración, aumenta la retención; aunque ésta no sigue aumentando cuando las concentraciones son superiores al 0,4 %.
- La duración del enjuague.
- El pH de las soluciones usadas.

No obstante, entre los principales efectos secundarios derivados del uso prolongado de la clorhexidina se encuentran: la aparición de manchas en los dientes y tejidos blandos, la alteración del gusto, el desarrollo de cálculo supragingival y la irritación de la mucosa bucal. Estos efectos indeseables pueden minimizarse

¹⁹⁵ Clavero J, Baca P, Junco P, Gonzalez MP. Effects of 0.2% chlorhexidine spray applied once or twice daily on plaque accumulation and gingival inflammation in a geriatric population. *J Clin Periodontol* 2003; 30: 773-7.

¹⁹⁶ Larson EL, Laughon BE. Comparison of four antiseptic products containing chlorhexidine gluconate. *Antimicrob Agents Chemother* 1987; 31: 1572-1574.

¹⁹⁷ Arweiler NB, Ausschil TM, Reich E, Netuschil L. Substantivity of toothpaste slurries and their effect on reestablishment of the dental biofilm. *J Clin Periodontol* 2002; 29: 615-621.

¹⁹⁸ Bonesvoll P, Lokken P, Rolla G. Influence of concentration, time, temperature and pH on the retention of chlorhexidine in the human oral cavity after mouth rinses. *Arch Oral Biol* 1974; 19: 1025-29.

¹⁹⁹ Bonesvoll P, Lokken P, Rolla G, Paus PN. Retention of chlorhexidine in the human oral cavity after mouth rinses. *Arch Oral Biol* 1974; 19: 209-12.

añadiendo otros productos como el lactato de zinc al 0,34%, lo que permite reducir la concentración de clorhexidina al 0,12% o incluso, al 0,05% sin perder cualidades²⁰⁰.

El triclosán es un agente con actividad antimicrobiana frente a casi todas las bacterias relacionadas con el crecimiento de la placa dental. Sin embargo, según Loftsson y cols²⁰¹, cuando se usa como agente único, su substantividad en saliva es inexistente o muy escasa, posiblemente debido a su poca solubilidad en la saliva.

En cambio, al combinar el triclosán con β -ciclodextrina y carboximetil-celulosa, su substantividad se incrementa hasta 3 veces, extendiéndose su retención en boca durante una hora y media. No obstante, la incompatibilidad de la β -ciclodextrina con los aniones surfactantes del triclosán, la posibilidad de tinción dentaria no deseada y las posibles alteraciones del gusto, limitan el uso prolongado de productos de higiene oral que contienen estos compuestos.

Sin embargo, el reciente hallazgo de que el triclosán puede reaccionar con el cloro libre del agua potable y producir cloroformo por encima de los niveles permitidos, ha generado una gran controversia y ha puesto en entredicho el uso de este agente antibacteriano²⁰². El cloroformo (CHCl_3) es un compuesto químico clasificado como un posible cancerígeno humano.

El zinc ha sido relacionado con la inhibición del crecimiento de la placa bacteriana y con la disminución en la incidencia de caries dental²⁰³. Además se le atribuye una importante acción antiséptica sobre factores patógenos asociados con diversas patologías orales²⁰⁴.

²⁰⁰ Sanz M, Vallcorba N, Fabregues S, Muller I, Herkstroter F. The effect of a dentifrice containing chlorhexidine and zinc on plaque, gingivitis, calculus and tooth staining. *J Clin Periodontol* 1994; 21: 431-37.

²⁰¹ Loftsson T, Leeves N, Bjornsdottir B, Duffy L, Masson M. Effect of cyclodextrins and Polymers on Triclosan availability and substantivity in toothpastes in vivo. *J Pharm Sci* 1999; 88: 1254-1258.

²⁰² Rule KL, Ebbett VR, Vikesland PJ. Formation of chloroform and chlorinated organics by free-chlorine-mediated oxidation of Triclosan. *Envir Sci Tech* 2005; 39: 3176-85.

²⁰³ Izaguirre-Fernandez EJ, Eisenberg AD, Curzon MEJ. Interactions of zinc with fluoride on growth, glycolysis and survival of *Streptococcus mutans* GS-5. *Caries Res* 1989; 23: 18-25.

²⁰⁴ Clarke DE. Clinical and microbiological effects of oral zinc ascorbate gel in cats. *J Vet Dent* 2001; 18: 177-83.

Algunas enzimas vitales para las bacterias necesitan el ión Zn^{2+} para su óptimo metabolismo. De hecho, Aranha y cols²⁰⁵ han demostrado que el zinc en concentraciones extremadamente bajas (expresadas en μM) puede estimular el crecimiento del *Streptococcus mutans*, ya que es un micronutriente esencial. A concentraciones superiores a 0,1 mM, el zinc ejerce un efecto inhibitorio sobre el crecimiento bacteriano, posiblemente por su toxicidad. Esto permite suponer que el zinc guarda una estrecha relación con la supervivencia de las bacterias en la cavidad oral. Así el aumento en las concentraciones de zinc debería tener un efecto antibacteriano.

En la literatura científica consultada, se pone de manifiesto que los mecanismos de acción antimicrobiana desarrollados por el zinc no son aún bien conocidos. Probablemente esto es debido a la participación de múltiples mecanismos y a la complejidad de los mismos^{206,207,208}.

Diversos autores han realizado estudios sobre la eficacia de formulaciones comerciales en las que algunas sales de zinc han sido añadidas con el fin de incrementar el efecto antimicrobiano de conocidos principios activos, tales como la clorhexidina^{209,210}, el triclosán^{211,212}, la hexetidina²¹³ o la eritromicina²¹⁴.

Estudios farmacocinéticos demostraron que, aproximadamente entre el 25% y el 30% del zinc y el triclosán son retenidos en boca inmediatamente después del

²⁰⁵ Aranha H, Strachan C, Arceneaux JEL, Byers BR. Effect of Trace Metals on Growth of *Streptococcus mutans* in Teflon chemostat. *Infect Immunity* 1982; 35: 456-60.

²⁰⁶ Zero DT. Sugars: the arch criminal? *Caries Res* 2004; 38: 277-85.

²⁰⁷ Zeelie JJ, McCarthy TJ. Effects of copper and zinc ions on the germicidal properties of two popular pharmaceutical antiseptic agents cetylpyridinium chloride and povidone-iodine. *Analyst* 1998; 123: 503-507.

²⁰⁸ He G, Pearce EIF, Sissons CH. Inhibitory effect of $ZnCl_2$ on glycolysis in human oral microbes. *Arch Oral Biol* 2002; 47: 117-129.

²⁰⁹ Young A, Jonski G, Rolla G. Inhibition of orally produced volatile sulphur compounds by zinc, chlorhexidine or cetylpyridinium chloride- effect of concentration. *Eur J Oral Sci* 2003; 11: 400-404.

²¹⁰ Sanz M, Vallcorba N, Fabregues S, Muller I, Herkstroter F. The effect of a dentifrice containing chlorhexidine and zinc on plaque gingivitis, calculus and tooth staining. *J Clin Periodontol* 1994; 21: 431-437.

²¹¹ Nogueira-Filho GR, Toledo S, Cury JA. Effect of three dentifrices containing triclosan and various additives. An experimental gingivitis study. *J Clin Periodontol* 2000; 27: 494-498.

²¹² Schaeken MJM, van der Hoeven JS, Saxton CA, Cummins D. The effect of mouthrinses containing zinc and triclosan on plaque accumulation and development of gingivitis in a 3-week clinical test. *J Clin Periodontol* 1994; 21: 360-364.

²¹³ Grytten J, Tollefsen T, Afseth J. The effect of a combination of copper and hexetidine on plaque formation and the amount of copper retained by dental plaque bacteria. *Acta Odontol Scand* 1987; 45: 429-33.

²¹⁴ Fluhr JW, Bosch B, Gloor M, Hoffler U. In vitro and in vivo efficacy of zinc acetate against propionibacteria alone and combination with erythromycin. *Zentralbl Bakteriologie* 1999; 289: 445-456.

cepillado con dentífricos que contienen en su formulación un 0,75% de citrato de zinc y un 0,3% de triclosán^{215,216}. La retención se realiza preferentemente en el tejido gingival y en la placa dental. Este mismo grupo de investigación²¹⁷, observó que, con mayores concentraciones de zinc (sales al 2%), se mejoraban las propiedades del producto aumentando, tanto su retención en la placa como su actividad antimicrobiana, después del uso repetido.

De igual forma, Nogueira-Filho y cols²¹⁸ encontraron una gran efectividad en el uso de dentífricos que contienen triclosán y zinc, concluyendo que entre estos componentes existe un sinergismo en la actividad antimicrobiana.

El efecto positivo de estos agentes se explica por la capacidad del zinc para inhibir la glucólisis y, en consecuencia, minimizar la producción de ácidos por las bacterias²¹⁹. Ciertos dentífricos con formulaciones combinadas de citrato de zinc y triclosán²²⁰, consiguen reducir en un 99,9% las bacterias gram-positivas (*S. sanguis*, *S. oralis*, *S. mutans*, *Lactobacillus rhamnosus* y *Actinomyces naeslundii*) y en un 100% las gram-negativas (*Neisseria subflava*, *Veillonella dispar*, *Prevotella nucleatum*, *Fusobacterium nucleatum* y *Porphyromonas gingivalis*), demostrando así el amplio espectro de acción del producto. Nuestros resultados concuerdan con estos datos, encontrando porcentajes de reducción bacteriana de UFC/mL en saliva que se sitúan entre el 83,04% y el 98,00%. No obstante, en nuestro trabajo sólo se utiliza un único agente antimicrobiano y no la combinación de varios. Esto pone de manifiesto la gran capacidad bactericida del zinc por sí mismo.

²¹⁵ Brading MG., Marsh PD. The oral environment: the challenge for antimicrobial in oral care products. Int Dent J 2003; 53: 353-362.

²¹⁶ Finney M, Walker JT, Marsh PD, Brading MG. Antimicrobial effects of a novel Triclosan/zinc citrate dentifrice against mixed culture oral biofilms. Int Dent J 2003; 53: 371-378.

²¹⁷ Brading MG, Cromwell VJ, Jones NM, Bebington UK. Anti-microbial efficacy and mode of action study on a new zinc/Triclosan formulation. Int Dent J 2003; 53: 363-370.

²¹⁸ Nogueira-Filho GR, Toledo S, Cury JA. Effect of three dentifrices containing triclosan and various additives. An experimental gingivitis study. J Clin Periodontol 2000; 27: 494-498.

²¹⁹ Schaeker MJM, Van der Hoeven JS, Saxton CA, Cumminis D. The effect of mouthrinses containing zinc and triclosan on plaque accumulation and development of gingivitis in 3-week clinical test. J Clin Periodontol 1994; 21: 360-364.

²²⁰ Finney M, Walter JT, Marsh PhD, Brading MG. Antimicrobial effects of a novel triclosan/zinc citrate dentifrice against mixed culture oral biofilms. Int Dent J 2003; 63: 371-8

Fluhr y cols²²¹ estudiaron el efecto del uso de varios agentes antisépticos de forma individualizada y en combinación. Por un lado, utilizaron de forma independiente acetato de zinc y por otro, lo usaron en combinación con eritromicina, intentando conseguir la reducción del recuento de especies del género *Propionibacterium*. En sus resultados, encontraron que ambos tratamientos eran eficaces en la reducción de los recuentos bacterianos. Dado que las especies del género *Propionibacterium* eran resistentes a la eritromicina, el efecto antibacteriano a corto plazo fue atribuido principalmente a la acción del acetato de zinc.

Por su parte, Young y cols²²² estudiaron los efectos del zinc sobre la halitosis, encontrando que el acetato de zinc después de 3 horas tras el enjuague, consigue una importante inhibición de los compuestos sulfurados volátiles (VSC). En otro estudio, estos mismos autores²²³, profundizaron en este aspecto y compararon la inhibición de los VSC causantes de la halitosis con el uso de colutorios con compuestos de zinc a distintas concentraciones (0,1%, 0,3% y 1%), clorhexidina al 0,025% y cloruro de cetilpiridinio al 0,2%. En su trabajo, concluyeron que el efecto anti-halitosis del zinc es tiempo y dosis dependiente, con su mayor efecto al 1% a la hora del enjuague; en cambio la clorhexidina al 0,2% tiene efectividad parecida al zinc a las 3 horas, posiblemente debido a su excelente substantividad. El cloruro de cetilpiridinio no produjo mejoría clínica evidenciable por lo que se aconseja descartar su uso en el tratamiento del mal aliento.

Un estudio sistemático sobre la actividad antimicrobiana de varios iones metálicos (plata, cobre y zinc) ha evidenciado su acción inespecífica sobre diversos patógenos periodontales gram-negativos y sobre estreptococos gram-positivos²²⁴.

En 1922, Starr²²⁵ describió variaciones bastante amplias en el pH de la saliva de una serie de individuos normales, situándose el rango entre 5,75 y 7,05.

²²¹ Fluhr JW, Bosch B, Gloor M, Hoffler U. In vitro and in-vivo efficacy of zinc acetate against propioni bacteria alone and in combination with erythromycin. Zentralbl Bakteriologie 1999; 289: 445-56.

²²² Young AR, Jonski G, Rolla G. The oral anti-volatile sulphur compound effects of zinc salts and their stability constants. Eur J Oral Sci 2002; 110: 31-34.

²²³ Young A, Jonski G, Rolla G. Inhibition of orally produced volatile sulphur compounds by zinc, chlorhexidine or cetylpyridinium chloride- effect of concentration. Eur J Oral Sci 2003; 11: 400-4.

²²⁴ Spacciapoli P, Buxton D, Rothstein D, Friden P. Antimicrobial activity of silver nitrate against periodontal pathogens. J Periodont Res 2001; 36: 108-13

En 1935, Brawley²²⁶ en un amplio estudio sobre 3405 sujetos con edades comprendidas entre los 3 meses y los 101 años, halló un valor de pH salival medio de 6,75. Posteriormente, en 1940, Hanke²²⁷ en 323 niños, encontró valores de pH salival entre 6,1 y 6,5 en muestras de diversas partes de la boca.

En nuestro estudio se encontró un pH basal medio en saliva de $7,10 \pm 0,41$ con un rango de variación del pH basal de los voluntarios incluidos en el trabajo bastante amplio (5,9-7,7).

En los distintos intervalos de tiempo, los valores medios de pH oscilaron entre 7,10 en la determinación basal; 7,03 a los 30 minutos; 6,97 a los 60 minutos; 7,02 a los 90 minutos, 7,04 a los 120 minutos y finalmente, 7,02 a las 24 horas tras el enjuague. La ligera disminución del pH a los 60 minutos tras el enjuague con las sales de zinc (gráfica 17) podría ser la consecuencia de un efecto acidificante causado por las soluciones de los enjuagues, cuyo pH final en todos los casos fue ligeramente ácido. Este hecho pudo haber modificado la limitada capacidad reguladora de la saliva²²⁸. Esta aseveración es sostenida por los valores medios de pH salival relativamente constantes encontrados en el grupo control que se enjuagó con agua destilada y cuyo pH prácticamente no varió en los distintos intervalos de tiempo con respecto al valor medio basal²²⁹.

Lo interesante es que después de una hora de realizar el enjuague, se observa un ligero incremento en los valores del pH salival, hasta las dos horas después del enjuague. Si bien esta variación no es estadísticamente significativa con respecto al valor basal, podría indicar dos cosas:

²²⁵ Starr HE. Studies of human mixed saliva. I. The determination of the hydrogen ion concentration of human mixed saliva J Biol Chem 1922; 54: 43-55.

²²⁶ Brawley RE. Studies of the pH of normal resting saliva. II. Diurnal variation. J Dent Res 1935; 15: 79-86.

²²⁷ Hanke MT. Studies on the local factors in dental caries. Destruction of plaques and retardation of bacterial growth in the oral cavity. J Am Dent Assoc 1940; 27: 1379-93.

²²⁸ Altman PL, Dittmer DS, editors. Blood and other body fluids. Bethesda (MA): Federation of American Societies for Experimental Biology; 1971.

²²⁹ Martin RB. pH as a variable in free zinc ion concentration from zinc-containing lozenges. Antimicrob Agents Chemother 1988; 32: 608-9.

- La recuperación de la capacidad reguladora de la saliva, debido a la segregación continua de saliva en la cavidad oral, o
- la acción bactericida del zinc retenido en boca, que induce una disminución en la capacidad de producción de ácidos por parte de las bacterias que contribuiría a un aumento del pH. La inhibición de la glucólisis por el zinc, minimiza la acidogénesis bacteriana.

Esta última hipótesis es corroborada por el hecho que se ha encontrado una correlación inversa entre los niveles medios de zinc y el pH salival a los 60 minutos tras el enjuague. La tabla 30 muestra que los coeficientes de correlación de Pearson varían del -54% al -73%. Los coeficientes negativos indican que, a medida que la cantidad de zinc eliminada en la saliva disminuye en el tiempo, el pH aumenta. Como ya se ha dicho anteriormente, la acción bactericida del zinc retenido en la boca es capaz de: disminuir el número de colonias, inducir la pérdida del potencial metabólico de las células bacterianas, inhibir la glucólisis del *Streptococcus mutans* y, por ende, disminuir la formación de ácidos.

La correlación inversa entre los niveles salivales de zinc y la formación de ácidos ha sido descrita con anterioridad en algunos estudios²³⁰. Este hecho es una evidencia más de la efectividad del enjuague, puesto que demuestra que hay una porción importante de zinc retenida sobre las superficies orales que ejerce un efecto antimicrobiano durante un período de tiempo considerable. El mecanismo del efecto antimicrobiano no está del todo elucidado, aunque diversos estudios *in vitro* sugieren que los iones libres de zinc (Zn^{2+}) son los responsables del mismo. Estos iones Zn^{2+} tienen la propiedad de adherirse a los tejidos blandos y duros de la cavidad oral, así como sobre la pared de las células bacterianas^{231,232,233}. Además, se ha demostrado

²³⁰ Afseth J, Helgeland K, Bonesvoll P. Retention of Cu and Zn in the oral cavity following rinsing with aqueous solutions of copper and zinc salts. *Scand J Dent Res* 1983; 91: 42-5.

²³¹ Brading MG, Cromwell VJ, Jones NM, Baldeck JD, Marquis RE. Anti-microbial efficacy and mode of action study on a new zinc/Triclosan formulation. *Int Dent J* 2003; 53: 363-370.

²³² Phan TN, Buckner T, Sheng J, Baldek JD, Marquis RE. Physiologic action of zinc related to inhibition of acid and alkali production by oral streptococci in suspensions and biofilms. *Oral Microbiol Immunol* 2004; 19: 31-8.

²³³ He G, Pearce EIF, Sissons CH. Inhibitory effect of $ZnCl_2$ on glycolysis in human oral microbes. *Arch Oral Biol* 2002; 47: 117-29.

que los iones de zinc forman complejos estables con la gustina y las glicoproteínas presentes de manera natural en la saliva humana²³⁴.

Como ya se comentó con anterioridad en este apartado, el mecanismo de retención de los iones Zn^{2+} en la cavidad oral es electrostático. El transporte a través de la pared celular es inducido por la peroxidasa y una vez en el citoplasma, inhibe la actividad de las enzimas glicolíticas de la bacteria, responsables del metabolismo de la glucosa y cuyo producto de reacción son los ácidos. La interrupción de este proceso del metabolismo bacteriano desarrollado por el zinc, conduce a la muerte de las bacterias.

²³⁴ Shatzman AR, Henkin RI. Metal-binding characteristics of the parotid salivary protein gustin. *Biochem Biophys Acta* 1980; 29: 107-18.

CONCLUSIONES

Las conclusiones del presente trabajo son las siguientes:

- 1^a. El tiempo de permanencia del zinc en saliva se prolonga hasta las 24 horas tras el enjuague, con niveles de zinc superiores a los encontrados en las determinaciones basales del inicio del estudio, en los sujetos que se enjuagaron tanto con sulfato de zinc como con acetato de zinc en todas las concentraciones utilizadas, existiendo relación estadísticamente significativa ($p < 0,001$). La concentración media más alta de zinc en saliva ($4,130 \pm 1,242$ mg/L) se encuentra a los 30 minutos tras el enjuague con el acetato de zinc al 0,5%. De igual forma, con esta misma sal se obtienen los valores medios más elevados ($0,092 \pm 0,036$ mg/L) a las 24 horas del enjuague. No existen diferencias estadísticamente significativas entre los valores medios de zinc encontrados en los distintos intervalos de tiempo tanto para el sulfato como para el acetato de zinc, evidenciando que el tiempo de permanencia del zinc en saliva no depende de la sal utilizada.
- 2^a. El uso de enjuagues con distintas concentraciones de zinc ejerce una acción antibacteriana sobre el *Streptococcus mutans* produciendo una reducción significativa de las unidades formadoras de colonia por mililitro de saliva (UFC/mL), con porcentajes de reducción del 98,28%, 90,00% y 83,04% para el sulfato de zinc al 0,1%, 0,5% y 1% respectivamente y porcentajes del 83,85%, 89,24% y 83,16% para el acetato de zinc al 0,1%, 0,5% y 1% respectivamente. En el grupo control que se enjuagó con la solución placebo, el porcentaje de reducción es del 5,95%.
- 3^a. El mayor efecto antimicrobiano, cuantificado en el porcentaje de reducción de UFC/mL saliva, se consigue con el enjuague de sulfato de zinc al 0,1%. No obstante, no se encontró asociación estadísticamente significativa entre los porcentajes de reducción tanto para las distintas sales como para las diferentes concentraciones analizadas.

4^a. Los niveles medios de pH salival en los sujetos que realizaron enjuagues con sales de zinc oscilaron entre un valor de $6,92 \pm 0,37$ encontrado a los 60 minutos del enjuague con acetato de zinc y un valor de $7,12 \pm 0,35$ hallado a los 30 minutos del enjuague con sulfato de zinc. No existen diferencias estadísticamente significativas en ningún intervalo de tiempo, ni en ninguna de las dos sales analizadas. El uso de enjuagues con diferentes concentraciones de zinc no varía de forma significativa los niveles medios de pH salival.

BIBLIOGRAFÍA ORDENADA

- Abbasi A, Shethy K. Zinc: pathophysiological effects, deficiency status and effects of supplementation in elderly persons-an overview of the research. *Z Gerontol Geriatr* 1999; 32: 175-9.
- Afseth J, Helgeland K, Bonesvoll P. Retention of Cu and Zn in the oral cavity following rinsing with aqueous solution of copper and zinc salts. *Scand J Dent Res* 1983; 91: 42-5.
- Afseth J, Oppermann RV, Rolla G. Accumulation of Cu and Zn in human dental plaque in vivo. *Caries Res* 1983; 17: 310-14.
- Aguirre A, Testa-Weintraub LA, Banderas JA, Haraszthy GG, Reddy MS. Sialochemistry: a diagnostic tool? *Crit Rev Oral Biol Med* 1993; 4: 343-50.
- Alarcón OM. Elementos Biogénicos. 2ª ed. Mérida: Talleres Gráficos Universidad de los Andes; 2000.
- Altman PL, Dittmer DS, editors. Blood and other body fluids. Bethesda (MA): Federation of American Societies for Experimental Biology; 1971.
- Amerongen AV, Nieuw AD, Veerman ECI. Saliva: the defender of the oral cavity. *Oral Dis* 2002; 8: 12-22.
- Aranha H, Strachan RC, Arceneaux JEL, Byers BR. Effect of trace metals on growth of *Streptococcus mutans* in Teflon chemostat. *Infect Immun* 1982; 35: 456-60.
- Arnold LE, Pinkham SM, Votolato N. Does zinc moderate essential fatty acid and amphetamine treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder? *J Child Adolesc Psychopharmacol* 2000; 10: 111-17.
- Arweiler NB, Ausschill TM, Reich E, Netuschil L. Substantivity of toothpaste slurries and their effect on reestablishment of the dental biofilm. *J Clin Periodontol* 2002; 29: 615-621.
- Banas JA. Virulence properties of *Streptococcus mutans*. *Front Biosci* 2004; 1: 1267-77.
- Baran EJ. Química Bioinorgánica. Madrid: Editorial McGraw-Hill Interamericana; 1994.
- Bartlett H, Eperjesi F. Age-related macular degeneration and nutritional supplementation: a review of randomised controlled trials. *Ophthalmic Physiol Opt* 2003; 23: 383-99.

- Black RE. Zinc deficiency, infectious disease and mortality in the developing world. *J Nutr* 2003; 133: 1485S-9S.
- Blencowe DK, Morby AP. Zn(II) metabolism in prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev* 2003; 27: 291-311.
- Bogden JD. Influence of zinc on immunity in the elderly. *J Nutr Health Aging* 2004; 8:48-54.
- Bonesvoll P, Lokken P, Rolla G, Paus PN. Retention of chlorhexidine in the human oral cavity after mouth rinses. *Arch Oral boil.* 1974; 19: 209-12.
- Bonesvoll P, Lokken P, Rolla G. Influence of concentration, time, temperature and pH on the retention of clorhexidina in the human oral cavity after mouth rinses. *Archs Oral Biol.* 1974; 19: 1025-29.
- Brading MG, Cromwell VJ, Jones NM, Bebington UK. Anti-microbial efficacy and mode of action study on a new zinc/Triclosan formulation. *Int Dent J* 2003; 53: 363-370.
- Brading MG, Marsh PD. The oral environment: the challenge for antimicrobial in oral care products. *Int Dent J* 2003; 53: 353-362.
- Brawley RE. Studies of the pH of normal resting saliva. II. Diurnal variation. *J Dent Res* 1935; 15: 79-86.
- Brody I. Topical treatment of recurrent herpes simple and post-herpetic erythema multiforme whit low concentration of zinc sulphate solution. *Dermatol* 1981; 104: 191-94.
- Brunetto MR, Alarcon OM, Davila E, Contreras Y, Gallignani M, Rondon C, Burguera JL, Burguera M, Angarita C. Serum trace elements and fat-soluble vitamins A and E in healthy pre-school children from a Venezuelan rural community. *J Trace Elem Med Biol* 1999; 13: 40-50.
- Burguera JL. *Flow Injection Atomic Spectrometry. Practical Spectroscopy Series, Vol. 7.* New York: Marcel Dekker; 1989.
- Burguera M, Burguera JL, Di Bernardo ML, Alarcon OM, Nieto E, Salinas JR, Burguera E. Age and sex-related calcium and strontium concentrations in different types of human bones. *Trace Elem Electrol* 2002; 19: 143-51.
- Bury NR, Walker PA, Glover CN. Nutritive metal uptake in teleost fish. *J Exp Biol* 2003; 206: 11-23.

- Camara F, Amaro MA. Nutritional aspect of zinc availability. *Int J Food Sci Nutr* 2003; 54: 143-51
- Chicharro JL, Serrano V, Urena R, Gutierrez AM, Carvajal A, Fernandez-Hernando P, Lucia A. Trace elements and electrolytes in human resting mixed saliva after exercise. *Br J Sports Med* 1999; 33: 204-7.
- Chow AW. Infection of the Oral Cavity, Neck and Head. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. *Principles and Practices of Infectious Diseases*. 5th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2000. p. 278-326.
- Christian P. Micronutrients and reproductive health issues: an international perspective. *J Nutr* 2003; 133: 1969S-73S.
- Clarke D. Clinical and microbiological effects of oral zinc ascorbate gel in cats. *Vet Dent* 2001; 18: 177-83.
- Clavero J, Baca P, Junco P, Gonzalez MP. Effects of 0.2% chlorhexidine spray applied once or twice daily on plaque accumulation and gingival inflammation in a geriatric population. *J Clin Periodontol* 2003; 30: 773-7.
- Cohen DJ, Malave D, Ghidoni JJ, Iakovidis P, Everett MM, You S, Liu Y, Boyan BD. Role of oral bacterial flora in calcific aortic stenosis: an animal model. *Ann Thorac Surg* 2004; 77: 537-43.
- Coitzas G. Importance of trace substances in environmental health as exemplified by manganese. 1st Ann Conf Trace Subst Environ Health. Columbia (USA); 1997.
- Coleman J. Zinc proteins: enzymes, storage proteins, transcription factors, and replication proteins. *Biochem J* 1992; 61: 897-946.
- Cotton FA, Wilkinson G. *Fundamentos de Química Inorgánica*. 4^o ed. México D.F.: Ed. Limusa SA; 1986.
- Cousins R, Hempe J. Zinc. En: Brown ML, Filer LJ, Guthrie HA, Levander OA, McCormick DB, Olson RE, editores. *Conocimientos actuales sobre nutrición*. 6^a ed. esp. Washinton DC: OPS; 1991.
- Dahlman P. Antimicrobial agents and treatments with special reference to dental caries. 21 mayo 2005. Disponible en: URL: <http://www.db.od.mah.se/car/data/chemplaque.htm>.
- Devlin T. *Bioquímica: Libro de Texto con Aplicaciones Clínicas*. Vol II. 3^a ed. México DF: Editorial Reverte, SA; 2000.

- Diccionario de ciencias médicas. Buenos Aires: Editorial Panamericana; 1999
- Dicks D, Rojhami A, Cossack ZT. The effect of growth hormone treatment on growth in zinc deficient rats. *Nutr Res* 1993; 13: 701-13.
- Dolin R, editor. Principles and practice of infectious diseases. 5th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2000.
- Dreno B. Topical antibacterial therapy for acne vulgaris. *Drugs* 2004; 64: 2389-97.
- Edweng AM, Rally JB. Essential of dental caries: the Diseases and its management. London: Wright; 1987.
- Elmstahl S, Gullberg B, Janzon L, Johnell O, Elmstahl B. Increased incidence of fractures in middle-aged and elderly men with low intakes of phosphorous and zinc. *Osteoporosis Int* 1998; 8: 333-40.
- Elworthy A, Greenman J, Doherty FM, Newcombe RG, Addy M. The substantivity of a number of oral hygiene products determined by the duration of effects on salivary bacteria. *J Periodontol* 1996; 67: 572-576.
- Endre L. Recurrent aphthous ulceration with zinc deficiency and cellular immune deficiency. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1991; 123: 503-07.
- Faure P. Protective effects of antioxidant micronutrients (vitamin E, zinc and selenium) in type 2 diabetes mellitus. *Clin Chem Lab Med* 2003; 41: 995-8.
- FDI Working Group 10, CORE, Saliva: its role in health and disease, *Int Dent J* 1992; 42: 291-304.
- Feng P, Liang JY, Li TL, Guan ZX, Zou J, Franklin R, Costello LC. Zinc induces mitochondria apoptogenesis in prostate cells. *Mol Urol* 2000; 4: 31-6.
- Ferencik M, Ebringer L. Modulatory effects of selenium and zinc on the immune system. *Folia Microbiol (Praha)* 2003; 48:417-26.
- Finney M, Walker JT, Marsh PD, Brading MG. Antimicrobial effects of a novel Triclosan/zinc citrate dentifrice against mixed culture oral biofilms. *Int Dent J* 2003; 53: 371-378.
- Fluhr JW, Bosch B, Gloor M, Hoffler U. In vitro and in vivo efficacy of zinc acetate against propioni bacteria alone and combination whit erytromycin. *Zentralbl Bakteriol.* 1999; 289: 445-6.

- Fosmire G. Zinc toxicity. *Am J Clin Nutr* 1990; 51: 225-28.
- Freaque HC, Govoni KE, Guda K, Huang C, Zinn SA. Actions and Interactions of Thyroid Hormone and Zinc Status in Growing Rats. *J Nutr* 2001; 131: 1135-41.
- Frederickson CJ, Suh SW, Silva D, Thompson RB. Importance of zinc in the central nervous system: the zinc containing neuron. *J Nutr* 2000; 130: 1471S-83S.
- Fuchs O, Babusiak M, Vyoral D, Petrak J. Role of zinc in eukaryotic cells, zinc transporters and zinc-containing proteins. Review article. *Sb Lek* 2003; 104:157-70.
- Gaetke LM, Chow CK. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology* 2003; 189: 147-63.
- García L. Suplementos vitamínicos con zinc son útiles en la degeneración macular asociada a la edad. *Arch Soc Esp Oftalmol* 2002; 77: 57-8.
- Gold OG, Jordan HV, Van Houte VJ. A selective medium for *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol* 1973; 18: 1357-64.
- Golden M. The Diagnosis of Zinc Deficiency. In: Mills CF, editor. *Zinc in Human Biology*. London: Springer-Verlag; 1989.
- Grytten J, Tollefsen T, Afseth J. The effect of a combination of copper and hexetidine on plaque formation and the amount of copper retained by dental plaque bacteria. *Acta Odontol Scand* 1987; 45: 429-33.
- Hambidge K, Hambidge C, Jacobs M, Baum D. A mechanism for regulation of insulin release in hypoxia. *Pediatr Res* 1972; 6: 868-71.
- Hambridge M. Human zinc deficiency. *J Nutrition* 2000; 130: 1344S-49S.
- Hammond GL, Avvakumov GV, Muller YA. Structure/function analyses of human sex hormone-binding globulin: effects of zinc on steroid-binding specificity. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2003; 5:195-200.
- Hanke MT. Studies on the local factors in dental caries. Destruction of plaques and retardation of bacterial growth in the oral cavity. *J Am Dent Assoc* 1940; 27: 1379-93.
- Hans G, editor. *General microbiology*. 7th ed. Cambridge: Cambridge University Press; 1993.

- Hansonn A. Extracellular zinc ions induce mitogen-activated protein kinase activity and protein tyrosine phosphorylation in bombesin-sensitive Swiss 3T3 fibroblasts. *Arch Biochem Biophys* 1996; 328: 233-38.
- Harper H, Rodwell V, Mayes P. *Manual de Química Fisiológica*. México DF: Editorial Moderno; 1980.
- He G, Pearce EIF, Sissons CH. Inhibitory effect of ZnCl₂ on glycolysis in human oral microbes. *Arch Oral Biol* 2002; 47: 117-129.
- Henkin RI. Trace metals in endocrinology. *Med Clin North Am* 1976; 60: 797-801.
- Henkin RI, Martin BM, Agarwal RP. Decreased parotid saliva gustin/carbonic anhydrase VI secretion: an enzyme disorder manifested by gustatory and olfactory dysfunction. *Am J Med Sci* 1999; 318: 380-91.
- Henkin RI, Mueller CW, Wolf RO. Estimation of zinc concentration in parotid saliva by flameless atomic absorption spectrometry in normal subjects and in patients with idiopathic hypogeusia. *J Lab Clin Med* 1975; 86: 175-80.
- Hernández C, Estévez A. Función del zinc en la recuperación inmunonutricional de los lactantes malnutridos. *Rev Cub Alim Nutr* 2000; 14: 65-70.
- Herrera E, editor. *Bioquímica. Aspectos estructurales y vías metabólicas*. 2ª ed. Mexico DF: Interamericana McGraw-Hill; 1991.
- Hsu D, Meyer J, Gerson S, Daniel J. Sequence of changes in rat buccal mucosa induced by zinc deficiency. *J Oral Pathol* 1988; 17: 186-90.
- Hsu DJ, Daniel J, Gerson SJ. Effect of zinc deficiency on keratins in buccal epithelium of rats. *Arch Oral Biol* 1991; 36: 759-63.
- Ibs KH, Rink L. Zinc-altered immune function. *J Nutr* 2003; 133: 1452S-6S.
- Izaguirre-Fernandez EJ, Eisenberg AD, Curzon MEJ. Interactions of zinc whit fluoride on growth, Glycolysis and Survival of *Streptococcus mutans* GS-5. *Caries Res* 1989; 23: 18-25.
- Jackson M. Physiology of zinc. General aspects. In: Mills CF. editor. *Zinc in human biology*. London: Springer-Verlag; 1989.
- Jackson RJ. Metal salts, essential oils and phenols: old or new? *Periodontol* 2000 1997; 15: 63-73.

- Johnson DA, Lopez H, Navia JM. Effects of protein deficiency and diet consistency on the parotid gland and parotid saliva of rats. *J Dent Res* 1995; 74: 1444-52.
- Kawamura Y, Hou XG, Sultana F, Miura H, Ezaki T. Determination of 16S rRNA sequences of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus gordonii* and phylogenetic relationships among members of the genus *Streptococcus*. *Int J Syst Bact* 1995; 45: 406-8
- Keen CL, Hanna LA, Lanoue L, Uriu-Adams JY, Rucker RB, Clegg MS. Developmental consequences of trace mineral deficiencies in rodents: acute and long-term effects. *J Nutr* 2003; 133: 1477S-80S.
- Klotz LO, Kroncke KD, Buchczyk DP, Sies H. Role of copper, zinc, selenium and tellurium in the cellular defense against oxidative and nitrosative stress. *J Nutr* 2003; 133:1448S-51S
- Kolpakova AF. Role of environmental pollution with heavy metals in chronic pulmonary diseases pathogenesis in north regions. *Med Tr Prom Ekol* 2004; 56: 14-9.
- Kordas K, Stoltzfus RJ. New evidence of iron and zinc interplay at the enterocyte and neural tissues. *J Nutr* 2004; 134: 1295-8.
- Krause RM. Symposium on relationship of structure of microorganisms to their immunological properties. Antigenic and biochemical composition of hemolytic streptococcal cell walls. *Bacteriol Rev* 1963; 27: 369-80.
- Kuraner T, Beksac MS, Kayakirilmaz K, Caglayan F, Onderaglu LS, Ozgunes H. Serum and parotid saliva testosterone, calcium, magnesium and zinc levels in males with and without periodontitis. *Biol Trace Elem Res.* 1991; 31:43-9.
- Lancefield RC. Specific relationships on cells composition to biological activity of hemolytic streptococci. *Harvey Lectures* 1941; 36: 250-90.
- Larson EL, Laughon BE. Comparison of four antiseptic products containing chlorhexidine gluconate. *Antimicrob Agents Chemother* 1987; 31: 1572-1574.
- Liang JY, Liu YY, Zou J, Franklin RB, Costello LC, Feng P. Inhibitory effect of zinc on human prostatic carcinoma cell growth. *Prostate* 1999; 40: 200-7.

- Liébana J, González MP, Liébana MJ, Parra L. Composición y ecología de la microbiota Oral. En: Liébana J, editor. Microbiología oral. 2ª ed. Madrid: Editorial Interamericana McGraw-Hill; 2002. p. 515-25.
- Liébana J, Rodríguez JM, Insinilla S, Álvarez M. Determinantes ecológicos orales. En: Negroni M, editor. Microbiología estomatológica. Fundamentos y guía practica. Buenos Aires: Editorial Panamericana; 1999. p. 61-87.
- Liu B, Rayment SA, Gyurko C, Oppenheim FG, Offner GD, Troxler RF. The recombinant N-terminal region of human salivary mucin MG2 (MUC7) contains a binding domain for oral *Streptococci* and exhibits candidicidal activity. *Biochem J* 2000; 345: 557-64.
- Loftsson T, Leeves N, Bjornsdottir B, Duffy L, Masson M. Effect of cyclodextrins and Polymers on Triclosan availability and substantivity in toothpastes in vivo. *J Pharm Sci* 1999; 88: 1254-1258.
- Luckey TD, Venugopal B. Physiological and Chemical Basis for Metal Toxicity: Metal Toxicity in Mammals. Vol. 1, New York: Plenum Press; 1997.
- Ma ZJ, Zhang JZ. Changes in serum zinc level of periodontitis whit kidney deficiency. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi* 1993; 13: 606-7.
- MacDonald RS. The role of zinc in growth and cell proliferation. *J Nutr* 2000; 130: 1500S-8S.
- Maestre M, Maestre Vera JR. Biofilm: modelo de comunicación bacteriana y resistencia a los antimicrobianos. *Rev Esp Quimioterap* 2004; 7: 26-8.
- Marcantoni M. Ecología de la cavidad bucal. En: Negroni M, editor. Microbiología estomatológica. fundamentos y guía practica. Buenos Aires: Editorial Panamericana; 1999. p. 23-44.
- Marsh PD. Antimicrobial strategies in the prevention of dental caries. *Caries Res* 1993; 27: 72-6.
- Martin RB. pH as a variable in free zinc ion concentration from zinc-containing lozenges, *Antimicrob Agents Chemother* 1988; 32: 608-9.
- Mathur A, Wallenius K, Abdulla M. Influence of zinc on the onset and progression of oral carcinogenesis in rats. *Act Odontol Scand* 1979; 37: 277-84.

- Matseshe J, Philips S, Malagelada J, McCall J. Recovery of dietary iron and zinc from the proximal intestine of healthy man: studies of different meals and supplements *Am J Clin Nutr* 1980; 33: 1946-53.
- Mayoral LG. Fisiología digestiva. Secreción salival. Cali (Colombia): Universidad del Valle; 1996.
- McCall KA, Huang Ch-Ch, Fierke CA. Function and mechanism of zinc metalloenzymes. *J Nutr* 2000; 130: 1437S-46S.
- Medina M, Merino I, Gorodner J. Utilidad de la saliva como fluido diagnóstico. Resistencia-Chaco (Argentina): Instituto de Medicina Regional, Universidad Nacional del Nordeste; 2002.
- Menegario AA, Packer AP, Gine MF. Determination of Ba, Cd, Co, Pb and Zn in saliva by isotope dilution direct injection inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analyst* 2001; 126: 1363-66.
- Merchant HW, Gangarosa LP, Glassman AB, Sobel RE. Zinc sulfate supplementation for treatment of recurring oral ulcers, *South Med J* 1977; 70: 559-61.
- Mertz W. The essential trace elements. *Science* 1981; 213: 1132-38.
- Moizé Arcone V. Dietas con Modificación de la Textura y la Consistencia. Dietas Progresivas. En: Salas-Salvadó J, Bonada I, Trallero Casañas R, Saló I Solá ME., editores. *Nutrición y Dietética Clínica*. Barcelona: Ediciones Doyma; 2000. p. 287-325.
- Monaci F, Bargagli E, Bravi F, Rottoli P. Concentrations of major elements and mercury in unstimulated human saliva. *Biol Trace Elem Res* 2002; 89: 193-203.
- Moser-Veillon P. Zinc: consumption patterns and dietary recommendations *J Am Diet Assoc* 1990; 90: 1089-94.
- Moyad MA. Zinc for prostate disease and other conditions: a little evidence, a lot of hype, and a significant potential problem. *Urol Nurs* 2004; 24: 49-52.
- Negroni M. Crecimiento, nutrición y metabolismos bacterianos. En: Negroni M, editor. *Microbiología Estomatológica. fundamentos y Guía Práctica*. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 1999. p. 115-40.
- Nelson DL, Cox MM, Cuchillo CM. *Lehninger: Principios de Bioquímica*. 3ª ed. Barcelona: Ed. Omega; 2001.

- Neve J, Clinical implications of trace elements in endocrinology. *Biol Trace Elem Res* 1992; 32: 173-185.
- Nogueira-Filho GR, Toledo S, Cury JA. Effect of three dentifrices containing triclosan and various additives. An experimental gingivitis study. *J Clin Periodontol* 2000; 27: 494-498.
- Pathak P, Kapil U. Role of trace elements zinc, copper and magnesium during pregnancy and its outcome. *Indian J Pediatr* 2004; 71: 1003-5.
- Paul RR, Chatterjee J, Das AK, Dutta SK, Roy D. Zinc and iron as bioindicators of precancerous nature of submucous fibrosis. *Biol Trace Elem Res* 1996; 54: 213-30.
- Peretz B, Sarit F, Eidelman E, Steinberg D. Mutans streptococcus counts following treatment for early childhood caries. *J Dent Child (Chic)* 2003; 70: 111-4.
- Phan TN, Buckner T, Sheng J, Baldek JD, Marquis RE, Physiologic action of zinc related to inhibition of acid and alkali production by oral streptococci in suspensions and biofilms. *Oral Microbiol Immunol* 2004; 19: 31-8.
- Pories WJ, Henzel JH, Rob CG, Strain WH. Acceleration of healing with zinc sulfate. *Ann Surg* 1967; 165: 432-36.
- Prasad AS, Oberleas D. Deficiency of zinc in man. *Lancet* 1973; 30: 1520-1.
- Rivera MT, De Souza AP, Araujo-Jorge TC, De Castro SL, Vanderpas J. Trace elements, innate immune response and parasites. *Clin Chem Lab Med* 2003; 41:1020-5.
- Roldan S, Winkel EG, Herrera D, Sanz M, Van Winkelhoff AJ. The effects of a new mouthrinse containing chlorhexidine, cetylpyridinium chloride and zinc lactate on the microflora of oral halitosis patients: a dual-centre, double-blind placebo-controlled study. *J Clin Periodontol* 2003; 30: 427-34.
- Rotta J, Krause RM, Lancefield RC, Everly W, Lackland H. New approaches for the laboratory recognition of M types of group A streptococci. *J Exp Med* 1971; 134: 1298-315

- Rule KL, Ebbett VR, Vikesland PJ. Formation of chloroform and chlorinated organics by free-chlorine-mediated oxidation of Triclosan. *Envir Sci Tech* 2005; 39: 3176-85.
- Russel RM, Morrison SA, Smith FR, Oaks EV, Carney EA. Vitamin A reversal of abnormal dark adaptation in cirrhosis. *Ann Int Med* 1978; 88: 622-26.
- Sandstrom B, Cederblad A, Lindblad BS, Lonnerdal B. Acrodermatitis enteropathica, zinc metabolism, copper status, and immune function. *Arch Pediatr Adolesc Med* 1994; 148: 980-5.
- Santos SL, Conforti N, Mankodi S, Kohut BE, Yu D, Wu MM, Parikh R. Anticalculus effect of two zinc citrate/essential oil-containing dentifrice. *Am J Dent* 2000; 13: 11C-13C
- Sanz M, Vallcorba SF, Muller I, Herkstroter F. The effect of a dentifrice containing chlorhexidine and zinc on plaque, gingivitis, calculus and tooth staining. *J Clin Periodontol* 1994; 21: 431-7.
- Schaecken MJM, van der Hoeven JS, Saxton CA, Cummins D. The effect of mouthrinses containing zinc and triclosan on plaque accumulation and development of gingivitis in a 3-week clinical test. *J Clin Periodontol* 1994; 21: 360-4.
- Schlegel L, Grimont F, Grimont P, Bouvet A. New group D streptococcal species. *Indian J Med Res* 2004; 119: 252-6.
- Shatzman AR, Henkin RI. Metal-binding characteristics of the parotid salivary protein gustin. *Biochim Biophys Acta* 1980; 29: 107-18.
- Shear M. The structure and function of myoepithelial cells in salivary gland. *Arch Oral Biol* 1966; 11: 769-80.
- Sheiham A. Is the chemical prevention of gingivitis necessary to prevent severe periodontitis? *Periodontol 2000* 1997; 15: 15-24.
- Sighinolfi GP, Gorgona C, Bonori O, Canton E, Martelli M, Simonetti L. Comprehensive determination of trace elements in human saliva by ETAAS. *Microchim Acta* 1989; 1: 171-79.
- Silverman JE, Weber CW, Silverman S Jr. Zinc supplementation and taste in head and neck cancer patients undergoing radiation therapy. *J Oral Pathol Med* 1983; 38: 14-6.

- Silverman S. Complications of treatment. In: Silverman S Jr, editor. Oral Cancer. 5th ed. Hamilton: BC Decker Inc; 2003. p. 113-28.
- Situ H, Bobek LA. *In vitro* assessment of antifungal therapeutic potential of salivary histatin-5, two variants of histatin-5, and salivary mucin (MUC7) domain 1. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44: 1485-93.
- Slavin W, Graphite Furnace AAS. A Source Book. Norwalk (USA): Perkin–Elmer Corporation, Order nº. 0993-8139; 1984.
- Slikker W Jr, Andersen ME, Bogdanffy MS, et al. Dose-dependent transitions in mechanisms of toxicity: case studies. Toxicol Appl Pharmacol 2004; 201: 226-94.
- Sociedad Española de Periodoncia y Osteointegración. Vademecum de Higiene Oral. Madrid: Editorial Dital, SAL; 2000.
- Spacciapoli P, Buxton D, Rothstein D, Friden P. Antimicrobial activity of silver nitrate against periodontal pathogens. J Periodontal Res 2001; 36: 108-13.
- Stallard L, Reeves PG. Zinc Deficiency in adult rats reduces the relative abundance of testis-specific angiotensin-converting enzyme mRNA. J Nutr 1997; 127: 25-9.
- Starr HE. Studies of human mixed saliva. I. The determination of the hydrogen ion concentration of human mixed saliva J Biol Chem 1922; 54: 43-55.
- Stehbens WE. Oxidative stress, toxic hepatitis, and antioxidants with particular emphasis on zinc. Exp Mol Pathol 2003; 75: 265-76.
- Stephan F, Revuz J. Zinc salts in dermatology. Ann Dermatol Venereol 2004; 131: 455-60.
- Stoncius LV, Asharafi SH, Meyer J. Ultrastructure of mast cells in the hyperplastic buccal mucosa of the zinc deficient rat. J Oral Pathol 1985; 14: 375-82
- Sweeney MP, Bagg J, Fell, Yip B. The relation between micronutrient depletion and oral health in geriatrics. J Oral Pathol Med 1994; 23: 168-71.
- Takeda A. Movement of zinc and its functional significance in the brain. Brain Res Rev 2000; 34: 137-48

- Tamura T, Konishi Y. Mechanisms of transcriptional regulation and neural gene expression. *Neurochem Int* 1996; 29: 573-81.
- Thibodeau EA, O'Sullivan DM. Salivary mutans streptococci and incidence of caries in preschool children. *Caries Res* 1995; 29: 148-53.
- Thomson CD, Robinson MF. Selenium in human health and disease with emphasis on those aspects peculiar to New Zealand. *Am J Clin Nutr* 1980; 33: 303-23.
- Todd WR. Digestión de alimentos. En: Staunton E, Todd WR, Mason HS, Van Bruggen JT, editores. *Bioquímica médica*. Barcelona: Editorial Interamericana; 1966. p. 39-56.
- Torres M, Rodriguez A, Saura F. Effects of dietary fiber and phytic acid on mineral availability. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1991; 30: 1-22.
- Tvinnereim HM, Eide R, Riise T, Fosse G, Wesenberg GR. Zinc in primary teeth from children in Norway. *Science Total Environ* 1999; 226: 201-12.
- Tvinnereim HM, Eide R, Riise T. Heavy metals in human primary teeth: some factors influencing the metal concentration. *Science Total Environ* 2000; 227: 21-7.
- Underwood EJ, Trace elements in human and animal nutrition. 4^a ed. New York: Academic Press; 1997.
- Walker CF, Black RE. Zinc and the risk for infectious disease. *Ann Rev Nutr* 2004; 24: 255-75.
- Watanabe M, Asatsuma M, Ikui A, Ikeda M, Yamada Y, Nombra S, Igarashi A. Measurements of several metallic elements and matrix metalloproteinases (mmps) in saliva from patients with taste disorder. *Chem Senses* 2005; 30: 121-125.
- Welz B, Sperling M. *Atomic Absorption Spectrometry*, 3rd ed. Weinheim (Germany): Willey-VCH; 1999.
- Winkel EG, Roldan S, Van Winkelhoff AJ, Herrera D, Sanz M. Clinical effects of a new mouthrinse containing chlorhexidine, cetylpyridinium chloride and zinc lactate on oral halitosis. A dual-center, dual-blind placebo-controlled study. *J Clin Periodontol* 2003; 30: 300-6

-
- Wong L, Sissons CH, Pearce EI, Cutress TW. Calcium phosphate deposition in human dental plaque microcosm biofilms induced by a ureolytic pH-rise procedure. *Arch Oral Biol* 2002; 47: 779-90.
 - World Health Organization WHO. Zinc. In: *Trace Elements in Human Nutrition and Health*. Geneva: WHO; 1996.
 - Young A, Jonski G, Rolla G. Inhibition of orally produced volatile sulphur compounds by zinc, chlorhexidine or cetylpyridinium chloride- effect of concentration. *Eur J Oral Sci* 2003; 11:400-404.
 - Young A, Jonski G, Rolla G, Waler SM. Effects of metal salts on the oral production of volatile sulphur-containing compounds (VSC). *J Clin Periodontol* 2001; 28: 776-781.
 - Young AR, Jonski G, Rolla G. The oral anti-volatile sulphur compound effects of zinc salts and their stability constants. *Eur J Oral Sci* 2002; 110: 31-4.
 - Zeelie JJ, McCarthy TJ. Effect of copper and zinc ions on the germicidal properties of two popular pharmaceutical antiseptic agents cetylpyridinium chloride and povidone-iodine. *Analyst* 1998; 123: 503-7.
 - Zero DT. Sugars: the arch criminal? *Caries Res* 2004; 38: 277-85.

ANEXOS

ANEXO 1. ENCUESTA CLINICA

Número.

Ficha clínica:

Datos personales:

Nombres y Apellidos: _____

Edad: _____ Sexo _____ Ocupación _____

Teléfono: _____

Fecha: _____

Antecedentes personales:

1.- Padece actualmente o ha padecido alguna enfermedad sistémica:

Si No

Especificar _____

2.- Toma algún tipo de medicamento desde hace 10 días: Si No

Cual(es): _____

Dosis: _____ Vía de administración: _____

3.- Toma usted algún complejo vitamínico? Si No

Especifique _____ Cantidad _____ Frecuencia _____

4.- ¿Fuma? Si No Cig. por día _____ Desde cuando _____

5.- ¿Consume bebidas alcohólicas? Si No

¿Qué bebidas? _____ Frecuencia _____

6.- Si es usted mujer; ¿Está embarazada? Si No

¿Esta menstruando actualmente? Si No

¿Toma anticonceptivos? Si No

Información odontológica:

1.- ¿Cuántas veces al día se cepilla los dientes? _____

2.- ¿Con qué pasta dental lo hace? _____

3.- ¿Utiliza algún colutorio? Si No ¿Cual? _____

Frecuencia _____

Acetato de Zn	<input type="checkbox"/>	Concentración	0,1%	<input type="checkbox"/>
Sulfato de Zn	<input type="checkbox"/>		0,5%	<input type="checkbox"/>
			1%	<input type="checkbox"/>

Información de estudio:

- 1.- Siente algún sabor con el enjuague utilizado? _____
- 2.- Siente algún cambio inmediato en su boca tras el enjuague? _____
- 3.- Siente algún cambio después de un tiempo en su boca tras el enjuague? _____
- 4.- Cuanto tiempo persiste la sensación en boca? _____

Concentraciones de Zinc (mg/L):

CODIF.	TIEMPO.	CONCENTRACIÓN
7-1	0 min. (Basal)	
ENJUAGUE COLUTORIO		
7-2	30 min.	
7-3	60 min.	
7-4	90 min.	
7-5	120 min.	
7-6	24 horas.	

Recuento bacteriano (UFC/mL):

CODIF.		2°. Disoluc.	3°. Disoluc.
7-1	Basal		
ENJUAGUE COLUTORIO			
7-5	2 horas		

ANEXO 2**Características de las sales de zinc usadas para preparar colutorios**

Parámetro	Sulfato de zinc ZnSO₄ 7H₂O	Acetato de zinc Zn(CH₃COO)₂ 2H₂O
Riqueza	106,2 %	99,3 %
Arsénico	0,001390 %	< 0,0003 %
Plomo	0,001900 %	< 0,002 %
Aspecto	Sólido cristalino	Cristal blanco de ligero olor acético
Color	Incoloro	Incoloro
Acidez/Basicidad	< 0,9 %	pH 6,4
Peso molecular	287,54 g/mol	219,50 g/mol

ANEXO 3

Muestra clasificada en grupos de aplicación del enjuague

Código	Grupo	Subgrupo	Edad	Sexo	N			
1			50	M				
2			45	M				
7			32	M				
8	S U L F A T O	0,1 %	51	M	7			
9			35	M				
1-A			21	M				
2-A			23	M				
3			39	M				
4			35	H				
11			40	M				
12	D E	0,5%	27	H	6			
3-A			22	M				
4-A			22	H				
5			41	M				
6			32	H				
13	Z I N C	1 %	34	H	7			
14			46	M				
15			24	M				
5-A			21	M				
6-A			22	H				
16			A C E T A	0,1 %		21	M	6
17						31	H	
18	21	M						
31	39	H						
32	35	M						
33	35	M						
19	T O D E	0,5 %	20	M	6			
20			22	M				
21			22	M				
25			42	H				
27			31	H				
29			27	M				
22			Z I N C	1 %		22	H	6
23	20	M						
24	22	M						
26	45	M						
28	24	M						
30	31	H						
23	P L A C E B O		23	M	6			
35			35	H				
22			22	M				
27			27	H				
21			21	M				
42			42	H				

ANEXO 4

Los niveles de zinc encontrados en cada uno de los sujetos que se enjuagaron con sulfato de zinc al 0,1% en diferentes intervalos de tiempo

Concentración de zinc en saliva (mg/L)						
n	Zn Basal	Zn 30 min.	Zn 60 min.	Zn 90 min.	Zn 120 min.	Zn 24 horas
1	0,054	5,320	2,790	1,550	1,510	0,080
2	0,041	2,980	1,610	2,420	1,720	0,048
3	0,040	2,600	1,120	0,540	0,510	0,160
4	0,069	2,180	1,650	1,410	1,360	0,070
5	0,046	2,420	2,210	1,920	1,760	0,056
6	0,040	1,010	0,770	0,380	0,350	0,048
7	0,036	1,940	1,490	1,040	0,560	0,052

ANEXO 5

Los niveles de zinc encontrados en cada uno de los sujetos que se enjuagaron con sulfato de zinc al 0,5% en diferentes intervalos de tiempo

Concentración de zinc en saliva (mg/L)						
n	Zn Basal	Zn 30 min.	Zn 60 min.	Zn 90 min.	Zn 120 min.	Zn 24 horas
1	0,051	4,250	3,570	2,200	2,000	0,063
2	0,038	2,610	1,200	0,620	0,360	0,092
3	0,085	4,430	3,620	3,520	2,400	0,144
4	0,040	1,060	0,860	0,710	0,360	0,058
5	0,046	2,960	2,190	1,190	0,860	0,062
6	0,089	1,650	0,960	0,890	0,580	0,147

ANEXO 6

Los niveles de zinc encontrados en cada uno de los sujetos que se enjuagaron con sulfato de zinc al 1% en diferentes intervalos de tiempo

Concentración de zinc en saliva (mg/L)						
n	Zn Basal	Zn 30 min.	Zn 60 min.	Zn 90 min.	Zn 120 min.	Zn 24 horas
1	0,022	1,060	2,290	0,780	0,710	0,088
2	0,050	2,050	2,250	1,420	1,140	0,063
3	0,044	1,290	1,060	0,860	0,530	0,062
4	0,062	3,270	2,350	1,440	0,960	0,068
5	0,039	2,280	1,630	1,850	1,750	0,051
6	0,033	2,080	2,850	0,940	0,840	0,056
7	0,072	4,180	1,150	1,440	1,340	0,003

ANEXO 7

Los niveles de zinc encontrados en cada uno de los sujetos que se enjuagaron con acetato de zinc al 0,1% en diferentes intervalos de tiempo

Concentración de zinc en saliva (mg/L)						
n	Zn Basal	Zn 30 min.	Zn 60 min.	Zn 90 min.	Zn 120 min.	Zn 24 horas
1	0,047	4,020	1,590	1,250	1,170	0,085
2	0,098	7,160	1,890	2,640	2,580	0,144
3	0,047	0,520	1,310	1,070	0,750	0,057
4	0,042	1,840	2,380	0,430	0,320	0,035
5	0,063	2,080	1,470	1,190	0,860	0,087
6	0,062	1,920	2,320	0,800	0,560	0,050

ANEXO 8

Los niveles de zinc encontrados en cada uno de los sujetos que se enjuagaron con acetato de zinc al 0,5% en diferentes intervalos de tiempo

Concentración de zinc en saliva (mg/L)						
n	Zn Basal	Zn 30 min.	Zn 60 min.	Zn 90 min.	Zn 120 min.	Zn 24 horas
1	0,059	6,560	3,010	2,180	1,720	0,062
2	0,041	3,700	1,770	1,340	1,320	0,057
3	0,043	3,680	2,890	1,050	0,970	0,066
4	0,081	4,250	5,650	2,150	1,820	0,119
5	0,081	3,370	1,440	1,700	1,040	0,146
6	0,070	3,220	1,720	2,180	1,190	0,102

ANEXO 9

Los niveles de zinc encontrados en cada uno de los sujetos que se enjuagaron con acetato de zinc al 1% en diferentes intervalos de tiempo

Concentración de zinc en saliva (mg/L)						
n	Zn Basal	Zn 30 min.	Zn 60 min.	Zn 90 min.	Zn 120 min.	Zn 24 horas
1	0,072	3,040	5,650	3,370	2,280	0,142
2	0,051	2,030	1,440	1,190	1,090	0,042
3	0,048	2,180	1,720	1,720	1,410	0,075
4	0,058	6,270	3,750	3,190	2,910	0,091
5	0,044	7,140	3,970	3,090	1,570	0,055
6	0,069	1,620	1,110	0,810	0,430	0,071

ANEXO 10

Los niveles de zinc encontrados en cada uno de los sujetos control que se enjuagaron con enjuague placebo de agua destilada en diferentes intervalos de tiempo

Concentración de zinc en saliva (mg/L)						
n	Zn Basal	Zn 30 min.	Zn 60 min.	Zn 90 min.	Zn 120 min.	Zn 24 horas
1	0,049	0,050	0,046	0,053	0,046	0,053
2	0,083	0,090	0,085	0,086	0,088	0,092
3	0,079	0,080	0,075	0,081	0,078	0,088
4	0,038	0,040	0,042	0,036	0,044	0,046
5	0,045	0,048	0,050	0,046	0,051	0,052
6	0,087	0,090	0,110	0,092	0,086	0,090

ANEXO 11

Número de colonias antes y después de 120 min de haber realizado el enjuague.

GRUPO	Voluntario	UFC/ml basal	UFC/ml a 120 min	Diferencia	% de reducción
ZnSO ₄ 0,1 %	1	-	-	-	
	2	-	-	-	
	7	2000	250	1750	87,50%
	8	35	10	25	71,42%
	9	1000	35	965	96,50%
	1-1	-	-	-	
	2-1	-	-	-	
ZnSO ₄ 0,5 %	3	-	-	-	
	4	-	-	-	
	11	3000	300	2700	90,00%
	12	0	0	-	
	3-1	-	-	-	
	4-2	-	-	-	
ZnSO ₄ 1 %	5	-	-	-	
	6	-	-	-	
	13	200	38	162	81,00%
	14	30	1	29	96,67%
	15	0	0	-	
	5-1	-	-	-	
	5-2	-	-	-	
Zn(CH ₃ COO) ₂ 0,1%	16	1000	184	816	81,60%
	17	205	54	151	73,66%
	18	201	140	61	30,35%
	31	400	350	50	12,5%
	32	150	130	20	13,13%
	33	375	100	275	73,33%
	Zn(CH ₃ COO) ₂ 0,5%	19	0	0	-
20		130	10	120	92,31%
21		0	0	-	
25		280	26	254	90,71%
27		30	15	15	50,00%
29		16	0	16	100%
Zn(CH ₃ COO) ₂ 1%	22	65	0	65	100%
	23	0	0	-	
	24	1	0	1	100%
	26	6	0	6	100%
	28	30	21	9	30,00%
	30	100	13	87	87,00%
Controles	23	56	91	+35	Aumento
	35	26	6	+20	Aumento
	22	6	5	+1	Aumento
	27	27	105	+78	Aumento
	21	55	150	+95	Aumento
	42	300	85	215	71,67%

ANEXO 12

Valores de pH encontrados en cada uno de los sujetos que se enjuagaron con sulfato de zinc al 0,1% en diferentes intervalos de tiempo

Valores de pH en saliva						
n	pH Basal	pH 30 min.	pH 60 min.	pH 90 min.	pH 120 min.	pH 24 horas
1	6,96	6,81	6,44	6,90	7,04	7,26
2	6,44	6,26	6,38	6,60	6,90	6,95
3	6,56	7,50	7,50	7,55	7,47	7,53
4	6,77	6,61	6,44	7,05	6,93	5,83
5	6,81	6,89	6,71	6,57	6,66	6,85
6	6,90	6,81	6,63	6,79	6,95	7,06
7	7,30	7,37	7,38	7,35	7,32	7,33

ANEXO 13

Valores de pH encontrados en cada uno de los sujetos que se enjuagaron con sulfato de zinc al 0,5% en diferentes intervalos de tiempo

Valores de pH en saliva						
n	pH Basal	pH 30 min.	pH 60 min.	pH 90 min.	pH 120 min.	pH 24 horas
1	7,23	7,01	6,90	7,06	7,20	7,13
2	7,33	7,27	7,20	7,42	7,23	7,30
3	6,50	6,67	6,51	6,33	6,33	5,76
4	7,52	7,22	7,04	7,24	7,23	7,06
5	7,66	7,13	7,23	7,12	7,06	6,95
6	7,63	7,82	7,70	7,45	7,37	7,20

ANEXO 14

Valores de pH encontrados en cada uno de los sujetos que se enjuagaron con sulfato de zinc al 1% en diferentes intervalos de tiempo

Valores de pH en saliva						
n	pH Basal	pH 30 min.	pH 60 min.	pH 90 min.	pH 120 min.	pH 24 horas
1	7,28	7,10	7,05	6,92	7,15	7,26
2	6,76	6,98	6,80	6,73	6,90	6,95
3	7,14	6,97	6,95	7,00	7,20	6,89
4	7,43	7,51	7,28	7,24	7,40	7,53
5	6,48	6,66	6,71	6,63	6,89	6,43
6	7,70	7,47	7,36	7,49	7,55	7,39
7	7,47	7,24	7,12	7,13	7,11	7,05

ANEXO 15

Valores de pH encontrados en cada uno de los sujetos que se enjuagaron con acetato de zinc al 0,1% en diferentes intervalos de tiempo

Valores de pH en saliva						
n	pH Basal	pH 30 min.	pH 60 min.	pH 90 min.	pH 120 min.	pH 24 horas
1	7,44	7,76	7,55	7,38	7,05	7,20
2	7,48	7,51	7,20	7,14	7,33	7,36
3	7,17	6,96	7,09	7,20	7,04	7,11
4	7,69	7,24	7,17	7,18	7,16	7,42
5	7,51	7,04	7,23	6,74	7,31	7,44
6	6,97	7,02	7,52	7,30	7,12	6,94

ANEXO 16

Valores de pH encontrados en cada uno de los sujetos que se enjuagaron con acetato de zinc al 0,5% en diferentes intervalos de tiempo

Valores de pH en saliva						
n	pH Basal	pH 30 min.	pH 60 min.	pH 90 min.	pH 120 min.	pH 24 horas
1	7,11	7,05	7,06	6,93	6,97	6,99
2	7,15	6,99	6,98	6,88	7,12	7,31
3	7,58	7,50	7,43	7,48	7,31	7,52
4	6,94	6,45	6,61	6,60	6,55	6,76
5	7,02	6,74	6,69	6,73	6,66	6,83
6	7,44	7,21	7,25	7,26	7,26	7,30

ANEXO 17

Valores de pH encontrados en cada uno de los sujetos que se enjuagaron con acetato de zinc al 1% en diferentes intervalos de tiempo

Valores de pH en saliva						
n	pH Basal	pH 30 min.	pH 60 min.	pH 90 min.	pH 120 min.	pH 24 horas
1	6,65	6,45	6,37	6,27	6,31	6,78
2	7,02	6,84	7,04	7,15	7,06	7,16
3	6,93	6,94	6,67	6,75	6,75	6,6,3
4	6,51	6,31	6,17	6,06	6,06	6,27
5	6,90	7,00	6,89	7,00	6,91	7,30
6	7,45	7,50	7,46	7,21	7,32	7,26

ANEXO 18

Valores de pH encontrados en cada uno de los sujetos control que se enjuagaron con enjuague placebo de agua destilada en diferentes intervalos de tiempo

Valores de pH en saliva						
n	pH Basal	pH 30 min.	pH 60 min.	pH 90 min.	pH 120 min.	pH 24 horas
1	7,20	6,98	7,00	7,15	7,08	7,10
2	6,95	7,00	7,50	7,28	7,10	6,96
3	7,38	7,53	7,25	7,10	7,23	7,30
4	7,12	6,90	7,02	7,10	7,08	7,12
5	6,90	6,50	6,60	6,63	6,45	6,80
6	6,64	6,40	6,35	6,30	6,26	6,80