

**EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA DE UN PROTOTIPO DESINFECTANTE DE CEPILLOS
DENTALES**

Erika Yineth Bustos Ríos

**UNIVERSIDAD EL BOSQUE
PROGRAMA DE ODONTOLOGÍA - FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
BOGOTA DC.- NOVIEMBRE 2018**

HOJA DE IDENTIFICACIÓN

Universidad	El Bosque
Facultad	Odontología
Programa	Odontología
Título:	Evaluación microbiológica de un prototipo desinfectante de cepillos dentales
Grupo de Investigación:	UIBO
Línea de investigación:	Unidad de Investigación Básica Oral (UIBO)
Institución(es) participante(s):	Universidad El Bosque Unidad de Investigación Básica Oral (UIBO) Facultad de Odontología
Tipo de investigación:	Pregrado
Estudiantes/ residentes:	Erika Yineth Bustos Ríos
Director:	Dra. Lina Viviana Millán Ospina
Asesor metodológico:	Dra. Gloria Inés Lafaurie Villamil
Asesor temático:	Dra. Lina Viviana Millán Ospina
Asesor estadístico:	Dra. Gloria Inés Lafaurie Villamil

DIRECTIVOS UNIVERSIDAD EL BOSQUE

HERNANDO MATIZ CAMACHO	Presidente del Claustro
JUAN CARLOS LOPEZ TRUJILLO	Presidente Consejo Directivo
MARIA CLARA RANGEL G.	Rector(a)
RITA CECILIA PLATA DE SILVA	Vicerrector(a) Académico
FRANCISCO FALLA	Vicerrector Administrativo
MIGUEL OTERO CADENA	Vicerrectoría de Investigaciones.
LUIS ARTURO RODRÍGUEZ	Secretario General
JUAN CARLOS SANCHEZ PARIS	División Postgrados
MARIA ROSA BUENAHORA	Decana Facultad de Odontología
MARTHA LILILIANA GOMEZ RANGEL	Secretaria Académica
DIANA ESCOBAR	Directora Área Bioclínica
MARIA CLARA GONZÁLEZ	Director Área comunitaria
FRANCISCO PEREIRA	Coordinador Área Psicosocial
INGRID ISABEL MORA DIAZ	Coordinador de Investigaciones Facultad de Odontología
IVAN ARMANDO SANTACRUZ CHAVES	Coordinador Postgrados Facultad de Odontología

“La Universidad El Bosque, no se hace responsable de los conceptos emitidos por los investigadores en su trabajo, solo velará por el rigor científico, metodológico y ético del mismo en aras de la búsqueda de la verdad y la justicia”.

GUÍA DE CONTENIDO

Resumen	
Abstract	
	Pág.
Introducción	
2. Marco teórico	3
3. Planteamiento del problema	12
4. Justificación	15
5. Situación Actual	16
6. Objetivos	18
6.1 Objetivo general	18
6.2 Objetivos específicos	18
7. Metodología del Proyecto	19
7.1. Tipo de estudio	19
7.2. Población y muestra (Criterios de selección y exclusión)	19
7.3. Métodos y técnicas para la recolección de la información (Materiales y métodos)	19
7.4 Plan de tabulación y análisis.	22
a. Hipótesis estadísticas(alterna y nula)	22
b. Estadística descriptiva	22
8. Consideraciones éticas.	23
9. Resultados	24
9.1. Fase descriptiva	24
10. Discusión	29
11. Conclusiones	32
12. Referencias bibliográficas	33

RESUMEN

EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA DE UN PROTOTIPO DESINFECTANTE DE CEPILLOS DENTALES

Antecedentes: La salud oral es fundamental para el equilibrio en la salud general en un individuo reflejando así su bienestar, el uso del cepillo dental resulta ser una herramienta muy útil en la higiene oral para la remoción de placa bacteriana, sin embargo estos pueden contaminarse con microorganismos presentes en el medio ambiente, manos y cavidad oral.

Objetivo: Evaluar la efectividad antimicrobiana del ácido hipocloroso como principio activo adaptado a un prototipo desinfectante doméstico de cepillos dentales. **Materiales y Métodos:** Se evaluó el ácido hipocloroso en concentraciones de 1.000 ppm y 2.000ppm a pH 7.0 como sustancia principal, clorhexidina al 2% (control positivo) y agua destilada desionizada estéril (control negativo). Cada experimento se realizó por triplicado, los nueve cepillos dentales los cuales fueron inoculados en caldo BHI con *Enterobacter Cloacae* ATCC 13047, incubados a 37°C por 24 horas, luego se colocaron dentro de tres prototipos desinfectantes por 7 horas con cada una de las sustancias evaluadas, se retiraron los cepillos e incubaron en caldo BHI, sembrándolo en agar BHI a 37°C durante 24 horas, y se realizó el conteo de unidades formadoras de colonia junto con el análisis estadístico por medio de la prueba de Kruskal-Wallis y test de U Mann Whitney.

Resultados: No se demostró efectividad del ácido hipocloroso en ninguna de las dos concentraciones evaluadas evidenciando de 1 a 215 UFC de *Enterobacter Cloacae*, mientras que el control positivo (Clorhexidina al 2%), demostró tener una efectividad del 100%. En la dilución -6 y -7 hubo diferencias estadísticamente significativas ($p=0.0373$) y ($p=0.0422$) respectivamente, mientras que en la dilución -8 no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p=0.0973$). **Conclusiones:** El ácido hipocloroso en las concentraciones evaluadas no fue efectivo como sustancia desinfectante mientras que la clorhexidina si evidenció efectividad ante *Enterobacter Cloacae*. Es necesario realizar más estudios relacionados al hallazgo de sustancias que reduzcan la carga bacteriana ya que el ácido hipocloroso no fue eficaz.

Palabras claves: *Enterobacter Cloacae*, ácido hipocloroso, clorhexidina.

ABSTRACT

MICROBIOLOGICAL EVALUATION OF A TOOTHBRUSH DISINFECTANT PROTOTYPE

Background: Oral health is fundamental for an individual's well-being and the toothbrush is a very helpful tool for such hygiene in order to remove bacterial plaque. However, these can get contaminated with microorganisms present in the environment, hands and mouth. **Objective:** to evaluate the anti-microbial efficiency of hypochlorite acid as an active principle adapted to a prototype of domestic disinfectant for toothbrushes. **Materials and methods:** the hypochlorite acid was evaluated with concentrations of 1000 ppm and 2000 ppm with pH 7.0. Chlorhexidine at 2% was the main substance (positive control) and sterile, de-ionised distilled water (negative control). Each experiment was carried out in triplicate: the nine brushes impregnated with *Enterobacter cloacae* ATCC 13047 in BHI infusion, incubated at 37°C for 24 hours, placed inside three prototype disinfectants for seven hours with each of the evaluated substances. After exposure time was up the brushes were removed and incubated in BHI for 24 hours; after this, they were processed in BHI agar at 37°C for 24 hours and the count of colony formation units was carried out. The statistical analysis was done with the Kruskal-Wallis and U Mann Whitney tests. **Results:** The hypochlorite's effectiveness was not demonstrated with any of the two concentrations, presenting 1 UFC to 215 UFC of *Enterobacter cloacae*, and the positive control showed 100% effectiveness. There were statistically significant differences with -6 and -7 dilutions ($p=0.0373$) and ($p=0.0422$) respectively, while -8 dilution did not present any statistically significant differences ($p=0.0973$). **Conclusions:** Hypochlorite acid was not effective as a disinfectant in the evaluated concentrations, while the chlorhexidine did present effectiveness against *Enterobacter cloacae*. Further studies regarding the substances which reduce bacterial count are necessary.

Key words: *Enterobacter cloacae*, hypochlorite acid, chlorhexidine.

1. Introducción

La cavidad oral es una parte del cuerpo humano, en la cual se encuentran presentes miles de especies de bacterias, entre otros microorganismos, por lo cual es necesario mantenerla en buen estado para lograr un equilibrio en la salud general, la cual se puede alterar en presencia de una patología oral. Para mantener la salud oral, existen diferentes mecanismos y elementos que sirven para remover la placa bacteriana presente en diferentes nichos orales, ya sean los dientes, encías, lengua y / o carrillos. Entre los elementos más usados, se encuentra el cepillo dental, el cual se utiliza desde hace siglos. El primer cepillo dental conocido provino de la China y fue hecho en marfil con cerdas de crin de caballo (Voelker *et al.*, 2013), pero fue en 1780, en Inglaterra cuando William Addis fabricó el "primer cepillo de dientes moderno"; este cepillo tenía un mango de hueso y los agujeros para la colocación de cerdas naturales de cerdo en principios de 1900, más tarde se creó el primer cepillo de dientes de nylon fue llamado Miracle Toothbrush por el doctor West. Al pasar el tiempo, estos objetos han mejorado hasta llegar a lo que conocemos como el cepillo de dientes con muchas más comodidades, como lo son aquellos con mangos ergonómicos hasta llegar a tener mechones antibacterianos (Karibasappa *et al.*, 2011). Sin embargo su universalización se dio durante muchos años después. Se ha demostrado que los cepillos dentales se pueden contaminar con microorganismos presentes en cavidad oral, en las manos o en el medio ambiente, también en los contenedores donde se almacenan los cepillos. Los microorganismos tienen la capacidad de adherirse, acumularse y sobrevivir en diferentes estructuras de los cepillos dentales; estas bacterias se pueden transmitir al individuo, favoreciendo el desarrollo de diferentes enfermedades orales y desencadenando, además, procesos infecciosos a nivel sistémico como endocarditis bacteriana o neumonía, causadas por *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas* entre otros microorganismos Gram negativos. (Frazelle *et al.*, 2012) Desafortunadamente, algunas poblaciones no tienen suficiente conocimiento acerca del cuidado de los cepillos de dientes. Por lo general, las personas dejan el cepillo en el baño que, por sus condiciones de humedad, permite un desarrollo adecuado de los microorganismos que se diseminan, posterior a la acción del inodoro; los microorganismos permanecen en el aire y se depositan en los objetos que están presentes en el baño, incluido el cepillo dental (Sconyers JR *et al.*,

1973, Svanberg M *et al.*, 1978., Nelson-Filho *et al.*, 2000. Jenny Cl *et al.* Delgadillo GI, Sammons R.L *et al.*, 2004). Teniendo en cuenta lo anterior, se creó la necesidad de generar alternativas para descontaminar los cepillos dentales, teniendo como principal objetivo, la disminución de la carga bacteriana para así, evitar riesgos de infección por microorganismos patógenos que están presentes en el medio ambiente. Entre las sustancias y métodos más utilizados para la desinfección de los de estos instrumentos de higiene oral están la clorhexidina, triclosán, perborato de sodio, ácido acético, ácido hipocloroso (HOCl) y la luz UV (Berger & col, 2008) los cuales logran disminuir la carga bacteriana. Son de fácil adquisición, no tóxicas y nocivas para los microorganismos más comunes es decir Gramnegativos, que tienen el mismo efecto sin importar la edad (20 a 50 años) o el género del individuo. (Salazar-Chicaiza S & Zurita-Solís M, 2016). El ácido hipocloroso surge como una alternativa desinfectante, que se puede acoplar a dispositivos que permitan el almacenamiento del cepillo dental y así disminuir la carga bacteriana (Konidala *et al.*, 2011). Funciona como una sustancia microbicida que permite un excelente efecto antimicrobiano de amplio espectro ya que produce una reacción enzimática irreversible con proteínas de membrana, produce daños estructurales que alteran la permeabilidad celular y afecta la viabilidad bacteriana (Weiss *et al.*, 1989; Lafaurie *et al.*, 2009). Por estas razones se evaluó la efectividad antimicrobiana del HOCl como principio activo en un prototipo de dispositivo desinfectante de cepillos dentales para así poder plantear estrategias acerca de la desinfección de cepillos dentales, lo cual será conveniente para todos los individuos que realizan su higiene dental con cepillo, ya que va a mejorar su calidad de vida al lograr disminuir la carga bacteriana evitando patologías a nivel oral y sistémico.

2. Marco teórico

La salud oral es fundamental para el equilibrio en la salud general en un individuo reflejando así su bienestar lo que determina de manera crucial el tener o no una patología en cavidad oral. La cavidad oral es libre de microorganismos al nacer debido a que el feto se desarrolla en un medio ambiente protegido. A partir del nacimiento empieza la colonización por bacterias procedentes del aparato urogenital de la madre y por bacterias del medio ambiente (Hualde M, 2017). Desde el nacimiento del individuo la cavidad bucal está expuesta a innumerables microorganismos presentes en el ambiente local, estos, se convierten en residentes de la cavidad bucal y se ven favorecidos por las condiciones fisiológicas y nutricionales. En un principio la microbiota es simple y generalmente aerobia estableciéndose inicialmente algunos anaerobios, aunque todavía no hay espacio suficiente donde se creen condiciones de anaerobiosis. Los microorganismos aumentan en número y complejidad cuando aparecen los primeros dientes, estando presentes constantemente especies de *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Veillonella* y *Neisseria*. (McCarthy *et al.*, 1965). Para disminuir la carga bacteriana de los diferentes microorganismos colonizadores de la cavidad oral, la principal ayuda es la higiene oral, esta juega un papel importante en la disminución de la carga bacteriana oral, el instrumento para la remoción de placa más utilizada es el cepillo dental, según el ICOEV (Ilustre Colegio Oficial de Odontólogos de Valencia). Hoy en día en la totalidad de las casas hay al menos un cepillo de dientes por persona en España sin embargo, y aunque se piense que es algo común desde hace décadas la realidad es que la universalización del uso del cepillo de dientes no tiene tantos años como el invento. El primer cepillo dental conocido provino de la China y fue hecho en marfil con cerdas de crin de caballo. El cepillo similar al tipo utilizado en la actualidad, no se inventó hasta 1498 en China. Las cerdas fueron realmente los pelos rígidos y gruesos tomadas de la parte posterior del cuello de un cerdo y unidos a mangos de hueso o bambú (Voelker *et al.*, 2013). En 1780, en Inglaterra William Addis fabricó el "primer cepillo de dientes moderno"; este cepillo tenía un mango de hueso y los agujeros para la colocación de cerdas naturales de cerdo. En el siglo XIX se usaron los cepillos dentales con mango de plata de la época Victoriana por la élite social de la época. El celuloide comenzó a reemplazar el mango de hueso, este cambio surgió durante la Primera Guerra Mundial. Del

mismo modo, como resultado del déficit en el abastecimiento, las cerdas de nylon se introdujeron por Dupont de Nemours. Las cerdas de jabalí se utilizaron hasta 1938. Inicialmente, las cerdas de nylon eran copias de cerdas naturales en longitud y grosor, sin embargo, eran más rígida que las cerdas naturales. Otra ventajas de las cerdas de nylon eran la capacidad para formar las cerdas en varios diámetros y formas y para redondear la cerda termina siendo más suave sobre los tejidos gingivales (Harris *et al.*, 2009). El primer cepillo de dientes de nylon fue llamado Miracle Toothbrush por el Doctor West en 1938(Nápoles *et al.*, 2015) Más tarde, los estadounidenses fueron influenciados por los hábitos de higiene disciplinados de soldados de la Segunda Guerra Mundial. Se veían cada vez más preocupados con la práctica de una buena higiene bucal y rápidamente adoptaron el cepillo de dientes de nylon (Voelker *et al.*, 2013). Al pasar el tiempo, estos objetos han mejorado hasta llegar a lo que conocemos como el cepillo de dientes con muchas más comodidades, como lo son aquellos con mangos ergonómicos hasta llegar a tener mechones antibacterianos (Karibasappa *et al.*, 2011). El cepillo de dientes eléctrico fue desarrollado en Suiza en 1939. Este cepillo tenía un cable de alimentación y se introduce en los EE.UU en 1960, de manera contemporánea fueron redescubiertos en la década de 1980 y hoy en día se pueden encontrar diversos tipos de cepillos de dientes eléctricos en el mercado que utilizan variados mecanismos de acción (oscilación de rotación, ultrasonidos) y fuentes de alimentación -pilas o recargable- (Penick *et al.*, 2004). Estos cepillos también ofrecen una gran variedad de diseños de la cabeza. Cada cabeza del cepillo, si es una de cepillo manual (MTB) o cepillo eléctrico (PTB), se divide en 2 partes: la punta o extremo superior, que se encuentra en el extremo del cabezal y el extremo inferior que se encuentra cercano al mango (Penick *et al.*, 2004). Las cabezas del cepillo de dientes están compuestas de mechones, que son filamentos individuales asegurados en un agujero en el cabezal. Los filamentos dentro de los penachos se conocen como cerdas. El número y la longitud de los filamentos en un penacho, número de penachos y la disposición de los penachos varían con respecto al cepillo de dientes. Un cepillo puede ser plano con todos los filamentos de la misma longitud, de dos niveles, multinivel, ondulado o entrecruzado con penachos en ángulo de 2 diferentes direcciones (Penick *et al.*, 2004; Wilkins, 2009). Durante el cepillado dental, la remoción de la placa es realizada primeramente por el contacto directo entre los filamentos del cepillo con las caras del diente y los tejidos blandos. De acuerdo con The

European Workshop on Mechanical Plaque Control, se tienen en cuenta varios aspectos para la remoción de la placa dental por Egelberg & Claffey 1998: manejar tamaño adecuado a la edad del usuario y la destreza para que el cepillo pueda ser manipulado con facilidad y eficacia, tamaño de la cabeza adecuada para el tamaño de las necesidades individuales del paciente, extremo redondeado de nylon o filamento de poliéster no mayor que 0,23 mm (0.009 pulgadas) de diámetro, configuraciones de filamentos suaves como los estándares de la industria internacionales aceptables (ISO), patrones de filamento que mejoran la eliminación de placa en los pasos apropiados ya lo largo de la línea de las encías. Aunque son diversos los tipos de cepillos de dientes y métodos de cepillado dental que se describen en la literatura, los procedimientos necesarios para mantener su limpieza se tratan con poca frecuencia (Gaviria *et al.*, 2001; Abhishek *et al.*, 2007).

CONTAMINACIÓN DE CEPILLOS DENTALES

Los cepillos de dientes son susceptibles a la contaminación de microorganismos que se encuentran presentes en cavidad oral, el medio ambiente, las manos, la contaminación de aerosoles y almacenamiento en contenedores. Estos se adhieren, acumulan y sobreviven en los cepillos dentales los cuales pueden ser transmitidos al individuo favoreciendo el desarrollo de enfermedades orales, con un alto riesgo de diseminación llegando a producir endocarditis bacteriana o neumonía (Frazelle *et al.*, 2012). Desafortunadamente, el uso de cepillo de dientes es a menudo descuidado y se mantiene en los baños, los cuales son espacios ideales para que estos microorganismos se desarrollen, esto debido a sus condiciones de humedad y al momento en el que se acciona el inodoro algunos aerosoles con microorganismos pueden permanecer en el aire y luego se depositan en las superficies de objetos cercanos alrededor del sanitario como cepillos dentales. La razón que se le atribuye a esto sería la falta de conciencia entre el mantenimiento del cepillo de dientes con respecto a la salud pública (Sconyers *et al.* 1973; Svanberg *et al.*, 1978; Nelson-Filho *et al.*, 2000; Jenny Cl *et al.*; Delgadillo GI; Sammons *et al.*, 2004). La contaminación de los cepillos de dientes fue descrita al final del siglo XX por ser causa de infecciones sucesivas en la cavidad bucal. En 1988 Glass & Jensen, demostraron que los cepillos dentales podrían mantener viable el virus del herpes simplex tipo 1. Esto está de acuerdo con otros estudios realizados por Gaviria *et al.*, en 2001 donde se demostró que los cepillos dentales pueden

retener microorganismos viables por días: el HSVI (virus del herpes simplex tipo I), se mantuvo viable e infectivo hasta por 72 horas; *Enterobacter cloacae* se subcultivó hasta el día 16 días después de inoculado, lo que es indicativo de su elevada resistencia a soportar condiciones ambientales extremas. Este hallazgo convierte *Enterobacter cloacae* en un microorganismo difícil de erradicar y controlar en la humedad relativa de los cepillos dentales; *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* permaneció viable hasta por 72 horas lo que indica una menor resistencia a soportar condiciones ambientales, pero incluso esta resistencia limitada tendría implicaciones clínicas en pacientes portadores. Otro estudio realizado en Colombia por Díaz y col, en 1997 demostró que los cepillos dentales se contaminaron primero con diversos microorganismos orales como *Streptococcus mutans*, después con bacterias entéricas como *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae* y por último con contaminantes ambientales como hongos-levaduriformes (Díaz *et al.*, 1997; Edson *et al.*, 2010). Estos reportes demuestran que los cepillos de dientes en uso se contaminan rápidamente por una gran cantidad de microorganismos orales que incluyen bacterias, virus y hongos, actúan como reservorio de patógenos oportunistas incluyendo *Staphylococcus spp* y *Pseudomonas spp*. Otro factor que se le atribuye al grado de contaminación microbiana de los cepillos es el tiempo de recambio. Hingst en 1989 recomendó que los cepillos dentales se debieran cambiar cada tres meses, en ningún caso se deberían usar más de seis meses y además era importante cambiarlos cuando se presentara inflamaciones o infecciones virales de la garganta y/o de la boca. La ADA (America Dental Association) también recomienda el cambio de los cepillos de dientes una vez en 3-4 meses ya que esto disminuye la eficacia en la limpieza, por tal razón el uso prolongado del cepillo de dientes facilita la contaminación por diferentes microorganismos como *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Escherichia* y *Lactobacillus* (Zentralbl 1989; Taji *et al.*, 1998 Sammons *et al.*, 2004; Fernandez, 2006). Contreras y col en 2002, realizaron un estudio en donde evaluaron cepillos dentales de familias colombianas, se tomó previo al estudio una muestra de placa subgingival que dio como resultados la presencia de bacterias periodontopatógenas incluyendo *A. actinomycetemcomitans*, Además, se tomaron muestras de los cepillos dentales aparentemente expuestos al medio ambiente del baño de los sujetos utilizados por mes, que a su vez resultaron contaminados con especies de las familias *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonaceae*, lo cual no coincidía con la muestra de placa tomada

de la boca de los sujetos, esto indicó que la fuente de contaminación de cepillos dentales no es exclusivamente el nicho subgingival. La fuente precisa de esta contaminación microbiana no se determinó en ese momento pero plantearon la hipótesis de que una distancia relativamente corta del inodoro, las condiciones de almacenamiento cepillo de dientes y la humedad baño, facilitó la contaminación con las especies de enterobacterias y *Pseudomonas*, demostrando así que los cepillos dentales son una fuente de trasmisión de bacterias y traslocación de microorganismos periodontopatógenos (Contreras *et al.*, 2002); este estudio también reveló la relación que existe entre las enfermedades inflamatorias orales y los cepillos dentales contaminados, sirviendo de igual manera como puerta de entrada para favorecer el desarrollo de enfermedades sistémicas atribuyendo esto a una mala ejecución en la técnica de cepillado dental, en donde el paciente lastima la encía favoreciendo que la microbiota que se encuentra en el cepillo dental llegue hasta el torrente sanguíneo provocando así bacteremia y posteriormente posibles infecciones sistémicas como endocarditis bacteriana y neumonía, además recomienda el recambio de cepillos y pastas dentales para así limitar la retención de microorganismos (Glass *et al.*, 1988; Gaviria *et al.*, 2001; Contreras *et al.*, 2002; Figueroa *et al.*, 2009). González y col en 2011 afirmaron en su estudio que microorganismos patógenos como las enterobacterias se aislaron en cepillos dentales después de la primera semana de uso. También, que un cepillo dental contaminado podría causar enfermedades o infectar al usuario con gérmenes patógenos. Algunos investigadores como Gaviria y col en 2001 al igual que Bhat y col en 2010 indicaron que existe una relación entre los microorganismos que se encuentran en los cepillos dentales y la presencia de enfermedades de tipo respiratorias. Estos autores sostienen que se ha observado reducción de síntomas y una mejoría tan sólo con cambiar el cepillo dental; por ello, sugieren investigar sobre métodos para desinfectar los cepillos, como una medida preventiva importante.

Es por esto que se hacen necesarios procedimientos para la descontaminación de los cepillos de dientes que tiene como objetivo la disminución de la carga bacteriana y por ende disminuir el riesgo de que se generen posibles infecciones por otros microorganismos patógenos del medio ambiente. Algunos de estos procedimientos incluyen el uso de clorhexidina, triclosán, perborato de sodio. Los estudios realizados por Taji y Rogers en el

2008 encontraron extensa contaminación de los cepillos de dientes después de su uso, excepto en los casos en que un antiséptico oral, como aceites esenciales, se utilizó inmediatamente antes de cepillarse. Si bien todos estos estudios han mostrado diferentes grados de eficacia, ninguna se utiliza ampliamente como una aplicación empleada en el hogar. El mantenimiento y cuidado de cepillos dentales y la presencia de bacterias residuales en los filamentos no disminuye a pesar de que estos sean sometidos a enjuague y secado (Taji & Rogers, 1998; Jenny Cl *et al.*; Sato *et al.*, 2005; Edson *et al.*, 2010). Otros autores como Nascimento y Col en 2008, hacen referencia a que actualmente, existen estudios sobre la utilización de soluciones antimicrobianas en spray como digluconato de clorexhidina, que se rocían sobre las cerdas de los cepillos dentales, reduciendo significativamente el crecimiento de microorganismos propios de la cavidad bucal; sin embargo, no se mencionan los efectos sobre los microorganismos adquiridos del medio ambiente (bacterias oportunistas) donde los cepillos son almacenados. Remojar el cepillo dental en alcohol antes y después de su uso, fue uno de los primeros procedimientos recomendados por Bhat & col en 2013 para la desinfección de los mismos. Buscando alternativas para la desinfección de los cepillos, Meier S & col en 1996 probaron la exposición del cepillo dental a radiación ultravioleta o mantener el mismo en un recipiente cerrado con un preparado que contenga gas de formaldehído para su desinfección. Resultaron ser métodos efectivos, pero lejanos a un uso cotidiano por su alto costo o toxicidad. A fines de la década pasada, se iniciaron investigaciones con otros métodos más económicos, como la inmersión de las cerdas del cepillo dental en enjuagues bucales. La utilización de soluciones desinfectantes como el hipoclorito de sodio y la clorhexidina resultan bastante alentadores, refiere Gaviria en su estudio de 2001. En el caso de que por razones económicas o ambientales no se pueda realizar el recambio del cepillo, existen diferentes métodos de desinfección que pueden ser una opción viable, como: el gluconato de clorhexidina, el ácido acético (uno de los componentes del vinagre) y la luz UV (Berger *et al.*, 2008).

Recientemente, algunos estudios indican que la radiación de luz ultravioleta (UV) y la irradiación de microondas son los métodos más efectivos para desinfectar los cepillos de dientes después de la contaminación. Glass y Jensen exploraron la luz ultravioleta como un

medio de descontaminación y encontraron que este método es eficaz para reducir la carga bacteriana en los cepillos de dientes. La larga exposición de la luz UV inactiva los microorganismos al dañar el ADN y la interrupción de los enlaces químicos que mantienen los átomos de ADN juntos en el microorganismo. Si el daño es lo suficientemente grave, las bacterias no pueden reparar el daño y se inactivan, de igual manera, la irradiación de microondas puede alterar la estructura de la biopelícula. Los datos sugieren que la destrucción de microorganismos por microondas se debe principalmente a un efecto térmico de exposición a las microondas en el contenido celular de microorganismos que resulta en la lisis celular (Glass *et al.*, 1994; Gujjari *et al.*, 2011). El horno de microondas se utilizó en un estudio realizado por Chibebe & Pallos en 2001, con el fin de eliminar los microorganismos como *Streptococcus mutans* y *Candida albicans*, encontrados en el grupo de cepillos contaminados con estos microorganismos, mediante la inmersión de las cerdas, durante 30 segundos. Se analizaron en cuatro tiempos diferentes de exposición en el horno de microondas, es decir cero que fue el grupo control, cinco, siete y diez minutos, en donde los datos revelaron que a los 5 minutos de exposición aún había crecimiento de los microorganismos *Streptococcus mutans* y *Candida albicans*, al contrario de los tiempos de siete a diez minutos, donde hubo una eliminación total de los microorganismos evaluados (Chibebe *et al.*, 2001). Por otro lado, surge el HOCl como alternativa desinfectante que pueda ser acoplado a un prototipo de dispositivo que permita almacenar el cepillo dental y a su vez disminuir la carga bacteriana. Esta molécula es un ión no dissociado del cloro dependiente del oxígeno, altamente inestable y altamente reactivo. Por ser uno de los ácidos halogenados 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 (Morris *et al.*, 2014). Wang y col en 2007 hicieron referencia a que 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 y amplio margen de seguridad puede ser utilizado para controlar y prevenir un amplio número de infecciones de 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. *In vivo* el HOCl funciona como una sustancia quimiotáctica que permite un excelente control microbiano y activación del sistema de defensa que facilita la rápida e inocua reparación de tejidos (Konidala *et al.*, 2011). El HOCl ha demostrado tener un efecto antimicrobiano de amplio espectro en concentraciones que van desde 0.1 a 2.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en un periodo de exposición de 2 minutos (excepto *Streptococcus pyogenes* que requiere aproximadamente 10 minutos). Esta actividad microbicida, a pesar de ser más efectiva para formas bacterianas que para esporas y hongos, de igual manera, abarca microorganismos clínicamente relevantes como lo son bacterias Gram negativas, Gram positivas, parásitos y hongos entre los que se incluyen *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus metilino resistente*, *Enterococcus faecium vancomicina resistente* y esporas de *Bacillus anthracis* (Konidala U *et al.*, 2011). Los mecanismos de acción microbicidas incluyen efectos sobre la membrana externa de las bacterias Gram negativas contienen grupos sulfuro y hemo (ricos en hierro) que son esenciales para llevar a cabo normalmente el transporte de electrones. Una reacción enzimática irreversible de HOCl con proteínas de membrana, produce daños estructurales que alteran la permeabilidad celular y afecta la viabilidad bacteriana (Weiss *et al.*, 1989; Lafaurie *et al.*, 2009). En bacterias Gram positivas, el HOCl actúa sobre los grupos aminos de la glicina presente en el peptidoglucano, las bacterias Gram positivas no cuentan con estos péptidos, por lo que la cloración en este grupo de microorganismos difiere en cuanto al blanco de acción (Yankel *et al.*, 1997). Las soluciones se obtienen con una concentración de cloro disponible como HOCl de 250 ppm (0,025%) y 500 ppm (0,05%) de acuerdo con NTC 1847 con un ORP (reducción de óxido potencial) de 950-1100 MV y una conductividad de 25,3 ds / m, a una densidad de 1,01 gr / ml a pH $5,8 \pm 0,2$. (Lafaurie *et al.*, 2009).

Prototipo de dispositivo desinfectante

La Facultad de diseño de la Universidad El Bosque proveo el prototipo del dispositivo desinfectante que se diseñó como producto de un trabajo de grado de la misma Facultad. El dispositivo se concibe como un objeto que permite transportar un kit de higiene que incluye cepillo dental, crema dental y seda a diferentes espacios. Además, cuenta con un mecanismo de válvulas que permiten hacer aspersión de una sustancia desinfectante sobre

las cerdas ubicadas en la cabeza del cepillo dental, en este caso ácido hipocloroso, con el fin de reducir la carga bacteriana y mantener desinfectado este instrumento de higiene oral. El mecanismo permite que el cepillo esté en contacto con la solución durante el tiempo que se mantenga cerrado hasta su nuevo uso y lo único que el usuario debe hacer es montar el cepillo en el dispositivo y cerrarlo, en este momento se activan los aspersores que liberarán la sustancia desinfectante. Además, en la parte posterior, se ha diseñado un compartimento que permite almacenar un tubo de crema dental. (Figura 1)

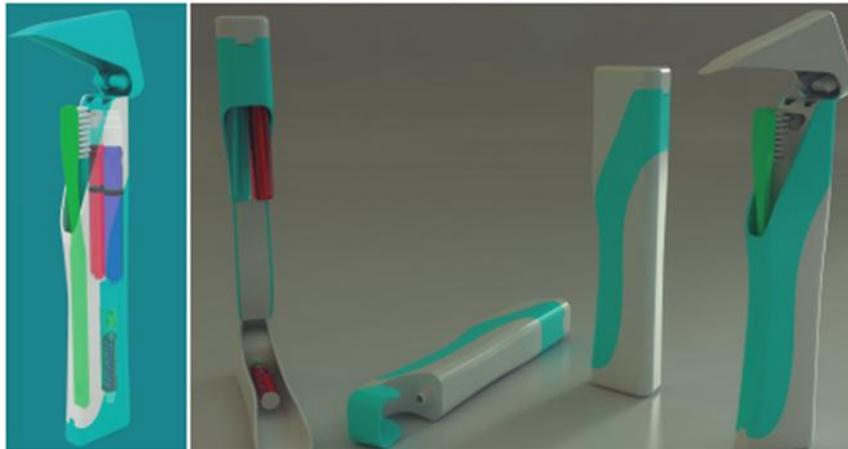


Figura 1. *Render del prototipo diseñado por la Facultad de Diseño.*

En la figura se muestra el prototipo desinfectante de cepillos dentales el cual consta de un dispositivo aspersor desinfectante y una pieza porta cepillos que permite colocar el cepillo a desinfectar, adicional a esto cuenta con un compartimiento para guardar la crema dental y seda dental.

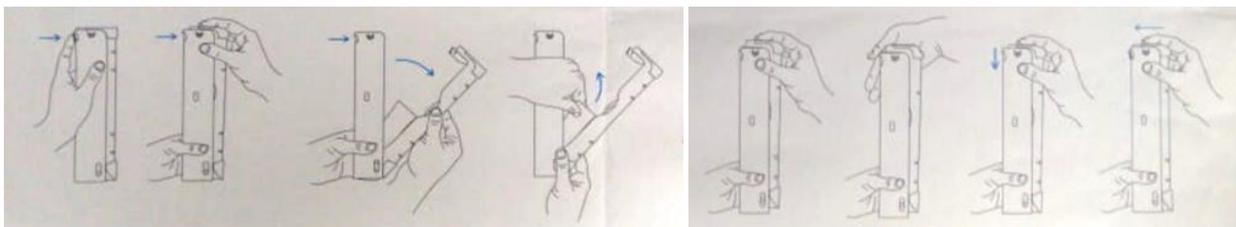


Figura 2. *Diagrama explicativo del uso del dispositivo*

En la figura se muestra la secuencia de uso del prototipo desinfectante de cepillos dentales, para su apertura y cierre mostrando los diferentes tipos de agarre, manipulación y limpieza.

3. Planteamiento del problema

Varios estudios han informado que los cepillos de dientes se contaminan con microorganismos durante su uso y la cantidad de estos microorganismos se incrementa con uso repetitivo. Los microorganismos que sobreviven en los cepillos de dientes se pueden transmitir de nuevo al usuario durante el cepillado con el potencial de causar nuevas infecciones. De acuerdo con Glass & Jensen en 1994, los microorganismos no sólo se adhieren y se reproducen en los cepillos de dientes, también son responsables de causar enfermedades locales y sistémicas (Charlotte *et al.*, 1965).

Bajo las condiciones de almacenamiento habituales, los cepillos de dientes pueden ser una fuente para la transmisión de enfermedades o la reinfección de microorganismos y virus tales como: herpes y bacterias periodontopatógenas o coliformes provenientes del ambiente del baño y que hacen parte de la flora gastrointestinal (Voelker *et al.*, 2013).

En un estudio realizado por la Unidad de Investigación Básica Oral UIBO, bacterias entéricas como *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter cloacae* fueron aisladas en cepillos dentales con una prevalencia de 21% y 24,7% respectivamente, *Klebsiella oxytoca* es descrita también por contaminación de los cepillos. Los miembros del género *Klebsiella* por lo general tienen cápsulas prominentes compuestas de polisacáridos y ácidos complejos que parecen ser esenciales para la virulencia de este microorganismo protegiéndolo de la fagocitosis por los neutrófilos y previniendo de la muerte bacteriana por factores séricos bactericidas. *Klebsiella pneumoniae* hace parte de la flora normal del tracto gastrointestinal, flora transeúnte en la boca y es un importante patógeno para el organismo humano que expresa varios factores de virulencia relacionados con procesos infecciosos localizados y sistémicos.

La presencia de estos microorganismos en la cavidad oral se ha asociado con hábitos de mala higiene oral, contaminación oro-fecal y auto-inoculación por medio de cepillos dentales (Millán *et al.*, 2014), a la vez se afirma que *K. pneumoniae* podría exacerbar enfermedades orales que presente el huésped como la periodontitis ya que sus factores de virulencia están relacionado con la progresión de procesos infecciosos exitosos. Por su parte *E. cloacae* ha sido asociado a un desequilibrio de la flora oral relacionada con la periodontitis, favoreciendo la progresión de la enfermedad y afectando la respuesta al tratamiento (Rueda & Salazar, 2007). Teniendo en cuenta lo anterior, se han descrito

diferentes métodos para la descontaminación de cepillos dentales como el uso de clorhexidina en spray y en enjuague, aceites esenciales e hipoclorito de sodio (Sogi *et al.*, 2002), todas estas soluciones son utilizadas como medio para sumergir el cepillo dental y realizar una disminución de la carga bacteriana en los cepillos más no de una remoción total de la microbiota que puede estar contaminando este. La esterilización es un método de eliminación total de todo tipo de microorganismo que asegura la ausencia absoluta de cualquier forma viviente. Una esterilización deficiente o manipulación incorrecta de materiales y medios de cultivo conlleva a contaminaciones, resultados erróneos o pérdida del material biológico. Por ello, se requieren buenas prácticas de laboratorio para su adecuado manejo (Aquiahuatl *et al.*, 2012). La esterilización es la técnica ideal a utilizar a la hora de la limpieza del cepillo dental, Glass & Jensen en 1994 describieron la luz ultravioleta y las micro ondas como métodos para realizar la remoción total de los microorganismos en los cepillos dentales. Aunque se tengan descritas estas técnicas de desinfección, no son de conocimiento para la población lo que hace que no se tengan en cuenta las causas por las cuales los cepillos dentales se contaminan. El HOCl es un pro-oxidante que hace parte de las especies reactivas de oxígeno (ERO), como derivado del mismo; en condiciones fisiológicas naturales, es producido por algunas células inmunitarias, principalmente por polimorfonucleares neutrófilos (PMNs), cuya producción hace parte del proceso de destrucción de patógenos dependiente del oxígeno a través del denominado “estallido respiratorio”, que promueve la formación de especies reactivas de oxígeno para la oxidación y daño tanto de endotoxinas (LPS) y proteasas (como las gingipaínas de *P. gingivalis*), entre otros mecanismos de acción. Sin embargo, al ser administrado externamente, como en el caso de un enjuague bucal, debe existir un control y estudio sobre sus efectos, ya que puede promover estrés oxidativo y tiene efecto oxidante sobre los grupos tioles y tioéter de los diferentes grupos de proteínas, entre otros (Cardona *et al* 2014). Se considera que el ácido hipocloroso tiene capacidades antimicrobianas de amplio espectro, siendo su capacidad más sensible para las bacterias que para esporas y hongos; abarca microorganismos clínicamente relevantes como lo son bacterias Gram negativas, Gram positivas, parásitos y hongos entre los que se incluyen *Staphylococcus aureus*, *S. aureus meticolino* resistente, *Enterococcus faecium vancomicina* resistente y esporas de *Bacillus anthracis* (Harris *et al.*, 2009). Es de gran importancia que éstas técnicas

sean de conocimiento masivo para prevenir enfermedades que pueden ser causadas por contaminación de los cepillos, lo cual haría parte de la prevención de las enfermedades disminuyendo el número de individuos que presenta la enfermedad y en caso de este ya presente enfermedad, evitar la re contaminación del cepillos con las bacterias que la mantengan activa. El número de casos nuevos que puedan presentarse de enfermedades periodontales también se reducirá por la ausencia de los microorganismos que pueden contribuir a que esta se presente. La Organización Mundial de la Salud (OMS) hace referencia a que la seguridad biológica son importantes cuestiones de interés internacional, en 2005 se realiza actualización en las que proporcionan información acerca de los abordajes de seguridad y protección biológica para el nuevo milenio, destacando la responsabilidad personal. Por lo anterior se requiere una evaluación microbiológica para el control de los diferentes mecanismos que existen para la desinfección. La evaluación de la calidad microbiológica del ambiente indica la cantidad de microorganismos que están presentes en un área determinada. Los microorganismos generalmente no están flotando en el aire sino que se encuentran sobre partículas inertes, que le sirven como medio de transporte, las cuales pueden depositarse sobre las superficies; es por ello que mientras más limpia es un área, menor será el número de microorganismos presentes en el aire de la misma (Gutiérrez, 2001).

De acuerdo al problema planteado, surge entonces la siguiente pregunta de investigación.

¿Se logra una disminución de la carga bacteriana de cepillos dentales contaminados con *Enterobacter Cloacae*, usando un prototipo de dispositivo desinfectante que tiene como principio activo ácido hipocloroso?

4. Justificación

En el 2009 Lafaurie et al., realizaron un estudio con una muestra de 151 cepillos tomados de pacientes de la clínica de la Universidad El Bosque, en donde se identificaron diferentes microorganismos de los cepillos dentales en uso. *E. cloacae* fue el que se presentó con mayor prevalencia (24,7%), seguido *K. pneumoniae* (21%); la agrupación de microorganismos que se presentaron en menor frecuencia y denominada como “otros”, se presentó en el 37% que incluía, entre otros microorganismos, *Pseudomonas aeruginosa*. Además, se encontró una asociación entre la presencia de bacterias entéricas en los cepillos dentales y la presencia de estos microorganismos en saliva, considerándose este hallazgo como el principal factor de riesgo de la presencia de bacterias entéricas Gram negativas en la cavidad oral y su posible establecimiento en este sitio anatómico. Por otro lado, el HOCl (ácido hipocloroso) es una sustancia antimicrobiana capaz de inhibir en un 50% la división bacteriana con solo 50 uL de HOCl son suficientes para inhibir por completo la división celular en 5 minutos de exposición (Mckenna & Davies, 1988), por lo tanto, esta sustancia puede constituirse como una alternativa para la desinfección de cepillos dentales que se contaminan rápidamente en el ambiente del baño y que se constituyen como una potencial fuente de infecciones localizadas o sistémicas en el hospedador. Teniendo en cuenta todos estos aspectos se hace necesario realizar la evaluación microbiológica de un prototipo desinfectante de cepillos dentales empleando HOCl como principio activo y clorhexidina como control positivo para asegurar que se cumpla con un sistema capaz de descontaminar los cepillos dentales. De esta manera, se evita la re-contaminación en la cavidad oral por medio de estos instrumentos de higiene oral los cuales sirven de reservorio para los microorganismos que son frecuentemente los causantes de enfermedades. Se tendrá en cuenta para la evaluación, diferentes sustancias empleadas en el prototipo desinfectante, que actúen de manera eficaz ante la eliminación de microorganismos alojados en los cepillos dentales. Aportando información completa que de soporte para sustentar y asegurar su uso como método utilizado para la desinfección de los cepillos dentales.

5. Situación actual

Estudios anteriores, como el realizado en Brasil por Nelson-Filho *et al.*, 2000, identificaron la principal causa de contaminación de cepillos dentales en el momento en que se acciona el inodoro, algunos aerosoles con microorganismos pueden salir del sanitario y ser inhalados o permanecer en el aire y luego depositarse en las superficies de elementos presentes en el baño como máquinas de afeitar, jabones o cepillos dentales. Por otra parte otros estudios realizados en Colombia por Díaz y col, en 1997, demostraron que los cepillos dentales se contaminaron primero con diversos microorganismos orales como *S. mutans*, después con bacterias entéricas como *Escherichia spp*, *E. cloacae* y por último con contaminantes ambientales como hongos levaduriformes.

Debido a la transmisión recurrente de enfermedades infecciosas causadas por los cepillos dentales contaminados se hacen necesario buscar alternativas para la descontaminación de los cepillos de dientes que tiene como objetivo la disminución de carga bacteria de estos y por ende, disminuir el riesgo de infecciones por microorganismos patógenos del medio ambiente. Algunos de estos procedimientos incluyen el uso de clorhexidina, triclosán, perborato de sodio, ácido acético y la luz UV (Berger & col, 2008).

Por otro lado, se plantea el uso del ácido hipocloroso (HOCl) como alternativa desinfectante para la reducción de la carga bacteriana de cepillos dentales. Esta molécula hace parte de un grupo de sustancia microbicidas conocidas como "moléculas antimicrobianas no antibióticas" que se utiliza en el tratamiento de infecciones de piel y mucosas. Funciona como una sustancia quimiotáctica que permite un excelente control microbiano y activación del sistema de defensa que facilita la rápida e inocua reparación de tejidos. Se demostró 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 (excepto *Streptococcus pyogenes* que requiere aproximadamente 10 minutos). Esta actividad microbicida actúa en bacterias Gram negativas, Gram positivas, parásitos y hongos entre los que se incluyen *Staphylococcus aureus*, *S. aureus* meticilino resistente, *Enterococcus faecium* vancomicina resistente y esporas de *Bacillus anthracis* (Wang *et al.*, 2007) . Un estudio reciente mostró el grado de eficacia de HOCl en dos concentraciones diferentes 250 y 500 ppm a pH 5,8 y 5,2 y clorhexidina al 0,2% frente a bacilos entéricos comúnmente encontrados como

contaminantes en muestras de saliva y placa subgingival de pacientes con enfermedad periodontal en individuos sanos y se observó una variabilidad en el porcentaje de viabilidad bacteriana según la bacteria: *K. pneumoniae* mostró una reducción entre el 39,5% y el 40% frente a la CHX y a las dos concentraciones de HOCl, comparándolo con el grupo control, donde se observó con HOCl 500 ppm a pH de 5.8 una mortalidad celular entre el 60 y 65% para *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *C. rectus* y *K. pneumoniae*, mientras que *E. cloacae* solo presentó una mortalidad del 30%; la clorhexidina mostró una baja mortalidad celular para todas las bacterias a excepción de *E. cloacae* que redujo la viabilidad en un 70%. Por otro lado, *K. oxytoca* se encontró una mortalidad bacteriana de un 51% con HOCl a 500 ppm a un pH 5,8, seguido de un 32% con clorhexidina. Por último, para *E. cloacae* se encontró un 72% de mortalidad bacteriana con clorhexidina al 0,2%; los demás tratamientos presentaron una mortalidad bacteriana de entre el 25 y el 36%. Los únicos tratamientos que no presentaron diferencias significativas fueron HOCl 500ppm pH 5,2 vs. HOCl 250 ppm pH 5,8. Por estas razones se evaluará la efectividad antimicrobiana del HOCl como principio activo en un prototipo de dispositivo desinfectante de cepillos dentales usando clorhexidina al 2% como control positivo y agua destilada desionizada estéril como control negativo.

6. Objetivos

6.1 *Objetivo General*

-Evaluar la efectividad antimicrobiana de ácido hipocloroso (HOCL) como principio activo adaptado a un prototipo desinfectante doméstico de cepillos dentales.

6.2 *Objetivos específicos*

-Evaluar la eficacia antimicrobiana del Ácido hipocloroso (HOCL) adaptado a un prototipo desinfectante doméstico de cepillos dentales sobre *Enterobacter cloacae* ATCC 13047

-Comparar la capacidad desinfectante del Ácido hipocloroso (HOCL) frente a clorhexidina al 2% adaptadas a un prototipo desinfectante doméstico de cepillos dentales para disminuir el crecimiento de *Enterobacter cloacae* ATCC 13047.

7. Metodología del proyecto

7.1 Tipo de estudio

Estudio experimental

7.2 Población y muestra

Se usaron 3 prototipos desinfectantes con 18 cepillos dentales nuevos de la marca comercial Colgate Triple Acción los cuales fueron inoculados con *Enterobacter cloacae* ATCC 13047.

7.3 Métodos y técnicas para la recolección de la información

a. Preparación del inóculo bacteriano

Para realizar el inóculo del microorganismo se descongeló la cepa de *Enterobacter cloacae* ATCC 13047 la cual se encontraba disponible en el cepario del Laboratorio de Microbiología Oral del grupo UIBO, almacenada en caldo BHI con 10% glicerol a -80°C . Se sembraron 20 μl en tres cajas de agar BHI por agotamiento y se incubó a 37°C por 24 horas en atmósfera aerobia.

Una vez se obtuvo crecimiento en Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de *E. cloacae* puras y aisladas, se inocularon 4 UFC de *Enterobacter cloacae* en 55 ml de caldo BHI siendo estas incubadas por agitación a 130 rpm por 4 horas hasta llegar a una $\text{DO}=0.980\pm 0.02$ a $\lambda=580\text{nm}$ (Charriere y col, 1984; Restrepo y col, 2005), previamente estandarizada por el laboratorio de microbiología oral para obtener un inóculo 1×10^8 UFC/ml de *E. cloacae* ATCC 1304.

b. Contaminación de los cepillos dentales

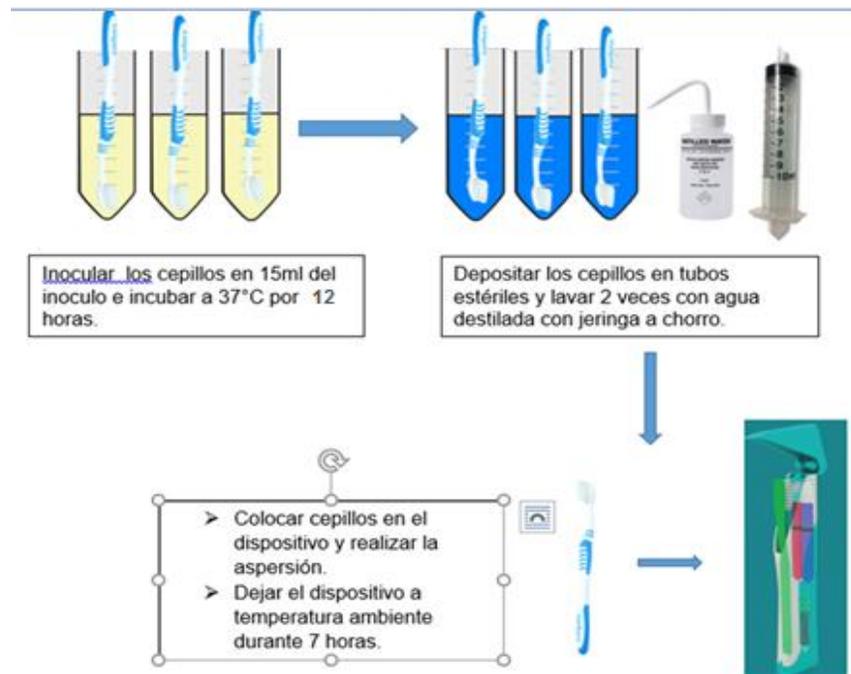
Una vez realizado el inóculo bacteriano, se contaminaron los cepillos dentales previamente esterilizados con óxido de etileno sumirgiéndolos en 15 ml del inóculo previamente alícuotado en tubos falcon de 50 ml, estos fueron incubados a 37°C por 24 horas. Luego, los cepillos dentales se depositaron en tubos estériles y se lavaron dos veces con solución salina estéril a chorro con el fin de eliminar el exceso de microorganismos en el cepillo dental completo (Herrera y col, 2012).

Cada cepillo se colocó en el dispositivo desinfectante que se encontraba cargado con cada una de las sustancias a evaluar, el cual se realizó por triplicado tanto para el control positivo

(Clorhexidina al 2%) como para el control negativo (agua destilada desionizada estéril) y la sustancia a evaluar HOCl pH7.0 concentraciones de estudio 1000ppm y 2000ppm. Para cada una de las sustancias mencionadas se evaluaron triplicados. Los dispositivos se dejaron a temperatura ambiente durante 7 horas, posteriormente se retiró el cepillo y se sumergió en caldo BHI durante 24 horas, se agitó en vortex mixer y se realizaron diluciones seriadas en base 10 ⁻⁶, ⁻⁷ y ⁻⁸ en caldo VMGAI sembrando 100µl del caldo en agar BHI para su posterior recuento. (Figura 3).

C. Recuento de unidades formadoras de colonia

Posterior a las diluciones se realizó de manera manual el recuento de UFC, observando y contando en cada agar BHI las colonias formadas de *E. cloacae*.



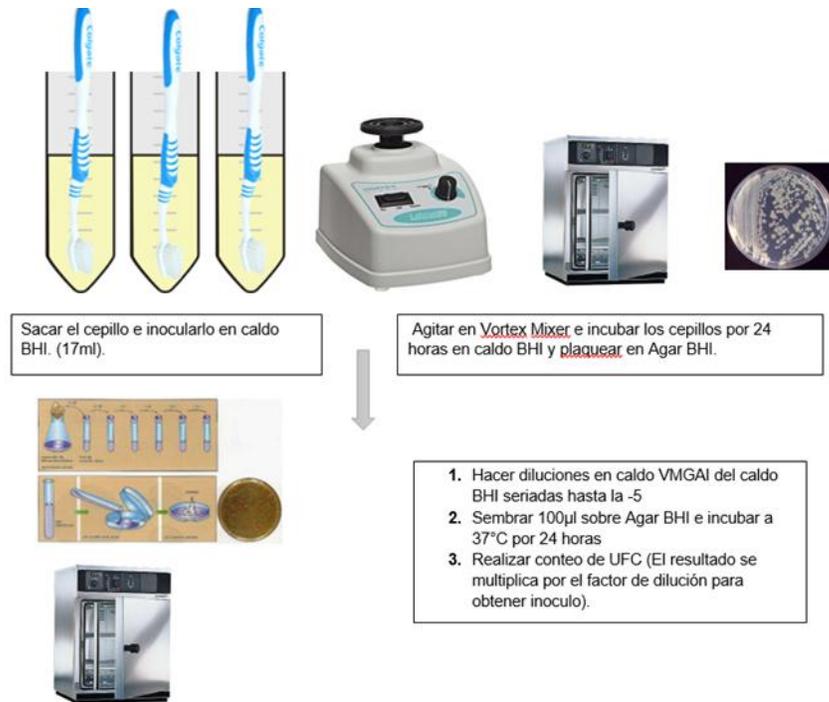


Figura 3. Evaluación de la efectividad antimicrobiana del HOCl en el dispositivo SAG.

7.4 Plan de tabulación y análisis

a. Hipótesis estadísticas

HIPÓTESIS NULA: No existen diferencias estadísticamente significativas entre la desinfección de cepillos dentales usando un prototipo de dispositivo con ácido hipocloroso (1.000 ppm y 2.000ppm), clorhexidina 2% y agua destilada desionizada estéril.

HIPÓTESIS ALTERNA: Existen diferencias estadísticamente significativas entre la desinfección de cepillos dentales usando un prototipo de dispositivo con ácido hipocloroso (1.000 ppm y 2.000ppm), clorhexidina 2% y agua destilada desionizada estéril.

b. Estadística descriptiva:

Se realizó el recuento de las Unidades Formadoras de Colonia (UFC) obtenidas antes y después de realizar la evaluación de la eficacia de cada una de las sustancias evaluadas en el prototipo de dispositivo desinfectante (SAG) para determinar porcentaje de reducción de la carga bacteriana. El análisis estadístico se realizó con pruebas no paramétricas (prueba de Kruskal-Wallis y el test de U Mann Whitney).

8. Consideraciones éticas

Este estudio no tuvo intervención, recolección de datos o muestras de pacientes por lo tanto no requiere consentimiento o asentimiento informado según Resolución N° 008431 de 1993.

9. Resultados

En este estudio se realizó un experimento en tres momentos distintos, donde se evaluó la concentración de ácido hipocloroso de 1.000 y 2000 ppm pH 7.0 el cual fue sembrado en diluciones de -6, -7 y -8. En los resultados se observó que el ácido Hipocloroso 2000 ppm con un pH de 7, no demostró efectividad ante *E. cloacae*, evidenciando desde 1 hasta 215 UFC de esta bacteria en las tres diluciones utilizadas en el estudio (tabla1). De igual manera en los cepillos usados como control negativo se observó la presencia desde 1 hasta 210 UFC de *E. cloacae* en las tres diluciones utilizadas. En cuanto al control positivo, que en este estudio fue la Clorhexidina en una concentración de 2%, demostró un 100% de efectividad frente *E. cloacae* en las tres diluciones. (Tabla 2) Las diluciones (-6, -7, -8) fueron usadas para poder realizar un conteo preciso de las UFC de *E. cloacae* y no afectan en los resultados de las sustancias. Los resultados demuestran que las concentraciones evaluadas de la sustancia estudiada en el presente estudio (ácido hipocloroso) no es la adecuada para la desinfección de los cepillos por medio de aspersión, mientras que el control positivo (Clorhexidina 2%) al demostrar efectividad de un 100% podría ser una sustancia adecuada para la desinfección de los cepillos.

Recuento microbiológico en UFC/ml para el prototipo desinfectante utilizando HOCl 1.000 ppm

DILUCIÓN SUSTANCIA	-6	-7	-8
	0	0	0
	0	0	0
CLORHEXIDINA 2%	0	0	0
	209	30	3
	180	19	3
AGUA DESTILADA DESIONIZADA	200	27	2
	179	24	0
	189	27	3
ÁCIDO HIPOCLOROSO 1.000 ppm	196	36	4

Tabla 1. Experimento en tres momentos distintos evaluando la concentración de ácido hipocloroso de 1.000 ppm pH 7.0, sembrado en diluciones de -6, -7 y -8.

Recuento microbiológico en UFC/ml para el prototipo desinfectante utilizando HOCl 2000 ppm

DILUCIÓN SUSTANCIA	-6	-7	-8
CLORHEXIDINA 2%	0	0	0
	0	0	0
	0	0	0
AGUA DESTILADA DESIONIZADA	176	16	5
	197	20	1
	210	29	3
ÁCIDO HIPOCLOROSO 2.000 ppm	210	25	2
	215	13	1
	195	17	2

Tabla 2. Experimento en tres momentos distintos evaluando la concentración de ácido hipocloroso de 2.000 ppm pH 7.0, sembrado en diluciones de -6, -7 y -8.

		Clorhexidina	Agua destilada desionizada estéril	Acido hipocloroso 1.000ppm	Acido hipocloroso 2.000ppm	Valor P
Dilución	Mediana	0 ^{bcd}	193 ^a	189 ^a	210 ^a	0.037
6	RIQ	(0-0)	(189-205)	(179-196)	(195-215)	3
Dilución	Mediana	0 ^{bcd}	23 ^a	27 ^a	17 ^a	0.042
7	RIQ	(0-0)	(20-28)	(24-36)	(13-25)	2
Dilución	Mediana	0	3	3	2	0.097
8	RIQ	(0-0)	(2-4)	(0-4)	(1-2)	3

Tabla 3. Prueba de Kruskal-Wallis; test de U Mann Whitney.

a) Diferencias estadísticamente significativas con clorhexidina; b) Diferencias estadísticamente significativas con agua destilada desionizada estéril; c) Diferencias estadísticamente significativas con Acido hipocloroso 1.000ppm; d) Diferencias estadísticamente significativas con Acido hipocloroso 2.000ppm.

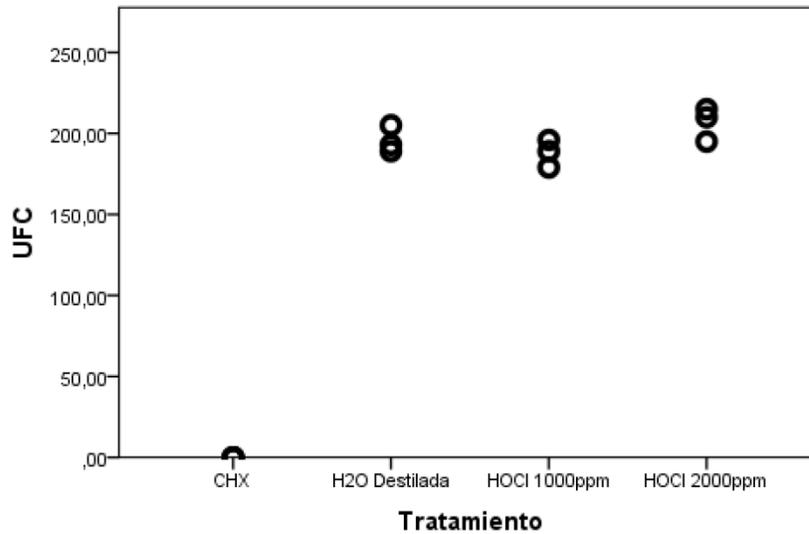


Gráfico 1. Mediana y rango intercuantil de clorhexidina, agua destilada desionizada estéril y ácido hipocloroso de 1000 y 2000 ppm en dilución -6.

Se observa que la clorhexidina mantiene una mediana y RIQ de 0, agua destilada desionizada estéril mediana de 193 con un RIQ de 189-205, ácido hipocloroso de 1000ppm mediana de 189 con un RIQ de 179-196 y ácido hipocloroso de 2000ppm mediana de 210 con un RIQ de 195-215.

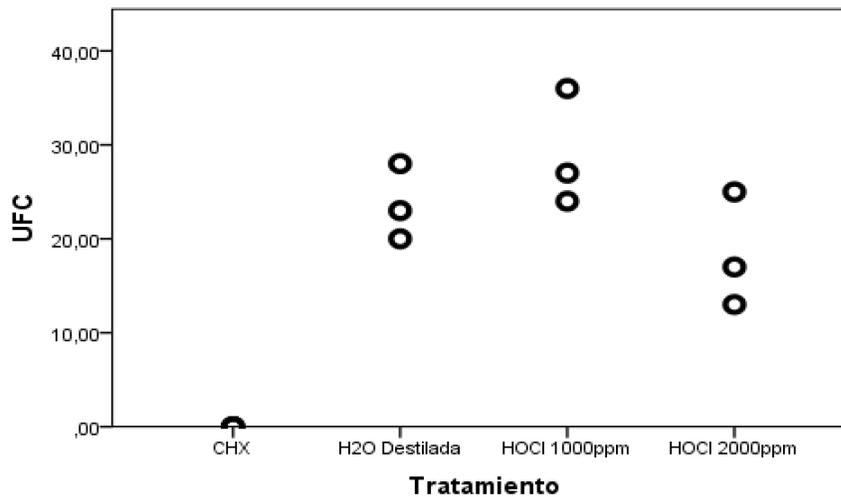


Gráfico 2. Mediana y rango intercuantil de clorhexidina, agua destilada desionizada estéril y ácido hipocloroso de 1000 y 2000 ppm en dilución -7.

Se observa que la clorhexidina mantiene una mediana y RIQ de 0, agua destilada desionizada estéril mediana de 23 con un RIQ de 20-28, ácido hipocloroso de 1000ppm mediana de 27 con un RIQ de 24-36 y ácido hipocloroso de 2000ppm mediana de 17 con un RIQ de 13-25.

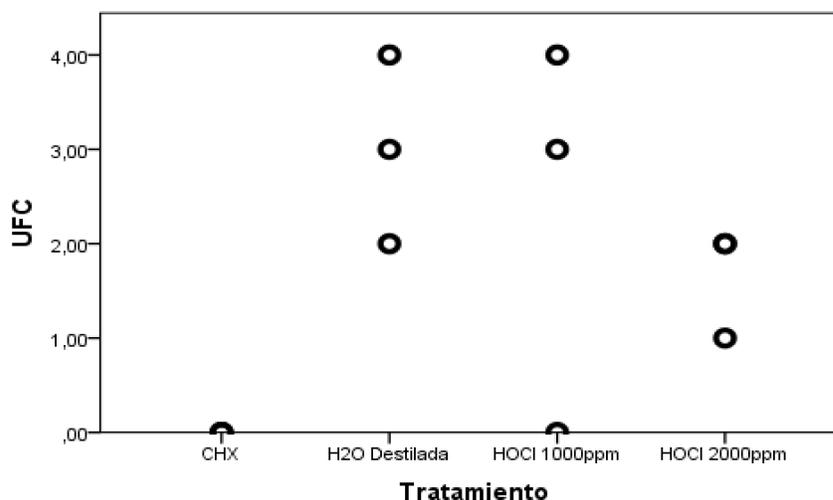


Gráfico 3. Mediana y rango intercuartil de clorhexidina, agua destilada desionizada estéril y ácido hipocloroso de 1000 y 2000 ppm en dilución -8.

Se observa que la clorhexidina mantiene una mediana y RIQ de 0, agua destilada desionizada estéril mediana de 3 con un RIQ de 2-4, ácido hipocloroso de 1000ppm mediana de 3 con un RIQ de 0-4 y ácido hipocloroso de 2000ppm mediana de 2 con un RIQ de 1-2.

En la dilución 6 se observó, entre las diferentes sustancias, que hubo diferencias estadísticamente significativas ($p=0.0373$) lo cual reafirma lo hallado en el experimento, en el cual la clorhexidina como control positivo, fue la sustancia más efectiva al momento de desinfectar los cepillos inoculados con *E. cloacae*, teniendo una mediana y rango intercuartil (RIQ) de 0. Mientras que el agua destilada usada como control negativo tuvo una mediana de 193 y RIQ entre 189-205; ácido hipocloroso 1000 ppm con una mediana de 189 y RIQ entre 179-196; ácido hipocloroso 2000 ppm con una mediana de 210 y RIQ entre 195-215, fueron las sustancias menos efectivas frente a *E. cloacae*. En la dilución 7 los resultados fueron similares a los hallados en la dilución 6, existiendo diferencias estadísticamente significativas ($p=0.0422$) entre clorhexidina con mediana y RIQ de 0 y agua destilada con mediana de 23 y RIQ entre 20 y 28; ácido hipocloroso 1000 ppm con mediana de 27 y RIQ entre 24-36; ácido hipocloroso 2000 ppm con una mediana de 17 y RIQ de 13-25. Se observó que la clorhexidina al 2% fue la sustancia más efectiva ante *E. cloacae*. Mientras que agua destilada y ácido hipocloroso, aunque se observaron menos UFC de *Enterobacter cloacae*, fueron las sustancias menos efectivas ante este tipo de bacteria. En la dilución 8, no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p=0.0973$). Clorhexidina con una mediana y RIQ de 0; agua destilada con mediana de 3 y RIQ entre 2-4; ácido hipocloroso

1000 ppm con una mediana de 3 y RIQ entre 0-4; acido hipocloroso 2000 ppm con una mediana de 2 y RIQ entre 1-2.

10. Discusión

La salud oral es determinante en la salud general del ser humano, evidenciando un equilibrio que determina la presencia o no de una patología en cavidad oral. Para conservar una salud oral adecuada, es necesario utilizar los diferentes medios mecánicos y químicos para remoción de la placa dental. Por ejemplo, los cepillos dentales, los cuales son utilizados para remover la placa dental. Sin embargo, a pesar de ser un elemento útil para el cuidado de la salud oral, su cuidado es bastante cuestionado, ya que la mayoría de las personas lo mantiene en los baños, los cuales por sus condiciones de humedad, promueven un desarrollo de microorganismos, específicamente al momento en el que el inodoro se acciona. (Sconyers *et al.*, 1973; Svanberg *et al.*, 1978; Nelson-Filho *et al.*, 2000; Jenny Cl *et al.* Delgadillo GI; Sammons *et al.*, 2004).

En 1997, Díaz y col, demostraron que los cepillos dentales se contaminaron inicialmente con diversos microorganismos orales como *Streptococcus mutans* y posteriormente con bacterias entéricas como *Escherichia*, *E cloacae* y contaminantes ambientales como hongos-levaduriformes. (Díaz *et al* 1997; Edson *et al.*, 2010,). Se ha demostrado que los cepillos pueden retener microorganismos viables por días, por ejemplo *E cloacae*, considerado como un microorganismo difícil de erradicar y controlar en la humedad relativa de los cepillos dentales. Lafaurie *et al* en el año 2009, realizaron un estudio con una muestra de 151 cepillos, en donde se identificaron en mayor prevalencia colonias de *Enterobacter cloacae* con 24.7%.

La utilización de soluciones desinfectantes como hipoclorito de sodio y clorhexidina, demostraron un efecto desinfectante adecuado (Gaviria *et al.*, 2001). Existen diferentes métodos de desinfección que pueden ser una opción viable como: gluconato de clorhexidina, ácido acético y la luz UV (Berger *et al.*, 2008). De igual forma en diferentes estudios se han utilizado los componentes de los enjuagues bucales, por ejemplo, en un estudio la desinfección por medio de aceites esenciales, fue efectiva de manera similar al uso de Clorhexidina, ya que no hubo diferencias estadísticamente significativas ($p=0.408$) en cuanto a su efectividad ante diferentes cepas de bacterias. (Aguirre, 2013). Se ha evaluado el peróxido de hidrogeno como sustancia desinfectante de cepillos y se ha demostrado que a diferentes concentraciones es capaz de eliminar diferentes especies de

bacterias, además tiene un efecto a largo plazo debido a su efecto oxidante que se debe a la liberación de radicales de oxígeno que tienen un efecto microbicida, remueven restos de células o tejidos que sirven como fuente de alimentación de los microorganismos que contaminan el cepillo (Martinez *et al.*, 2010). En el presente estudio, se evaluó HOCl como sustancia desinfectante para un prototipo desinfectante doméstico para cepillos dentales, incluyendo como control negativo agua destilada desionizada estéril y control positivo clorhexidina 2% donde se utilizó como microorganismo de inoculación *Enterobacter cloacae* ATCC 13047. Se evidenció que las concentraciones evaluadas de la sustancia desinfectante HOCl no fueron efectivas frente a esta bacteria, ya que se observaron altos recuentos de unidades formadoras de colonia que previamente se asperjaron con esta sustancia desinfectante. Lo cual es contrario a lo hallado por Lafaurie y col en 2009, donde se evidenció que el ácido hipocloroso es un bactericida capaz de inhibir *E. cloacae* en un 100% pero utilizando concentraciones de 500 ppm a pH 5.8, condiciones claramente diferentes a las evaluadas en el presente estudio lo cual no descarta del todo al ácido hipocloroso como una sustancia que puede ser utilizada en cavidad oral, debido a que sus efectos secundarios son disminuidos y este puede actuar como un potente antimicrobiano si se consideran condiciones físico químicas de pH y concentración diferentes.

De igual forma, el uso como control negativo del agua destilada se determina bajo el hecho que es una sustancia que no tiene ningún efecto bactericida y como fue reportado por Aguirre en el 2013, en el cual la mayoría de cepillos contaminados, era cuando se realizaba la desinfección con agua destilada. También fue determinado que el uso de agua destilada como desinfectante, promueve la infección temprana de estos instrumentos. En este estudio, la clorhexidina como control positivo, corroboró lo evidenciado en diversos estudios, en los cuales esta sustancia ha sido efectiva contra las cepas de diferentes especies de bacterias presentes en los cepillos dentales. Esto fue demostrado en un estudio donde evaluaron el gluconato de Clorhexidina al 0.12% como agente desinfectante en cepillos y biberones, los resultados evidenciaron una alta efectividad ante diferentes bacterias (Herrera *et al.*, 2005)

Por otro lado, con respecto al dispositivo utilizado en este estudio (SAG) se determinó que utilizaba un sistema de aspersión en las cerdas del cepillo, posteriormente a su uso para el

cepillado. Sin embargo se logró identificar que el sistema utilizado no fue del todo efectivo ya que en ocasiones la aspersión era realizada solo en una parte de la cabeza del cepillo y no en todo el área de la misma. De igual forma, como lo han evidenciado diferentes estudios, el método de aspersión no es tan efectivo como el método de inmersión. Esto es determinado bajo la premisa, que por medio de la aspersión, la sustancia desinfectante no llega a todas las partes de las cerdas y tiene un tiempo de duración menor (Aguirre, 2013).

11. Conclusiones

- En el presente estudio, el ácido hipocloroso a 1000 y 2000ppm a pH 7.0 no fue efectivo como sustancia desinfectante adaptado a prototipo desinfectante doméstico de cepillo dental (SAG) para *E. cloacae*.
- Se evidenció efectividad de la clorhexidina como control positivo, frente a *E. cloacae* en todos los prototipos desinfectantes de cepillo dental. Por tal motivo, la clorhexidina se puede seguir usando para desinfectar los cepillos dentales, ya que tuvo una efectividad del 100% frente al microorganismo de estudio.
- Es necesario realizar más estudios relacionados al hallazgo de sustancias que reduzcan la carga bacteriana ya que el ácido hipocloroso a las concentraciones y pH evaluado no cumplió con esta función.

12.Referencias bibliográficas

Abhishek Mehta, Peter Simon Sequeira and Gopalkrishna Bhat. New York State Dental Journal. April 2007. 73

Aguirre Fernández, M. (2013). Estudio comparativo de agentes químicos utilizados para la desinfección de cepillos dentales. [Pregrado]. Universidad san francisco de quito.

Aysegül Ö, Elgin I, Gulcin A, Nedim S. The Efficacy of Chlorhexidine Spray vs Mouthwash in the Microbial Contamination of Child Toothbrushes. Journal Of Dentistry For Children. 2007, Sep; 74(3): 177-181.

Berger JR, Drukartz MJ, Tenenbaum MD. The efficacy of two UV toothbrush sanitization devices. A pilot study. NY StateDent J. 2008; 74(1):50-2.

Chibebe Jr J, Pallos D. Avaliação da esterilização de escovas dentais em forno de microondas (Estudo in vitro). Rev Biociên. 2001 Jan;7(2):39-42

Cl Jenny, The use and Handling of toothbrushes in schools and institutions. Disponible en: <http://www.familyinternet.com/dentist/hand.html>

Contreras A, Astudillo M, Daza L. et al. Contaminación microbiana de los cepillosdentales en pacientes con enfermedad periodontal. Revista Estomatología. 2002; 10(1):4-14.

Delgadillo GI, Martínez GJ, Ortiz AN, Pérez OV, Rodríguez FA, Vázquez GI. Evaluación de la contaminación microbiana en cepillos dentales ubicados en dos diferentes ambientes: cuarto de baño y en el estuche del mismo cepillo.

Díaz AJ, Gómez MP, Gómez PM, Gracia HE, De Mora M, Abello R. Recambio del cepillo dental (Análisis microbiológico) Memorias VII encuentro de investigación, ACFO 1997 pp-110-112.

Fernandes H., V & L. Cesar, D. Microbiology evaluation of toothbrushes. (2006). In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal. 42. 31A-31A.

Figueroa M, Alonso G, Acevedo A. Microorganismos presentes en las diferentes etapas de la progresión de la lesión de caries dental. Acta Odontológica Venezuela. 2009;47(1):1-13.

Frazelle M, Munro C. Toothbrush Contamination: A Review of the Literature. Hindawi. 2012.

Gaviria PA, Rosales HL, Contreras A. Contaminación in vitro de cepillos dentales. Revista Estomatología. 2001; 9: 14-20

Glass R.T and Jensen H. G., The effectiveness of a u-v toothbrush sanitizing device in reducing the number of bacteria, yeasts and viruses on toothbrushes. Journal Oklahoma Dental Association, vol. 84, no. 4, pp. 24-28, 1994.

Glass RT, Jensen HG. More on the contaminated toothbrush. The viral story. Quintessence. 1988: 10:713-716.

Glass RT, Jensen HG. The effectiveness of a u-v toothbrush sanitizing device in reducing the number of bacteria, yeasts and viruses on toothbrushes. *J Okla Dent Assoc* 1994;84:24-8.

Gujjari SK, Gujjari AK, Patel PV, Shubhashini PV. Comparative evaluation of ultraviolet and microwave sanitization techniques for toothbrush decontamination. *J Int Soc Prev Community Dent.* 2011;1:20-6.

Harris N, García-Godoy F. Primary preventive dentistry. 7th ed. Upper Saddle River, N.J.: Pearson Education; 2009.

Herrera, H., Chávez, A. and Herrera de, H. (2005). Gluconato de clorhexidina al 0.12% como estrategia preventiva de estreptococos mutans, presentes en cepillo dentales, pepes y biberones. [online] *Dsuees.uees.edu.sv*.

Hualde M. ¿Qué bacterias tenemos en la boca? [Internet]. *Muy Saludable*. 2017.

Karibasappa G, Nagesh L, Sujatha B. Assessment of microbial contamination of toothbrush head: An in vitro study. *Indian Journal of Dental Research* [Internet]. 2011;22(1):2.

Komiyama E, Back-Brito G, Balducci I, Koga-Ito C. Evaluation of alternative methods for the disinfection of toothbrushes. *Brazilian Oral Research* [Internet]. 2010;24(1):28-33.

Konidala U, Nuvvula S, Mohapatra A, Nirmala S. Efficacy of various disinfectants on microbially contaminated toothbrushes due to brushing. *Contemporary Clinical Dentistry*. 2011, Oct; 2(4): 302-307.

Lafaurie GI, Aya MR, Arboleda S, Escalante A, Castillo DM, Millán LV, Calderon JL, Ruiz BN. Eficacia desinfectante del ácido hipocloroso sobre cepas con poder patogénico de cavidad oral. *Revista Colombiana de Investigación en Odontología*. 1:3-11, 2009.

Macari S, Nelson-Filho P, Faria G, Assed S, Ito IY. Microbial contamination of toothbrushes and their decontamination. *Pediatr Dent*. 2000; 22(5):381-4.

Martínez López, C., Forguione Pérez, W., Herra Sandoval, L., Anaya Lastre, J., Plarta Rincón, A., Prada Plata, et al., (2010). Soluciones de uso común en el hogar como alternativa para desinfectar el cepillo dental: un estudio in vitro. *UstaSalud*, [online] 9(2), p.75.

McCarthy, C., Snyder, M. and Parker, R. (1965). the indigenous oral flora of man. i. the newborn to the 1-year-old infant. *Archives of Oral Biology*, [online] 10(1), pp.61-70. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14262161>

Morris D, Goldschmidt M, Keene H, Cron S. Microbial Contamination of Power Toothbrushes: A Comparison of Solid-Head Versus Hollow-Head Designs. *Journal Of Dental Hygiene*. 2014, Aug; 88(4): 237-242.

Nápoles González Isidro de Jesús, Fernández Collazo María Elena, Jiménez Beato Patricia. Evolución histórica del cepillo dental. Rev Cubana Estomatol [Internet]. 2015 Jun; 52(2):208-216.

Penick C. Power toothbrushes: a critical review. International Journal of Dental Hygiene. 2004;2(1):40-44.

Ribeiro A, Pinho C. Revista estomatologica Peruana [Internet]. Visiondental.pe. 2011.

Sammons R, Kaur D, Neal P. Bacterial survival and biofilm formation on conventional and antibacterial toothbrushes. Biofilms. 2004;1(2):123-130.

Sato S, Pedrazzi V, Guimaraes LE, Panzeri H, Ferreira del Albuquerque R, Ito IY. Antimicrobial spray for toothbrush disinfection: An in vivo evaluation. Quintessence Int 2005;36:812-6.

Sconyers J, Crawford J, Moriarty J. Relationship of Bacteremia to Toothbrushing in Patients with Periodontitis. The Journal of the American Dental Association.1973;87(3):616-622.

Svanberg M. Contamination of toothpaste and toothbrush by Streptococcus mutans. European Journal of Oral Sciences. 1978;86(5):412-414.

Taji S.S, Rogers A. The microbial contamination of toothbrushes. A pilot study. Australian Dental Journal.1998;43(2):128-130.

Taji S.S and A. H. Rogers. The microbial contamination of toothbrushes. A pilot study. Australian Dental Journal, vol. 43, no. 2, pp. 128–130, 1998.

Voelker M, Bayne S, Liu Y, Walker M. Catalogue of Tooth Brush Head Designs. Journal of Dental Hygiene. 2013.

Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. N Engl J Med. 320: 365-76, 1989.

Wilkins E. Clinical practice of the dental hygienist. 10th ed. Philadelphia, Pa.: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins; 2009.

Yankel SL, Emling RC. Efficacy of chewing gum in preventing extrinsic tooth staining. J Clin Dent 1997;8:169-72.

Zentralbl. The significance of the contamination of dental care anieles. Bakteriol MikrobiolHyg 1989; 187: 337-364.