

Artículo de Revisión

ÁCIDO HIPOCLOROSO (HOCl)

“Una nueva alternativa en antisepsia y desinfección desarrollada en Colombia”

Calderón J. L.*

INTRODUCCIÓN

Las infecciones bacterianas causadas por microorganismos resistentes a los antibióticos y desinfectantes comúnmente utilizados, se consideran como uno de los problemas más importantes de los servicios de salud en el siglo 21. Debido a que por su severidad son infecciones difíciles de diagnosticar, las cuales requieren de tratamientos más largos, con alto grado de complejidad, significativamente más costosos para los servicios de salud y en muchos casos nocivos para el paciente (1). Por ello la organización mundial de la salud (OMS) invita a la industria farmacéutica, instituciones académicas y sociedades científicas, a incrementar los esfuerzos en la creación de nuevas moléculas, programas de prevención y protocolos de desinfección adecuados, que ayuden en el control y tratamiento de este problema mundial; alternativas tanto eficaces como seguras dirigidas a prevenir y controlar a los microorganismos causantes de este tipo de infecciones (2, 3). Colombia no se ha quedado atrás en este proceso y ha alcanzado el desarrollo de nuevos compuestos eficaces y seguros para el control de infecciones a partir de la química del cloro y la ulterior producción de ácido hipocloroso (HOCl).

Cloro, el antimicrobiano universal

El cloro es el undécimo elemento químico más común de la tierra, está presente en más del 0.0045% de

la superficie terrestre y permite la formación de más de 2.400 compuestos (como resultado de su reacción con otros elementos existentes en el medio ambiente, muchos de estos con actividad microbicida), los cuales son utilizados ampliamente en procesos de antisepsia y desinfección. (4)

La vida misma utiliza al cloro en su favor. Es el principal anión del líquido extracelular implicado en la homeostasis corporal, manteniendo la presión osmótica y el equilibrio ácido-base. En el sistema gastrointestinal contribuye con la digestión de alimentos en forma de ácido clorhídrico. La piel y el esmalte dental tienen altas concentraciones de cloro, utilizado como barrera en contra de la invasión microbiana. Por su lado, el sistema inmunológico utiliza cloro en las reacciones celulares del sistema mononuclear fagocítico en forma de ácido Hipocloroso (HOCl), durante el control de infecciones y fagocitosis de antígenos. (5, 6). Comercialmente existe un amplio número de soluciones cloradas, agentes químicos utilizados en la desinfección de superficies, con reconocidas propiedades bactericidas y/o bacteriostáticas, se incluyen: hipoclorito sodio y de calcio, dióxido de cloro, dicloroisocianurato de sodio, cloro líquido, cloraminas orgánicas e inorgánicas (7). Por su amplio espectro, rápida acción y fácil acceso, el hipoclorito de sodio (NaOCl) es una de las moléculas cloradas de mayor uso en la desinfección de los servicios de salud. El centro de control de enfermedades (CDC) de Atlanta, recomienda el uso de NaOCl en concentraciones que van desde 500ppm hasta 5000ppm en los procesos de sanitización de áreas hospitalarias (8). Es un fuerte oxidante, de pH alcalino y tiene mejor actividad como solución. Al ser diluido en agua el hipoclorito de sodio (NaOCl) debe

* Justo Leonardo Calderón. Bacteriólogo, cMSc. División de investigaciones AQUILABS S.A.
E-mail: justo05@gmail.com; Investigaciones@aquilabs.com

formar ácido hipocloroso (quien es el ingrediente activo de todas las soluciones cloradas) para ejercer su acción microbicida de amplio espectro. Desafortunadamente durante la dilución del NaOCl, tan solo el 10% de la solución total se transforma en HOCl y el 90% de la solución se transforma en componentes cáusticos y alcalinos responsables de la corrosión de equipos, materiales y en múltiples casos lesiones de tejidos y vías respiratorias (9). Debido a que el HOCl es el ingrediente activo de los clorados sin sus efectos adversos, se ha hecho imperativo investigar, extraer y estabilizar esta molécula para definir sus usos potenciales.

El ácido hipocloroso (HOCl)

El ácido hipocloroso (HOCl), hace parte de un nuevo grupo de sustancia microbicidas conocidas como “moléculas antimicrobianas no antibióticas” que por su amplio espectro, rápida acción, amplio margen de seguridad, concentración y forma de estabilización, puede ser utilizado en procesos de desinfección y/o para controlar y prevenir un amplio número de infecciones en piel y mucosas.

Biológicamente, se clasifica dentro de un grupo de pequeñas moléculas conocidas como especies reactivas del oxígeno (ROS) sintetizadas por células del sistema inmune (Neutrófilos y Macrófagos) durante un proceso inmunológico conocido como “estallido respiratorio”, durante la fagocitosis de antígenos en reacción con la enzima mieloperoxidasa, peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y un ión de cloro. Funciona como una sustancia quimio-táctica que permite un excelente control microbiano y activación del sistema de defensa que facilita la rápida e inocua reparación de tejidos (10). Figura 1.

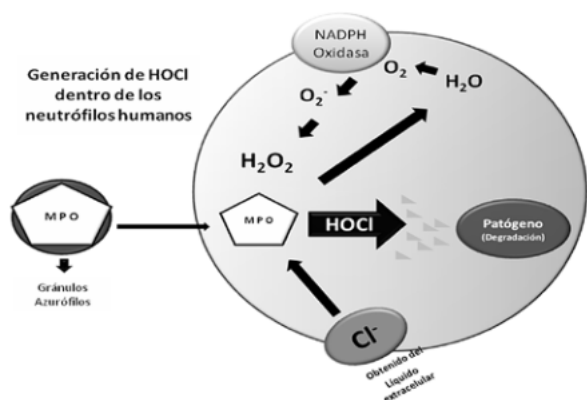


Figura 1. Representación esquemática de la producción de HOCl a nivel intracelular durante el estallido respiratorio. Brevemente, la célula utiliza el oxígeno molecular (O_2) para producir peróxido de hidrógeno (H_2O_2) utilizando la enzima NADPH oxidasa. Posterior a ello la enzima mieloperoxidasa (MPO) depositada en los gránulos azurófilos cataliza la reacción H_2O_2 y cloro (Cl) para formar ácido hipocloroso (HOCl). La reacción toma lugar en el lumen del fagolisosoma el cual se va acidificando a medida que el proceso avanza, estabilizando y optimizando la actividad antimicrobiana molécula de HOCl. (El-benna et al., 2005).

Químicamente, el HOCl es un ión no dissociado del cloro dependiente del oxígeno, altamente inestable y altamente reactivo. Por ser uno de los ácidos hipohalogenados más fuertes, es también uno de los más poderosos oxidantes entre los oxácidos clorados y es el responsable directo de la acción bactericida de los compuestos derivados del cloro (11).

Obtención

In vitro el HOCl se puede obtener a través de tres diferentes métodos:

1. **Hidrólisis de gas de cloro:** ($Cl_2 + H_2O \rightarrow HOCl + H^+ + Cl^-$).
2. **Electrolisis de solución de sal:** ($2Cl^- + 2e^- \rightarrow Cl_2$) y ($Cl_2 + H_2O \rightarrow HOCl + H^+ + Cl^-$).
3. **Acidificación de hipoclorito:** ($OCl^- + H^+ \rightarrow HOCl$).

Los métodos de obtención y posibles aplicaciones del HOCl han sido investigados desde 1915. Infortunadamente, la mayoría de los procedimientos han generado soluciones inestables, y por consiguiente de moderada actividad microbicida. Situación que desestimuló la investigación en la molécula. (12).

En Colombia en el año de 1992, Calderón et al., diseñan un método para la obtención de HOCl estable. Esto permite el inicio de los procesos investigativos dirigidos a la optimización y refinamiento del compuesto, hasta lograr la síntesis de una solución antimicrobiana a base de HOCl con una estabilidad superior a 18 meses, en un amplio rango de concentraciones (que van desde 50ppm a 7000ppm) y pH (3.8 - 6.2), convirtiéndose en la primera formulación a nivel mundial a base de HOCl con potenciales aplicaciones profilácticas y terapéuticas. Además, con alto potencial en aplicaciones no médicas en procesos de desinfección de áreas, tratamientos de aguas e inactivación de desechos orgánicos. (13).

Eficacia Antimicrobiana del HOCl

Posterior a la obtención y estabilización del producto y basados en diversas técnicas *in Vitro* diseñadas para identificar el mecanismo de acción celular del HOCl, donde a partir de cultivos celulares y análisis cuantitativos se ha logrado demostrar que al activar 10^6 neutrófilos se producen aproximadamente 2×10^{-7} mol de HOCl durante una incubación de dos horas, cantidad capaz de destruir 150 millones de *E. coli*. (10). Se inició la investigación en laboratorios para identificar la eficacia microbicida de la solución.

Henao et al., en 2002, evalúan la actividad bactericida del HOCl sobre cinco cepas bacterianas causantes de infección intrahospitalaria (*Staphylococcus aureus*,

Pseudomona aeruginosa, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*), utilizando la técnica de Kelsey Maurer en condiciones controladas de temperatura, concentración del HOCl y tiempo de acción, además de modificaciones con adición de albúmina al 5% como interferente biológico. Se determinó que el HOCl es efectivo al 99.9% a concentraciones iguales o mayores a 900 ppm, luego de 5 minutos de acción para todas las cepas estudiadas, a diferentes rangos térmicos, con y sin la adición de interferentes, mostrando la gran efectividad del HOCl. (14).

Wang et al., en 2007 demuestran que el HOCl tiene un efecto antimicrobiano de amplio espectro en concentraciones que van desde 0.1 a 2.8 ug/ml en un periodo de exposición de 2 minutos. Abarcando microorganismos clínicamente relevantes como lo son bacterias Gram negativas, Gram positivas, parásitos y hongos. Entre los que se incluyen *Staphylococcus aureus*, *S. aureus metilino resistente* y *Enterococcus faecium vancomicino resistente*. (15).

Los procesos de obtención y optimización de la molécula continuaron y en el año 2009 Lafaurie et al., evaluaron la eficacia *In Vitro* del HOCl contra microorganismos potencialmente patógenos de cavidad oral. El ácido hipocloroso logró inhibición bacteriana del 99.9% a una concentración de 0.05% (500ppm) y Ph de 5.2 al minuto de acción para *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mutans*, *Eikenella corrodens*, *Campylobacter rectus*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Enterococcus faecalis*, *Porphyromonas gingivalis* y para microorganismos sobre infectantes como *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomona aeruginosa* y *Pseudomona aeruginosa multiresistente*. Además se hizo la inclusión de *Candida albicans* como representante del reino fungi. Los resultados indican que el ácido hipocloroso tiene un importante efecto antimicrobiano, inhibiendo el 99.9% de los microorganismos en estudio a una concentración de 0.05% y un Ph de 5.2 al minuto de acción. Frente a *Candida albicans* a la concentración de 0.05% hubo inhibición del 99.9% de la carga microbiana pasados los 5 minutos. Pero a concentraciones superiores o iguales al 0.1% y pH 4.2 encontramos inhibición del 99.9% para todos los microorganismos en estudio (bacterias y hongos), al minuto de acción. Concluyendo que la sustancia tiene un amplio espectro antibacteriano y que tentativamente frente a hongos debe tenerse en cuenta la relación concentración Vs tiempo de acción (16).

Mecanismo de acción: Oxidación y/o clorinación

La membrana externa de las bacterias Gram negativas contienen grupos sulfuro y hemo (ricos en hierro) que son esenciales para llevar a cabo el normal transporte de electrones. El HOCl induce una reacción enzimática irreversible con las proteínas de membrana, produciendo daños estructurales que alteran la permeabi-

lidad celular y afectan la viabilidad bacteriana (17,18). En bacterias Gram positivas, el HOCl actúa sobre los grupos aminos de la glicina presente en el peptidoglicano (19). Por otro lado, el HOCl oxida y/o clorina residuos de cisteína en gingipainas (como Rgp y Kgp), endotoxinas y exotoxinas neutralizando su acción, al igual que puede oxidar nucleótidos nivel intracelular en bacterias bloqueando la síntesis del ADN. A bajas dosis en un tiempo inferior a 5 minutos de exposición, puede inactivar enzimas y sistemas de transporte de electrones, destruye la membrana celular, causa una alteración en la permeabilidad de la membrana e induce la fragmentación de proteínas, inhiben la secreción de factores de virulencia y favorece la lisis bacteriana con la ayuda de los mecanismos de defensa del hospedador (20). La eficacia microbicida evaluada *in vitro* y los mecanismos de acción postulados, soportan el amplio espectro antimicrobiano y rápida acción del HOCl, incluso contra microorganismos multiresistentes.

Ácido hipocloroso, ¿eficaz y seguro?

Posterior al desarrollo de los estudios *In Vitro* para demostrar el amplio espectro antimicrobiano del HOCl, la molécula fue sometida a diversas pruebas en animales de laboratorio (ratas wistar y conejos nueva Zelanda) con el fin de evidenciar su seguridad y escasa toxicidad. Basados en las guías para la evaluación de la toxicidad aguda de una solución de la Environmental protection agency (EPA), se diseñó un estudio para hallar la DL₅₀ (dosis simple de un sustancia que se espera pueda causar muerte en el 50% de los animales tratados), evaluando toxicidad oral aguda, dérmica aguda, ocular, inhalatoria, intravenosa e intraperitoneal. Brevemente, se utilizaron 10 ratas jóvenes adultas por cada una de las 3 concentraciones a evaluar (5000, 2500 y 1250 mg/kg de peso). El producto se dosificó según protocolo y se observaron los animales durante 5 horas por 14 días (2 veces/día) con el objeto de determinar signos de toxicidad o muerte. Durante el tiempo de la prueba no se presentó mortalidad, ni signos de lesiones en los análisis macro y microscópicos de los órganos en los animales en estudio a ninguna de las concentraciones evaluadas. Como conclusión se establece como DL₅₀ a las concentraciones mayores a 5000mg/kg de peso (DL₅₀ > 5000mg/kg) [21].

Una nueva alternativa en antisepsia y desinfección

Biológica y químicamente el amplio espectro, rápida acción y amplio margen de seguridad del HOCl ha sido demostrado durante más de 15 años de investigaciones en nuestro país. Este proceso investigativo soporta que el HOCl de acuerdo a su concentración, puede ser utilizado en procesos de desinfección. Además de ello, La utilidad del ácido hipocloroso ha sido evaluada en el tratamiento de diferentes patologías de piel, mucosas y tejidos blandos. Selkon et al., en 2006 evaluaron clínica-

mente una versión de HOCl en el tratamiento de úlceras crónicas de miembros inferiores. El estudio reveló que los lavados del área afectada con HOCl permiten un apreciable incremento en el tejido de granulación y disminución del dolor (22). Por su lado Naranjo et al., en 2006, tratando la misma patología, pudieron concluir que la aplicación de HOCl al 0.05% y pH 5.2, tres veces al día sobre el área afectada, acompañada de vendaje oclusivo, facilita y acelera el proceso de regeneración de tejidos asociado al control microbiano local. La terapia por generar limpieza y un microambiente húmedo es ideal para el estímulo al tejido de granulación (23).

Otros estudios realizados por Gaitán et al., en 2006 y Jaramillo et al., en 2008 (Bogotá y Medellín respectivamente) buscaron determinar la disminución del riesgo de infección en heridas quirúrgicas comparando el uso de HOCl a concentración de 0.05% y pH 5.2 Vs. solución salina, como solución de lavado quirúrgico. Los resultados de cada trabajo mostraron que el uso del HOCl en una herida quirúrgica considerada como contaminada tiene un efecto profiláctico y terapéutico. Controlando la infección local asociada y la posible formación de abscesos en cavidades abdominal y torácica durante apendicectomías y cirugías cardiovasculares respectivamente. Además que el HOCl es un compuesto estable, que produce escasas reacciones locales. En vista de estos resultados se propuso el uso del ácido hipocloroso en pacientes sometidos a apendicectomías, revascularización miocárdica y por extensión a los pacientes sometidos a cirugía cardíaca y vascular con el fin de disminuir la incidencia de ISO. (24, 25).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Los procesos de investigación desarrollados en Colombia durante más de 15 años en la química del cloro, han permitido la estabilización y optimización de la molécula de ácido hipocloroso (HOCl). Un compuesto de amplio espectro antimicrobiano y alto perfil de seguridad. Debido a su eficacia a concentraciones iguales o superiores de 0.1% y pH 4.2, se postula como una importante herramienta en la desinfección de alto nivel en el medio hospitalario. Además su baja concentración de sólidos probablemente minimice los daños por corrosión ocasionados a los materiales utilizados en la práctica médica y de laboratorio clínico; alteraciones que normalmente genera el hipoclorito de sodio. Por otro lado, las concentraciones entre 0.046%, 0.05% y pH 5.2, se postulan como importantes candidatos en el control de infecciones en piel, mucosas y tejidos blandos, al igual que una importante herramienta profiláctica para la prevención de infecciones de sitio operatorio en apendicectomías y cirugías cardiovasculares. Podemos entonces hablar de una nueva alternativa en antisepsia y desinfección, soportada en desarrollos e investigaciones que buscan atravesar las fronteras, proyectando ciencia, tecnología e innovación de Colombia para el mundo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Alfonso J. Alanis. Resistance to Antibiotics: Are We in the Post-Antibiotic Era? Archives of Medical Research. 36 (2005) 697-705.
2. World health organization (WHO), Health topics. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/>. Revisado octubre 2008.
3. World health organization (WHO). Programa "clean care is a Safer care. Disponible en: http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241597906_eng.pdf. Revisado diciembre 2009.
4. Informe de desarrollo sostenible de la industria europea cloro-alcali. Disponible en: <http://www.eurochlor.org/upload/documents/document179.pdf>. Revisado julio 2008.
5. Michael M. Cox, David L. Nelson. Lehninger, principles of biochemistry. Fourth edition. 2001.
6. Weiss S.J., Klein R., Slavika A. Chlorination of Taurine by Human Neutrophils. Evidence for hypochlorous acid generation. Journal of Clinical Investigation. The American Society for Clinical Investigation. 0021-9738/82/09/0598/10. 1982.
7. Rutala W., Cole E., Thomann C. Weber DJ. Stability and bactericidal activity of chlorine solutions. Infection control and hospital epidemiology. Vol. 19 - No 5. 1998.
8. Joan Holtschlag, Ann M. Cozad, Rhonda D. Jones. Sodium hypochlorite. Preferred for Controlling the Spread of C. difficile. Operating Room & Infection Control. 2005.
9. Rutala W., Weber D.J. Uses of Inorganic Hypochlorite (Bleach) in Health-Care Facilities. Clinical Microbiology Reviews, Oct. 1997, pp. 597-610.
10. Weiss Stephen, New England Journal Of Medicine, Tissue Activity of Neutrophils. 1989.
11. Wang L., Bassiri M., Najafi R., Najafi K., Yang J., Khosrovi B., Hwong W., Barati E., Belisle B., Celeri C., Robson M.C. Hypochlorous acid as a potential wound care agent: part I. Stabilized hypochlorous acid: a component of the inorganic armamentarium of innate immunity. J Burns Wounds.11: 65-79, 2007.
12. Combiz Rezayat, Warren D. Widmann, Mark A. Hardy. Henry Drysdale Dakin: More Than His solution Solution. Current Surgery. 2006.
13. Organización Mundial de Propiedad Intelectual (OMPI). Disponible en: <http://www.wipo.int/portal/index.html.es>. revisado junio 2007.
14. Henao Rivero Sandra, Sierra Claudia, Gaitán Juan. Actividad Bactericida del Ácido Hipocloroso Sobre 5 Cepas Causantes de Infección Nosocomial. Revista facultad de

medicina, universidad nacional de Colombia. Bogotá. 2002.

15. Robson M.C., Payne W.G., Ko F., Mentis M., Donati G., Shafii S.M., Culverhouse S., Wang L., Khosrovi B., Najafi R., Cooper D.M., Bassiri M. Hypochlorous Acid as a Potential Wound Care Agent. Part II. Stabilized Hypochlorous Acid: Its Role in Decreasing Tissue Bacterial Bioburden and Overcoming the Inhibition of Infection on Wound Healing. *J Burns Wounds*. 11:6,e6, 80-90.2007.
16. Lafaurie G.I., Aya MR., Arboleda S., Escalante A., Castillo D.M., Millán L.V., Calderón J.L., Ruiz B.N. Eficacia desinfectante del ácido hipocloroso sobre cepas con poder patogénico de cavidad oral. *Revista Colombiana de Investigación en Odontología*. 1:3-11, 2009.
17. Rosen H., Klebanoff S. Oxidation of Escherichia coli Iron Centers By the myeloperoxidase-mediated microbicidal system. *J Biol Chem*. 257: 13731-35, 1982.
18. Hirche T.O., Gaut J.P., Jay J.P., Heinecke J.W., Belaaouaj A. Myeloperoxidase plays critical roles in killing Klebsiella pneumoniae and inactivating neutrophil elastase: Effects on host defense. *J Immunol*. 175: 1557-1565, 2005.
19. Marcinkiewicz J., Czajkowska B., Grabowska A., Kaspro-wicz A., Kociszewska B. Differential effects of chlorination of bacteria on their capacity to generate NO, TNF-alfa and IL-6 in macrophages. *Immunology*. 83: 611-6, 1994
20. Rothfork J.M., Timmins G.S., Harris M.N., Chen X, Lusi AJ, Otto M, Cheung AL, Gresham HD. Inactivation of a bacterial virulence pheromone by phagocyte-derived oxidants: New role for the NADPH oxidase in host defense. *Proc Natl Acad Sci USA*. 101; 13867-72, 2004.
21. Dussan Castro Uriel, Saavedra Cruz Orlando, Laboratóri-os Immunopharmos Ltda. Kit de toxicidades agudas del ácido Hipocloroso en animales de laboratorio. Bogotá. 2004. Datos no publicados.
22. 'Selkon J.B., Cherry G.W., Wilson J.M., Hughes M.A. Evaluation of hypochlorous acid washes in the treatment of chronic venous leg ulcers. *J Wound Care*. 15:33-7, 2006.
23. Naranjo Julio, Acevedo César, Calderón Justo. Uso del Acido Hipocloroso en ulceras de miembros inferiores. *Informador medico*, Vol. 94, pgs. 8-11. Bogotá, 2006.
24. Gaitán Juan, Naranjo Julio, Saavedra Miguel Ángel, Calderón Justo Leonardo, Impacto del Hipocloroso sobre la heridas quirúrgicas de la apendicetomía. *Informador medico*, Vol. 95, pgs. 12-14. Bogotá, 2006.
25. Jaramillo J.C., Franco L. Uso del acido hipocloroso (HOCl) para la profilaxis y tratamiento de la infección de sitio operatorio (iso) en cirugía cardiovascular. Datos no publicados, 2008.
26. Jamel El-Benna, Pham My-Chan Dang, Marie-Anne-Gougerot-Pocidallo. Carole Elbim. Phagocyte NADPH oxidase: a multicomponent enzyme essential for host defenses. *Arch Immunol Ther Exp*, 2005, 53, 199-206.