

Universidad de Costa Rica  
Ciudad Universitaria Rodrigo Facio Brenes  
Facultad de Odontología

Seminario de graduación

**“Análisis de la contaminación y desinfección de cepillos dentales con  
microorganismos. In Vitro”**

Director:

Dr. Joseph Ulate Jiménez

Investigador asociado:

Dr. Norman Rojas

Sustentantes del seminario de graduación:

Mónica Cortés Mondragón	A72113
María Fernanda Muñoz Miranda	A94387
Stephany Palacios Rodríguez	B04699
Glenda Sánchez Salas	A95810

San Jose, Costa Rica

Año 2016



**HOJA DE APROBACIÓN  
MEMORIA  
SEMINARIO DE GRADUACIÓN**

Nombre del Proyecto:

**“Análisis de la contaminación y desinfección de cepillos dentales con microorganismos. In Vitro”**

Sustentantes:

Fecha: 5 de Diciembre del 2016

María Fernanda Muñoz Miranda

A94387

Glenda Sánchez Salas

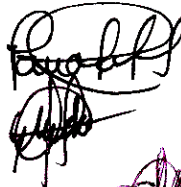
A95810

Stephany Palacios Rodríguez

B04699

Mónica Cortés Mondragón

A72113



Mónica Mondragón

Miembros del Tribunal

Nombre:

Firma:

Joseph Olate Jiménez  
Guillermo Knudsen  
David Lapante  
Tania V  
Carlos E. Fillo

[Signature]  
[Signature]  
[Signature]  
[Signature]  
[Signature]

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA  
Vicerrectoría de Investigación

Sistema de Bibliotecas, Documentación e Información (SIBDI)

*Autorización para la digitalización, inclusión y publicación de trabajos finales de graduación (TFG) en el acervo digital del Sistema de Bibliotecas, Documentación e Información de la Universidad de Costa Rica (SIBDI-UCR).*

Los abajo firmantes, en su condición de autores del TFG:

\_\_\_\_\_

AUTORIZAMOS de forma gratuita al SIBDI-UCR, a digitalizar e incluir dicho TFG en el acervo digital del SIBDI-UCR y a publicarlo a través de la página web u otro medio electrónico, para ser accedido según lo que el SIBDI defina para su consulta o divulgación. Dicho texto se publicará en formato PDF, o en el formato que en su momento se establezca, de tal forma que el acceso al mismo sea libre y gratuito, permitiendo su consulta e impresión, pero no su modificación. Los autores del TFG, garantizan al SIBDI-UCR que la tesis es el trabajo original que sirvió para la obtención de su Título, que no infringe ni violenta ningún derecho de terceros.

Lic., Licda. \_\_\_\_\_ # cédula \_\_\_\_\_

Domicilio: \_\_\_\_\_

Firma \_\_\_\_\_, Fecha: \_\_\_\_\_

Lic., Licda. \_\_\_\_\_ # cédula \_\_\_\_\_

Domicilio: \_\_\_\_\_

Firma \_\_\_\_\_, Fecha: \_\_\_\_\_

Lic., Licda. \_\_\_\_\_ # cédula \_\_\_\_\_

Domicilio: \_\_\_\_\_

Firma \_\_\_\_\_, Fecha: \_\_\_\_\_

Lic., Licda. \_\_\_\_\_ # cédula \_\_\_\_\_

Domicilio: \_\_\_\_\_

Firma \_\_\_\_\_, Fecha: \_\_\_\_\_

Lic., Licda. \_\_\_\_\_ # cédula \_\_\_\_\_

Domicilio: \_\_\_\_\_

Firma \_\_\_\_\_, Fecha: \_\_\_\_\_

-----  
*Para uso interno. Número de tesis:* \_\_\_\_\_

## **DEDICATORIA**

Le dedico este proyecto, primeramente, a Dios, quien ha sido mi fuerza en este largo trayecto; a mi mamá, que con valentía accedió a ser mi primer paciente a pesar de temerle a los odontólogos y es quien me ha enseñado a luchar por lo que quiero; a mi papá, que trabajando diariamente costó mi carrera y me ha brindado su apoyo incondicional. También lo dedico a mis hermanas, por permanecer a mi lado durante todos estos años, y a las doctoras Patricia Montero y Ana Isabel Villalobos, que fueron como mis mamás en la U; a los amigos y compañeros que se convirtieron en mi familia y estuvieron a mi lado en los días buenos y, sobre todo, en los malos; a cada uno de los docentes que ayudó en mi formación académica y a los administrativos que facilitaron mi paso por la facultad. Por último y no menos importante, al Dr. Joseph Ulate, por guiarnos en este proyecto y por la paciencia brindada.

**Glenda Sánchez Salas**

Primero que todo, gracias a Dios por darme siempre la fuerza para continuar y la sabiduría para afrontar las situaciones difíciles. A mis padres, quienes soportaron mis crisis y me apoyaron en todo momento durante estos años; por sus consejos, por darme los recursos necesarios para poder estudiar y por luchar día a día para hacer posible que yo escalara este peldaño. Agradezco a mis profesores porque siempre quisieron hacer de

nosotros buenos profesionales y, finalmente, al Dr. Joseph Ulate, quien ha sido parte de mi formación desde el inicio de la carrera hasta este proyecto final.

**María Fernanda Muñoz Miranda**

Le dedico este proyecto más que a nadie a mi mamá, que no solo ha sido la fuerza, sino la inspiración y aliento que me han hecho seguir adelante en este largo camino que se acerca a una nueva etapa. Sin su mano cariñosa, sus palabras reconfortantes y su sostén, ninguno de mis proyectos y mis esfuerzos habría rendido fruto. Mi dedicatoria y agradecimiento también a mis compañeros y compañeras, quienes son el impulso diario cuando el camino se hace empinado. Han sido, a lo largo de estos años, la ayuda idónea, el oído más comprensivo, el momento más ameno y muchas veces la motivación para emprender la marcha cuando parece que la corriente va en contra. A mi amiga Karen Verónica Flores, quien ha tenido una fe inmensa en mi capacidad, más de la que tuve yo en muchos momentos, y quien ha querido compartir a mi lado, sin ningún otro interés más que mi alegría, los momentos de triunfo junto con los más complicados. A mis instructores, por inspirarme y llevarme de la mano durante estos años de evolución, especialmente aquellos que, más que maestros, se convirtieron en modelos.

**Mónica Cortés Mondragón**

Esta dedicatoria va dirigida, en primer lugar, hacia Dios, en quien me he apoyado siempre. También a mis padres y abuelos, quienes han estado a mi lado a pesar de las circunstancias, siempre incondicionalmente, aun cuando las cosas se ponen difíciles. Agradezco a cada persona que, de una u otra manera, quizás sin darse cuenta, me ayudó. El camino es largo pero siempre hay personas buenas, compañeros, profesores, y en este caso al Dr Joseph Ulate quien nos ha ayudado mucho con el proyecto.

**Stephany Palacios Rodríguez**

## **RECONOCIMIENTOS**

El presente estudio se ha desarrollado gracias a la colaboración de grandes profesionales, los cuales mencionamos a continuación:

El tutor de este proyecto, el Dr. Joseph Ulate Jiménez, quien con sus conocimientos, dedicación y liderazgo hizo posible la realización de este trabajo.

El Dr. Norman Rojas Campos y su equipo de Laboratorio de Bacteriología Médica de la Facultad de Microbiología de la UCR, quienes colaboraron con la manipulación y el análisis directo de las muestras a nivel de laboratorio.

La M.Sc. Jaqueline Castillo Rivas, quien nos brindó el soporte estadístico y gracias a quien fue posible obtener los resultados de la investigación y la interpretación de los mismos en colaboración con el Dr. Joseph Ulate Jiménez.

Agradecemos enormemente a todos ellos, ya que sin su colaboración y el aporte de conocimientos esta investigación no hubiese sido posible, ni se hubieran obtenido los resultados de manera exitosa.

27 de noviembre de 2016

Universidad de Costa Rica  
Tribunal de Trabajos Finales de Graduación  
Presente

La suscrita, Karol Tatiana Barrantes Centeno, cédula de identidad número 113290984, profesional en Filología, hace constar que revisó el documento denominado **“Análisis de la contaminación y desinfección de cepillos dentales con microorganismos. In Vitro”** para optar por el grado de **Licenciatura en Odontología**, de las estudiantes **Mónica Cortés Mondragón, María Fernanda Muñoz Miranda, Stephany Palacios Rodríguez y Glenda Sánchez Salas**, al cual se le aplicaron las revisiones y observaciones relacionadas con aspectos de construcción gramatical, ortografía, redacción, entre otros.

Dado lo anterior, certifico que el documento contiene las observaciones y correcciones solicitadas quedando de conformidad con lo pactado.

Atentamente,



**Karol Tatiana Barrantes Centeno**

**COLYPRO 67890**



## INDICE GENERAL

CAPÍTULO I .....	1
1.1. Justificación .....	2
1.2. Planteamiento del problema .....	2
1.3. Antecedentes del proyecto .....	2
1.4. Objetivos .....	5
1.4.1 Objetivo general .....	5
1.4.2 Objetivos específicos .....	5
CAPÍTULO II .....	6
2.1 Cepillos dentales .....	7
2.1.1 Historia del Cepillo Dental .....	7
2.1.2 Actualidad del cepillo dental: Características, materiales y elección del mismo. ....	11
2.1.3 Tipos de cepillo dental .....	15
2.1.4 Colgate 360° .....	17
2.2 Métodos de desinfección .....	18
2.2.1 Definiciones .....	18
2.2.2 Técnicas de desinfección .....	21
2.2.2.1 Desinfección térmica .....	22
2.2.2.2 Desinfección química .....	22
CAPÍTULO III .....	31
Métodos de Trabajo .....	32
3.1 Materiales .....	33
3.1.1 Caldo nutritivo: NB 1/500 .....	33
3.1.2 Agar nutritivo (ATS) .....	34
3.1.3 Placas agar. (ATS) .....	34
3.1.4 Caldo SCDLP (neutralizante) .....	35
3.1.6 Otros .....	35
3.3 Preparación del inóculo .....	36
3.4 Inoculación de las muestras .....	37
3.5 Incubación de las muestras .....	39

3.6 Recuperación de bacterias de las muestras .....	39
3.6.1 Pruebas de especímenes inmediatamente después de la inoculación.....	39
3.6.2 Especímenes después de la incubación .....	41
3.7 Modificaciones .....	43
Receta ajustada a 250 mL.....	43
CAPÍTULO IV.....	44
Análisis estadístico.....	45
Jonckheere-Terpstra Test(a).....	45
ANOVA Ln(UFC) .....	46
4.2 Resultados y discusión .....	47
4.2.1 Resultados .....	47
4.2.2 Discusión .....	48
CAPÍTULO V.....	51
5.1 Conclusiones.....	52
CAPITULO VI.....	53
6.1 Cronograma de actividades .....	54
6.2 Factores facilitadores. Obstáculos y dificultades .....	57
6.2.1 Factores facilitadores .....	57
6.2.2 Obstáculos y dificultades .....	57

## ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Figura 1. Instrumento Rudimentario de Higiene Oral.....	8
Figura 2. Miswaak.....	9
Figura 3. Miracle Toothbrush.....	11
Figura 4. Diversos cepillos dentales en la actualidad.....	13
Figura 5. Sulcabrush.....	16
Figura 6. Cepillo Colgate 360°.....	18
Figura 7. Materiales.....	38
Figura 8. Inoculación de muestras.....	39
Figura 9. Inoculación de controles.....	39
Figura 10. Recuperación de bacterias.....	42
Figura 11. Recuento de colonias .....	43

## RESUMEN

El control de la placa dentobacteriana ha sido importante desde épocas muy antiguas, razón por la que se han desarrollado, a lo largo de la historia, diversos métodos para lograr la limpieza más adecuada de la cavidad oral.

El cepillo de dientes se ha empleado tradicionalmente en dicho proceso y, por lo tanto, el análisis de la desinfección de éste para prolongar su vida útil ha sido muy importante.

El presente estudio se realizó de manera *in vitro* en dos etapas, a saber: inoculación de las muestras y recuperación bacteriana.

Primera etapa:

Para la determinación de la tasa de recuperación, se procedió a la inoculación de las muestras con bacterias, agregándoles neutralizante de forma inmediata; posteriormente, se tomó una alícuota de 1 mL, que fue cultivada sobre una caja Petri e incubado por 24 horas a 35°C, de manera que se logró determinar la tasa de recuperación bacteriana así como la viabilidad del inóculo recién preparado.

Para realizar la inoculación de prueba, los cepillos dentales fueron tratados con los desinfectantes seleccionados y se dejaron secar; después, se les agregó el inóculo y volvieron a ser expuestos al proceso de secado, tras el cual se incubaron dichas muestras por un periodo de 24 a 35°C.

Para los controles se realizaron dos muestras, a una se le agregó inóculo y desinfectante y a la otra no se le agregó nada. Ambos cepillos dentales fueron tratados bajo las mismas condiciones que los de prueba.

Segunda Etapa:

Se agregaron a las muestras incubadas por 24 horas, 10 mL de neutralizante, se agitó vigorosamente y se procedió a colocar directamente 1 mL de esta solución en un medio de cultivo; a la otra parte de la solución se le realizó diluciones y se colocó 1 mL de cada dilución en una placa, las cuales fueron incubadas por 24 horas.

Por último, se realizó el recuento, para lo cual se tomaron las placas con presencia de colonias bacterianas importantes, dejando por fuera aquellas con menos de 30 colonias o más de 300. De esta manera, se eligieron las muestras más representativas y fáciles de contabilizar.

## CAPÍTULO I

### **1.1. Justificación**

Analizar cuáles formas de desinfección del cepillo dental son las más favorables para reducir el crecimiento de microorganismos, ya que se podrían proponer estrategias para disminuir la infección cruzada y reinfección de la cavidad oral. Así mismo, el trabajo podría ser una guía valiosa para ayudar a los grupos sociales con mayores limitaciones económicas y que no pueden cambiar el cepillo constantemente.

### **1.2. Planteamiento del problema**

Existe un riesgo de infección cruzada y reinfección debido a la presencia de microorganismos en cepillos dentales usados. A pesar de que se recomienda cambiar el cepillo regularmente, muchos pacientes presentan problemas económicos que les impiden seguir dicha recomendación. Por lo anterior, es importante investigar qué formas de desinfección del cepillo dental son las idóneas para limitar el crecimiento de microorganismos.

### **1.3. Antecedentes del proyecto**

Diversas investigaciones han estudiado la contaminación de los cepillos dentales con organismos cariogénicos y periodontopatogénicos. Se sabe que, a partir del primer uso del cepillo dental, éste es colonizado por microorganismos de la cavidad oral, tales como *Streptococcus mutans*,

*Actinobacillus actinomycetemcomitans* y *Candida albicans*; así como bacterias del medio ambiente donde se guarda el cepillo, como la *Escherichia coli*.

Lo anterior puede diferir entre distintos cepillos, no solo por el material de fabricación y anatomía de las cerdas, sino también por su forma de almacenamiento y desinfección. En el año 2007, Aysegül y otros compararon el efecto de la desinfección por medio de inmersión en clorhexidina o spray de la misma solución sobre la concentración de *S. mutans*, esto en cepillos dentales utilizados por 5 días. Los autores demostraron que ambas formas de desinfección son efectivas.

En otro estudio, llevado a cabo en el año 2009, Balappanavar y sus colaboradores investigaron los efectos producidos sobre las colonias de *S. mutans* tras la inmersión de los cepillos por 12 horas en soluciones de clorhexidina, Azadirachta indica, Triclosan e hipoclorito de sodio. El estudio demostró que todas las soluciones anteriores tenían un efecto positivo reduciendo la contaminación de los cepillos dentales.

Actualmente, se están introduciendo en el mercado dispositivos para la desinfección de cepillos dentales, como el Steripod, sin embargo, en los motores de búsqueda de literatura angloparlante, no se encuentran estudios independientes que evalúen la eficacia de estos dispositivos. Por otra parte, la mayoría de los artículos publicados evalúa únicamente el efecto sobre el *S. mutans*, dejando de lado los otros patógenos mencionados en este texto.

En la segunda etapa del proyecto, se realizarán pruebas con diferentes sustancias desinfectantes y se depurará el método al utilizar una



norma ISO para la desinfección de superficies, en este caso cepillos dentales, en un ambiente in-vitro, donde se pueden controlar las variables que se presentaron durante la primera etapa.

## **1. 4. Objetivos**

### 1.4.1 Objetivo general

Analizar la colonización bacteriana presente en cepillos dentales luego de utilizar diferentes sustancias para su desinfección, por medio del cultivo de un inóculo de bacterias expuesto a los desinfectantes sobre los cepillos dentales, por un período de 24 horas, con el fin de determinar cuál de los desinfectantes probados tiene la mayor capacidad de desinfección.

### 1.4.2 Objetivos específicos

1. Determinar el grado de desinfección de los cepillos dentales utilizando técnica de inmersión en enjuague con cloruro de cetilpiridinio.
2. Determinar el grado de desinfección de los cepillos dentales utilizando técnica de inmersión en gluconato de clorhexidina al 0,12%.
3. Determinar el grado de desinfección de los cepillos dentales utilizando técnica de inmersión en solución alcohólica al 70°.

## **CAPÍTULO II**

## **2.1 Cepillos dentales**

### **2.1.1 Historia del Cepillo Dental**

La higiene bucal proviene de épocas muy antiguas en las que el ser humano comenzó a buscar algún método para limar las superficies dentales. En la era primitiva, el hombre utilizaba sus uñas o pequeños fragmentos de madera, mientras que ya en la era prehispánica los indígenas utilizaban la raíz de una planta o se frotaban los dientes con el dedo.<sup>1</sup>

Las personas se encargaron de diseñar diversas maneras arcaicas para llevar a cabo la limpieza dental y algunos instrumentos que datan de antes del 3000 a.C., según los descubrimientos científicos y arqueológicos de nuestro tiempo, han sido hallados en distintos sitios. Se encontraron, en pirámides egipcias y entre algunas tribus de nativos africanos y australianos, diversos artefactos empleados en mantener la higiene oral de manera rudimentaria.<sup>1</sup>

Era común el uso de ramas de diversas hierbas o animales atados a estacas de madera que funcionaban a manera de cepillos dentales.<sup>1</sup> También se construían machacando ramas o cortezas de árboles para conseguir un material más blando que fuera moldeable, de manera que en uno de sus lados quedaba una estructura que no maltrataba la encía y cuyo aspecto filamentosos lograba la higiene oral (Figura 1).<sup>1</sup>



Figura 1. Instrumento rudimentario de higiene oral

El paso del tiempo permitiría perfeccionar los diferentes aditamentos de higiene. Destaca Aristóteles, que recomendaba la utilización de lino para la limpieza dental. No sería, sin embargo, sino hasta en 1498 cuando se crearía el primer cepillo de dientes, hecho a base de pelo de cerdo.<sup>2</sup> El acontecimiento tuvo lugar en China, cuando un emperador decidió colocar el pelo en un hueso,<sup>1</sup> dando origen al cepillo dental de cerdas más antiguo y semejante al que poseemos actualmente.

Este instrumento tenía un mango de hueso con hoyos para la colocación de las cerdas naturales de porcinos, las cuales se conservaban en su sitio con alambres; éstas, a su vez, eran extraídas manualmente del cuello de cerdos que vivían en los climas más fríos de Siberia y China, ya que las bajas temperaturas hacían que el pelaje de estos animales creciera con mayor resistencia.<sup>1</sup>

El *miswak*, traducido como “palito de morder”, es la utilización de varias plantas específicas, las cuales son mascadas hasta obtener una forma de cepillo, y ha sido utilizado por muchísimas culturas alrededor del mundo (Figura 2). Estos instrumentos tenían, además, un significado social y religioso en la higiene oral y aún en artículos de 1990 se puede apreciar cómo y en qué casos se recomienda su uso. Existen diversos tipos de *miswak*, entre los que destacan lo contruidos a base de árbol de limón, de

naranja y de *arak*, conocido en el Oriente Medio como “árbol de cepillo dental”. Existen estudios que destacan su importancia química, religiosa y el efecto de sus componentes dentro de la cavidad oral.<sup>3</sup>



Figura 2. Miswak

La salida del cepillo dental arcaico de las regiones asiáticas data del 1600, cuando viajeros europeos lo introdujeron en sus tierras pero utilizando cerdas más suaves que las descubiertas en sus viajes; sin embargo, todavía los habitantes europeos no tenían mucho interés en su higiene oral y son estas expediciones a Asia las que empiezan a generar interés y hasta penalización a quienes no la practicaban. Entre los siglos XVII y XVIII, Pierre Fauchard recomendó cambiar la técnica del cepillo por una esponja natural, que era menos agresiva con los tejidos blandos de la cavidad en comparación con el pelo de animal.<sup>1</sup>

Las innovaciones continuaron y, en el siglo XIX, Louis Pasteur expuso su teoría sobre los gérmenes. Después de los descubrimientos realizados por este científico, los odontólogos comprobaron que todos los cepillos de pelo animal conservaban la humedad por mucho tiempo y acababan acumulando bacterias y hongos microscópicos.<sup>1</sup> Además, los arcaicos métodos de desinfección de la época impedían mantener la característica firmeza de las

cerdas, la cual, por su parte, ya era un problema, pues se ha demostrado que generaba laceraciones y lesiones en la encía y el resto de tejidos blandos de la cavidad oral.<sup>1</sup>

Mediante prueba y error con distintos materiales, se empezaron a fabricar cepillos dentales en masa para el mercado mundial en 1885, pero no fue sino hasta los años treinta, 1937 específicamente, tras la invención del nylon por los Laboratorios Du Pont, que se pudieron solventar los problemas que generaba el pelo de animal. Es gracias a estos avances que Weco Products Company diseña el primer cepillo de dientes con cerdas artificiales, llamado el Miracle tuft Toothbrush (Figura 3), creación del Dr. West.<sup>4</sup>

Esta misma compañía se encargó, durante la primera mitad del siglo XX, de perfeccionar el material y las diversas opciones en cuanto a grosores y dureza de los diversos cepillos del mercado.<sup>1</sup> La empresa se encargó de destacar las numerosas ventajas del nylon sobre las cerdas de origen animal, aduciendo, por ejemplo, que el nylon no se desprendía con facilidad pues las cerdas quedaban bien sujetas al mango del cepillo<sup>1</sup>.

Durante la Segunda Guerra Mundial, Weco Products Company se encargó de promover el uso del cepillo dental en la armada y así comenzó a tener éxito en el mercado. En 1950, Du Pont mejoró sus cepillos proveyéndolos de unas nuevas cerdas de nylon más suaves, ya que al inicio eran tan duras que los odontólogos se negaban a recomendarlos. Para inicios de la década de los 50 se había perfeccionado ya un nylon blando, que fue presentado con el nombre de cepillo “Dental park”.<sup>1</sup>



Figura 3. Miracle Toothbrush

Es importante notar como el uso de utensilios de limpieza se remonta a épocas muy antiguas, así como la necesidad de mejorar estos y las técnicas de fabricación hasta llegar a lo que actualmente conocemos.

### 2.1.2 Actualidad del cepillo dental: Características, materiales y elección del mismo.

En la actualidad, los cepillos dentales se elaboran con plástico para el mango y con cerdas de nylon o de nylon con poliéster. Se fabrican en diferentes tamaños (grande, mediano y pequeño) con el fin de mejorar la adaptación a la anatomía normal de la persona<sup>6</sup>.

Difieren también en dureza o textura y se clasifican en duros, medios y blandos. Al día de hoy, se han fabricado nuevas formas, diámetros y texturas de cerdas y distintos cepillos para cada una de estas variables; algunos estudios han documentado mayor eficacia en cepillos cuyas cerdas son redondeadas en forma de pluma o diamante, en comparación con las redondeadas estándar.<sup>6</sup>



El mango de los cepillos también ha sufrido una serie de modificaciones, se han introducido incrustaciones o indentaciones triangulares a los lados para un mejor agarre, una “posición de pulgar” en la parte trasera del mango para más comodidad y varios dobleces angulados para permitir un mejor acceso alrededor y dentro de la boca. También conocemos mangos de madera, de resina y cerdas naturales, así como aquellos generados con materiales naturales y orgánicos.<sup>6</sup>

Se presenta una infinidad de opciones en el mercado y diversas casas comerciales se encargan de brindar cepillos dentales nuevos cada día, con características únicas que favorecen la higiene bucodental de una u otra manera, centrándose cada uno en varios aspectos de interés para el paciente.

Además del cepillo convencional, existen elementos más sofisticados para la higiene oral, como los cepillos eléctricos, que se aprovechan de la tecnología para ofrecer un producto único y diferente, que facilita la remoción de placa dentobacteriana (Figura 4).



Figura 4. Diversos cepillos dentales en la actualidad

Los cepillos dentales que se emplean actualmente, en su gran mayoría, son elaborados tomando en cuenta variables como el diámetro, el tamaño de las cerdas, el largo del cepillo, la forma, grosor y angulación de su parte activa; además, se incluyen características como el número de cerdas y la orientación que éstas han de tomar.<sup>7</sup>

Con respecto al tipo de cabezal, los cepillos se pueden clasificar en:<sup>5</sup>

Diamante: permite que el cepillo llegue a la profundidad de la cavidad.

Ovalado: permite un acceso sin aristas, para evitar que se lesionen los tejidos blandos.

Rectangular: permite una mayor superficie con más cerdas.

De acuerdo con las cerdas, se clasifican según la longitud y su forma:<sup>5</sup>

Igual longitud: limpieza entre todas las superficies.

Diferentes longitudes: limpieza entre muchos dientes.

Perpendiculares: limpieza de todas la superficies.

Oblicuas divergentes: limpieza del margen gingival.

Oblicuas convergentes: limpieza entre dientes y encías.

Rectas: limpieza simple.

Espiral: remoción efectiva del biofilm dental.

Además, las cerdas son las que clasifican los cepillos dentales actuales en suaves, medios o duros, donde los más suaves son los recomendados para aquellas personas que presentan enfermedades gingivales; sin embargo, los estudios recientes recomiendan las cerdas

suaves para todos los pacientes, independientemente de que se encuentran sanos o enfermos.

Es importante tener en cuenta que no existe una estandarización sobre el etiquetado de la textura, sino que cada fabricante etiqueta los cepillos de acuerdo con su criterio, razón por la que el grado suave de una casa comercial puede ser más rígido que el medio de otra.<sup>5</sup>

Otra de las clasificaciones se hace tomando en cuenta la angulación del mango: <sup>5</sup>

Recto: Mantiene una línea entre la mano y el cuello.

Arco quebrado y continuo: el cepillo llega hasta las profundidades sin forzar labios.

Según otras características presentes en el mango, se pueden clasificar los cepillos dentales en: <sup>5</sup>

Anatómico: Mejor adaptación.

Simple: Simple manipulación.

La elección de un cepillo dental debe cumplir, por lo general, con las mismas características: la parte activa debe ser pequeña, de aproximadamente 30 mm de largo, y debe ser angulada a manera de arco; el mango debe ser largo y ergonómico; las cerdas deben ser suaves y finas, blandas, con un extremo y puntas redondeadas. Se considera ideal la presencia de múltiples penachos ubicados a una misma altura. Además, se busca que el cabezal sea ovalado y con sus bordes redondeados.<sup>8-9</sup> No obstante, es una elección que se debe adaptar a la necesidad de cada persona.

### **2.1.3 Tipos de cepillo dental**

Cepillos convencionales: son aquellos que cuentan con cerdas en tres o cuatro filas aproximadamente.<sup>6</sup> Estos son los cepillos de uso común y los que se recomiendan para la higiene oral, además de ser el grupo que presenta mayor variabilidad y opciones en el mercado.

Cepillos eléctricos: este tipo fue introducido comercialmente en 1960.<sup>7</sup> Generalmente, se comercializan diversos tipos y han obtenido un gran auge en la actualidad debido a que facilitan la actividad mecánica de la higiene oral, pues cuentan con varios movimientos programables (horizontal, vertical, vibraciones). Además de mejorar la técnica manual convencional, han servido ahora para los pacientes que presentan alguna deficiencia motora o una discapacidad mental, ya que facilita el acceso al paciente o al encargado de realizar la higiene oral.<sup>6</sup> La motivación por mejorar su higiene oral también ha sido un factor influyente para que los pacientes compren estos cepillos.

Cepillos Interdentales: en esta clasificación se encuentran los cepillos unipenachos, que son aquellos utilizados para la higiene de las zonas interproximales<sup>6</sup> en pacientes que presentan espacios lo suficientemente grandes para servir de acumulación de placa dentobacteriana.

Sulcabrush: también llamado cepillo periodontal o cepillo crevicular, es el que se recomienda en pacientes con enfermedad periodontal, debido a que cuenta con solamente dos cerdas. Este tipo ayuda al tratamiento de la inflamación gingival y las encías delgadas, además de funcionar

adecuadamente en la higiene del paciente con bolsas periodontales profundas<sup>6</sup> (Figura 5).



Figura 5. Sulcabrush

Las distintas categorías de cepillos dentales que se han mencionado representan las más utilizadas en la práctica clínica y las que más se comercializan en el mercado; sin embargo, en la actualidad también encontramos cepillos masticables, una opción creada bajo la idea de poder llevar a cabo la higiene oral en cualquier lugar y momento. De hecho, en el Reino Unido, estos cepillos han sido recomendados para pacientes con discapacidades motoras por la National Multiple Sclerosis Society. Además, destacan las alternativas naturales y lo que se conoce como el cepillo dental ecológico, en auge actualmente, que no es más que una variación del utensilio común.

Es importante mencionar que todos los cepillos dentales pasan por pruebas de seguridad y eficacia en las que se evalúa su abrasión, la profundidad de remoción de depósitos, la limpieza de superficies distales, limpieza del margen gingival, eficacia de acceso subgingival, eficacia de acceso interproximal y pulido.

#### **2.1.4 Colgate 360°**

Colgate-Palmolive es una de las casas comerciales que se ha encargado de innovar en productos para la higiene oral y en la actualidad destaca entre las más conocidas globalmente. Para este estudio se utiliza el cepillo Colgate 360° de dicha empresa, debido a que es ampliamente conocido por los pacientes, es el más utilizado por los sujetos que conformaron la muestra del estudio y es fácil de encontrar en los distintos centros de distribución (Figura 6).

El Colgate 360° cuenta con los mecanismos de limpieza que actualmente encontramos en la mayoría de cepillos de las diversas casas comerciales, como lo son: limpiador de lengua y mejillas, cerdas interdentes, ceras de hule y mango de goma y gel para un manejo más eficiente por parte del paciente; además, al no contar con ningún mecanismo extra de limpieza o desinfección que pudiera introducir sesgos en los resultados del proyecto, fue el producto seleccionado para utilizar a lo largo de la investigación.



Figura 6. Cepillo Colgate 360

## 2.2 Métodos de desinfección

### 2.2.1 Definiciones

La limpieza y desinfección son procedimientos que permiten disminuir o evitar la proliferación de organismos, para lo que se emplean agentes que cumplen diferentes funciones.

#### Esterilización

La esterilización es definida, según la O.M.S., como el proceso de saneamiento más alto de letalidad y seguridad, que tiene como finalidad la aniquilación de cualquier microorganismo presente en un objeto, sea patógeno o no patógeno, incluidas formas esporuladas, hongos, virus y priones.<sup>8</sup>

Críticos: objetos que entran a cavidades normalmente estériles del organismo. Representan un riesgo alto de infección si están contaminados.<sup>9</sup>

Semicríticos: entran en contacto con piel no intacta o con mucosas. Deben estar libres de toda forma vegetativa de los microorganismos y preferiblemente esterilizados. En caso de que la esterilización no sea posible,

deben recibir, al menos, un procedimiento de desinfección de alto nivel. Ejemplo: básicos, cubetas, sondas, cepillos dentales.<sup>9</sup>

No Críticos: sólo entran en contacto con la piel sana o no contactan al paciente de manera directa. En general, solo requieren limpieza, secado y, en ocasiones, desinfección de bajo nivel. Ejemplo: esfigmomanómetro, papoose.<sup>9</sup>

### Desinfección

Es la destrucción de microorganismos en objetos inanimados, donde se asegura la eliminación de formas vegetativas y no así la de esporas bacterianas, muchas veces por fallas en los criterios de esterilización. El proceso está generalmente relacionado con el uso de agentes químicos conocidos como desinfectantes, los cuales suelen tener algún grado de selectividad. Otros métodos de desinfección son la filtración, pasteurización y microondas.<sup>8</sup>

#### 1- Pasteurización

Involucra la exposición de líquidos a temperaturas dentro del rango de los 55°C a los 75°C, esto con el fin de remover todas las bacterias vegetativas, si bien las esporas no se ven afectadas por este proceso. La pasteurización se aplica, por ejemplo, a la leche para mantenerla segura y aumentar su duración.<sup>8</sup>

#### 2- Microondas

Otro método de desinfección implica el uso de hornos de microondas u otros más especializados. Estos no funcionan bajo presión, sino que pueden



alcanzar temperaturas cerca del punto de ebullición y se suelen emplear como una alternativa para la desinfección de la basura hospitalaria.<sup>9</sup>

### 3- Métodos Químicos

Se utilizan desinfectantes que son consideradas como sustancias químicas, los cuales se aplican a objetos inanimados y superficies inertes para eliminar microorganismos, exceptuando esporas. Se pueden utilizar distintas sustancias, entre las que se encuentran el Ortolfalehído al 2%, que se utiliza en la desinfección de alto nivel, ya que alquila los componentes celulares y actúa directamente sobre los ácidos nucleicos de micobacterias y virus; el Paraformaldehído que, si bien es de uso restringido a la descontaminación, se desactiva fácilmente en presencia de materia orgánica y es incompatible con otras soluciones desinfectantes como fenoles, agentes oxidantes, amoníaco y soluciones alcalinas.<sup>10</sup>

El Alcohol 70% también es una solución que puede utilizarse como desinfectante y como antiséptico, su mecanismo de acción se basa en la precipitación y desnaturalización de proteínas. Asimismo, se puede utilizar una solución detergente de amonio cuaternario, que son sustancias catiónicas que actúan a nivel de la membrana celular, razón por la que resultan útiles en la limpieza de superficies de ambientes y derrames con sangre.

El peróxido de hidrógeno puede, igualmente, ser utilizado como desinfectante y antiséptico; soluciones al 10 y 25% sirven como agentes esporicidas en la desinfección de materiales especiales. Una última opción es el hipoclorito, el desinfectante más utilizado de este grupo<sup>9-10</sup>.

Estas sustancias se clasifican, según su habilidad para desinfectar, en: alto nivel (elimina todos los agentes excepto las esporas más resistentes), nivel intermedio (elimina todos los agentes excepto las esporas) y las de bajo nivel, que solo son efectivas contra casi todas las bacterias vegetales y los virus con cubierta lipídica.<sup>8-9</sup>

### Asepsia

Describe el proceso por el cual se previene que microorganismos alcancen un ambiente protegido y es aplicado a muchos procedimientos empleados en cuartos de operaciones, en la preparación de agentes terapéuticos o en el laboratorio. Este aplica esterilización y desinfección para proteger el ambiente.<sup>8</sup>

### Antisépticos

Son agentes desinfectantes que pueden utilizarse en superficies del cuerpo para reducir el número de microbiota o agentes contaminantes y, aunque son menos efectivos que los desinfectantes de uso ambiental, tienen menos toxicidad.<sup>8</sup>

## **2.2.2 Técnicas de desinfección**

La Asociación Dental Americana (ADA) recomienda cambiar el cepillo dental en intervalos cortos de tiempo, cada 3-4 meses aproximadamente o después de sufrir infecciones orales; sin embargo, sea por desconocimiento, sea por motivos económicos muchas poblaciones no pueden adquirir un cepillo nuevo con frecuencia, por lo que existen métodos alternativos para

poder desinfectar este dispositivo y no tener que realizar recambios tan frecuentes.<sup>11</sup>

### **2.2.2.1 Desinfección térmica**

El calor constituye el medio más eficaz de desinfección y es utilizado desde miles de años atrás, como se mencionó anteriormente. Por norma general, los desinfectantes químicos deben utilizarse solamente en los casos en que no sea posible una desinfección completa por medio del calor.<sup>12</sup>

El calor actúa sobre la materia orgánica desnaturalizándola y formando una costra de muy difícil eliminación, motivo por el que, previo al tratamiento con calor, se hace necesaria la correcta limpieza.<sup>12</sup>

El agua a temperaturas entre 65°C y 80°C, durante dos minutos como mínimo, es el más eficaz y económico de los desinfectantes que se conocen.<sup>12</sup>

### **2.2.2.2 Desinfección química**

Los antisépticos son sustancias químicas que se aplican sobre los tejidos vivos con la finalidad de destruir o inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos. Por otro lado, un desinfectante es un agente químico que se aplica sobre superficies o materiales inertes e inanimados, esto con el fin de destruir los microorganismos y prevenir las infecciones.<sup>1-3</sup>

Los requisitos que debe reunir un desinfectante presentan ambivalencia, es decir, la sustancia debe ser eficaz para la eliminación de los microorganismos y, a la vez, ser inocuo, no sólo para los objetos tratados

sino también para las personas y el medio ambiente.<sup>9</sup> Algunos ejemplos de desinfección química que se utilizan son:

### Alcohol

Muchos alcoholes han demostrado su efecto antimicrobiano, por ejemplo el alcohol etílico (70-90%) y el alcohol isopropílico (90-95%). Estas sustancias presentan un espectro antimicrobiano contra bacterias vegetativas, virus y fúngicos, sin ser esporicidas; sin embargo, inhiben la germinación de esporas de manera reversible, razón por la que no son recomendadas para la esterilización como si para la desinfección de superficies y piel.<sup>13</sup>

Muchos productos incluyen en sus presentaciones alcohol en bajas concentraciones, tal es el caso de la clorhexidina, la cual permanece en la piel tras la evaporación del alcohol, o el de los emolientes, los cuales disminuyen el tiempo de evaporación del alcohol y aumentan de manera significativa el efecto del producto.

En general, el isopropil posee mejor efecto contra las bacterias y el etanol contra los virus, sin embargo, esto es concentración-dependiente, ya que la actividad antimicrobiana de los alcoholes es más baja en concentraciones inferiores a los 50% y óptima en un rango de 60 a 90%.<sup>13</sup>

### Hipoclorito de sodio

Otro compuesto empleado en la desinfección es el hipoclorito de sodio, utilizado en distintas concentraciones. Los hipocloritos, que son los desinfectantes con cloro más usados, se comercializan en forma líquida (hipoclorito de sodio) y en forma sólida (hipoclorito de calcio). La actividad

antimicrobiana del cloro se atribuye, en gran parte, al hipocloroso no disociado. Esta disociación depende del pH, a medida que este aumenta la actividad microbicida disminuye.<sup>14</sup>

El cloro, que tiene propiedades de blanqueamiento y germicidas, se utiliza normalmente para la desinfección, el saneamiento o para purificar el agua. Los desinfectantes y agentes de saneamiento a base de cloro, al igual que el vinagre acético, se encuentran fácilmente, son baratos, tienen un amplio espectro antimicrobiano y representan un riesgo mínimo para el medio ambiente.

Las soluciones acuosas de cloro tienen una rápida acción bactericida, así como un efecto virulicida, a través de un mecanismo de acción que se basa en la inactivación de las reacciones enzimáticas de ácidos nucleicos y desnaturalización de proteínas de las células bacterianas. La acción microbicida es muy rápida.<sup>14-15</sup>

Cuando se pone en solución, el cloro, que es un agente oxidante, reacciona inmediatamente a los iones metálicos, a varios radicales y a la materia orgánica. Al terminarse esta reacción, la cantidad de cloro que sigue activa rápidamente interactúa con los agentes patógenos en un proceso que resulta desinfectante.<sup>15</sup>

Como se aprecia en el estudio que Campos L. realizara en el 2009, el hipoclorito de sodio al 0.5% es eficaz en la desinfección de un 100% sobre los *S. mutans* y *Candida albicans* después de las 4 semanas de desinfección. Asimismo, Nelson F. determina en el año 2000, por medio de microscopia electrónica, el nivel de contaminación de cepillos dentales por *estreptococo*

*mutans*, tras lo que evalúa la eficacia de dos desinfectantes y concluye que el uso de hipoclorito de sodio al 1% resulta un método eficiente para la desinfección de los cepillos.<sup>14-16</sup>

### Ácido acético

Por otro lado, un desinfectante que ha sido utilizado por su facilidad y precio es el ácido acético al 5% o vinagre blanco de uso casero, el cual ha sido evaluado en varios estudios de desinfección de cepillos dentales. Su efecto antimicrobiano, incluso a concentraciones tan bajas como 5%, ha sido atribuido a la capacidad que tiene para disminuir el pH, tanto intra como extracelularmente, cualidad que le permite alterar el transporte y la integridad de la membrana celular, así como la actividad enzimática, llegando incluso a precipitar las proteínas citoplasmáticas<sup>15-17</sup>.

En el estudio de Herrera y colaboradores, efectuado en el 2012, se inocularon varios cepillos dentales con los microorganismos más frecuentes de la cavidad oral, como *candida albicans*, *streptococos mutans* y *staphylococos aureus*; posteriormente, se procedió a la desinfección de aquellos con el ácido acético y se obtuvieron los resultados. Estos indicaban que, con los métodos evaluados, se logró eliminar cerca del 90% de *S. mutans*, entre el 60 y el 99% de *C. albicans* y cerca del 72,11% de *S. aureus*.<sup>18</sup>

Ryssel H. y colaboradores también reportan en su estudio que el ácido acético, usado como antiséptico local, elimina a los cinco minutos cepas de bacterias Gram negativas, como por ejemplo *Proteus vulgaris*, *P. aeruginosa*

y *Acinetobacter baumannii*; así como cepas Gram positivas, como las de *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis* y *S. aureus*.<sup>17</sup>

Otros estudios, como el de Ainda I. y colaboradores, respaldan la eficacia antimicrobiana del ácido acético, demostrando que el vinagre blanco es más efectivo que el vinagre tinto frente a cepas hospitalarias de *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus* y *E. coli*.<sup>19</sup> Por lo tanto, el uso del ácido acético representa una buena opción como un método económico, de fácil acceso y aplicación para la desinfección de cepillos dentales, sobre todo en poblaciones vulnerables y de bajos recursos económicos.<sup>18</sup>

### Peróxido de hidrógeno

El peróxido de hidrógeno también es utilizado como método de desinfección. Se trata de un líquido incoloro bastante estable, que se comercializa como soluciones acuosas a concentraciones de entre el 3 y el 90%. El contenido de dichas soluciones puede expresarse en porcentaje o en volúmenes. La expresión en volumen se refiere al contenido en oxígeno y se define como el número de veces que un determinado volumen de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> lo contiene.<sup>9</sup>

Su acción bactericida se debe a dos motivos:

- Producción de iones hidroxilo y radicales libres, que actúan oxidando componentes esenciales del microorganismo (lípidos, proteínas y DNA).
- Liberación las catalasas tisulares, que actúan impidiendo la germinación de esporas de anaerobios, como el *Clostridium tetani*. Además, el O<sub>2</sub> liberado durante su descomposición en forma de burbujas favorece la eliminación de detritus celulares, bacterias y tejidos desvitalizados.<sup>9</sup>

En el interior de la bacteria, por acción de la mieloperoxidasa sobre los cloruros y sobre el peróxido de hidrógeno, se forma hipoclorito (presenta poder oxidante y germicida).<sup>9</sup> Este compuesto tiene un amplio espectro de acción, pues es bactericida, bacteriostático o esporicida según la concentración y las condiciones de uso (al 3% es bacteriostático y al 6% bactericida, cuando se encuentra a temperatura ambiente).<sup>9</sup>

Tiene un corto período de acción porque se descompone por las catalasas tisulares, hecho que hace aconsejable su uso en conjunto con otros antisépticos. Es efectivo frente a bacterias, hongos, algunos virus (entre ellos el HIV) y esporas. Los microorganismos anaerobios son incluso más sensibles por no disponer de actividad peroxidasa<sup>9</sup>. En general, presenta mayor poder bactericida frente a Gram negativos que Gram positivos y, frente a hongos, esporas y algunos virus, su acción es un poco más lenta.<sup>9</sup>

### Clorhexidina

En la década de los 40, científicos ingleses que llevaban a cabo una investigación sobre la malaria desarrollaron la clorhexidina. En ese momento los investigadores fueron capaces de desarrollar un grupo de compuestos denominados polibisguanidas, que demostraron tener un amplio espectro antibacteriano y salieron al mercado en 1954 como antisépticos para heridas de la piel; posteriormente comenzó a usarse en medicina y cirugía, tanto para el paciente como para el cirujano.<sup>23</sup>

En odontología, se utilizó inicialmente para desinfección de la boca y endodoncia. El estudio definitivo que introdujo la clorhexidina en el mundo de la periodoncia fue el realizado por Løe y Schiott en 1970. Estos



investigadores demostraron que, tras un enjuague de 60 segundos dos veces al día con una solución de gluconato de clorhexidina al 0,2%, en ausencia de cepillado normal, inhibía la formación de placa y consecuentemente el desarrollo de gingivitis<sup>24</sup>.

Es uno de los desinfectantes más conocidos y más utilizados por los odontólogos. Su espectro antimicrobiano alcanza a bacterias grampositivas y gramnegativas, aunque algunas, como las cepas hospitalarias, pueden ser resistentes.<sup>20</sup> También, es poco soluble en agua, por lo que se usa en forma de sales, algunas de las cuales son solubles con nitratos, sulfatos, carbonatos y fosfatos; es estable a temperatura ambiente y a un pH comprendido entre 5 y 8, pero muy inestable en solución; y es compatible con derivados catiónicos, pero incompatible con tensioactivos aniónicos, algunos compuestos no iónicos y varios colorantes.

Por otro lado, el desinfectante no es esporicida, aunque inhibe el crecimiento de esporas; no actúa sobre los virus sin cubierta, como rotavirus, pero si inactiva virus con cubiertas lipídicas como VIH y herpesvirus; no es tóxica, se han presentado muy pocas reacciones alérgicas y no hay evidencia de carcinogénesis.<sup>21</sup> Además, en solución alcohólica aumenta su eficacia y permanece activo en presencia de jabón, sangre y materia orgánica, aunque su efectividad puede disminuir. Su acción es rápida (dos minutos) y duradera, lo que se debe a su adhesividad tisular.

Este compuesto se utiliza en el lavado de manos, preparación de campo quirúrgico, tratamiento de heridas y quemaduras. En la odontología tiene usos muy importantes a nivel bucal, en lesiones atróficas y erosivas de

la mucosa oral, aftas, úlceras traumáticas, mucositis tras quimio y radioterapia, entre otros. Además, se utiliza como antiséptico en infecciones de orofaringe, en la desinfección de prótesis, férulas y aparatos de ortodoncia; y está indicada en la inhibición de placa dental y periodontal supragingival.<sup>20</sup>

La clorhexidina actúa contra la pared celular de los microorganismos, causándoles alteraciones en toda la movilidad electroforética, con lo que se compromete la integridad de la pared celular y se facilita la liberación de los componentes intracelulares. A bajas concentraciones es bacteriostático y a altas concentraciones es bactericida, ya que produce precipitación del citoplasma.

La clorhexidina se une tanto a los grupos ácidos aniónicos de las glucoproteínas salivales, reduciendo así el grosor de la placa, como a las bacterias salivales, interfiriendo de esta forma su adherencia al diente. La clorhexidina también tiene una acción antiinflamatoria por su poder detergente y antioxidante. Esto lo logra tras inhibir la capacidad de las bacterias para activar el metabolismo oxidativo de los neutrófilos, lo que impide la liberación de enzimas que participan en el proceso inflamatorio.<sup>22</sup>

### Cloruro de Cetilpiridinio

Es una sustancia utilizada para el control de la placa dentobacteriana. Se encuentra dentro de los llamados compuestos de amonio cuaternario y está cargado catatónicamente. Su mecanismo de acción se debe al aumento que provoca en la permeabilidad de la pared bacteriana, favoreciendo la lisis y disminuyendo la capacidad de la bacteria para adherirse a la superficie. Sin

embargo, estudios revelan que es un compuesto de eficacia moderada, reduce la placa bacteriana en un 35% y es eliminado rápidamente de las superficies dentales.<sup>23</sup>

Presenta efectos colaterales indeseables, entre los que se pueden mencionar la tinción de la superficie dental, la sensación de quemazón en la mucosa bucal y la presencia de lesiones ulcerosas.<sup>23</sup>

En pastas dentífricas y colutorios, el cloruro de cetilpiridinio (CPC) se encuentra en una concentración al 0.5%.

## **CAPÍTULO III**

## **Métodos de Trabajo**

Como referencia para la elaboración de un método que permitiera la evaluación del efecto desinfectante de las sustancias seleccionadas sobre una superficie de características similares a las cerdas del cepillo dental, se utilizó la norma ISO 22196-2011 de la International Organization for Standardization. Esta entidad se dedica al desarrollo de normas y métodos estandarizados para la evaluación de productos, procedimientos y servicios en la mayoría de áreas de ciencia, tecnología y negocios.

El uso de esta norma responde a la necesidad y el deseo de utilizar un método referencial estandarizado y reproducible. Además, y después consultar los métodos de evaluación de desinfectantes de otros organismos normalizadores internacionales (como AOAC: Association Of Analytical Communities), surge la necesidad de encontrar un método de referencia que permita llevar a cabo experimentos con cantidades menores de reactivos, de costos más asequibles y que estuvieran disponibles en el laboratorio que iba a realizar las pruebas experimentales (Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica). La norma elegida fue la que se ajustó de mejor manera a los requerimientos planteados.

Por disponibilidad de los reactivos del laboratorio, fue necesario ajustar las preparaciones indicadas en la norma con aquellos de los que se disponía de forma inmediata, evaluando previamente que estos cambios no afectaran el propósito del reactivo modificado.

### 3.1 Materiales

Se describen en este apartado los materiales y métodos indicados textualmente en la norma ISO 22196-2011. Las modificaciones realizadas por disponibilidad del laboratorio a dicho método serán indicadas al final de esta sección.

- Agar ATS (en botella para método de vaciado y tubos)
- Cepas de *E. coli* ATCC 8739 y de *S. aureus* ATCC 6538 (preparación con concentración  $1 \times 10^6$ )
- Agua destilada y desionizada
- Placas Petri
- Pipetas de 10 mL, 400 microlitros
- Puntas para pipetas
- Cámara de flujo laminar
- Incubadora  $35 \pm 1$  °C
- Desinfectantes: clorhexidina al 0.12% (Clorexil, Stein), alcohol al 70°, cloruro de cetilpiridinio (Plax, Colgate-Palmolive)

#### 3.1.1 Caldo nutritivo: NB 1/500

- 3,0 g de extracto de carne
- 10,0 g de peptona
- 5,0 g NaCl en 1 litro de agua destilada

\*\*Diluir 500 veces en agua destilada y ajuste el pH a un valor entre 6,8 - 7,2 con NaOH y/o HCl. Esterilice en autoclave ( $121 \pm 2$ ) °C por al menos 15 min. Si no se usa de manera inmediata, almacene a una temperatura entre los 5°C - 10°C

### **3.1.2 Agar nutritivo (ATS)**

Disuelva 5,0 g de extracto de carne, 10 g de peptona, 5,0 g de NaCl y 15,0 g de agar en 1000 mL de agua destilada. Caliente hasta disolver el agar. Ajuste el pH a un valor entre 7,0 - 7,2 (a 25°C) con NaOH y/o HCl. Esterilice en autoclave a ( $121 \pm 2$ ) °C por al menos 15 min. Si no se usa de manera inmediata, almacene a una temperatura entre los 5°C - 10°C

### **3.1.3 Placas agar. (ATS)**

Disuelva 2,5 g de extracto de levadura, 5,0 g de triptona, 1,0 g de glucosa y 15 g de agar en polvo en 1000 mL en agua destilada. Caliente y remueva hasta disolver. Ajuste el pH a un valor entre 7,0 - 7,2. Esterilice en autoclave a ( $121 \pm 2$ ) °C por al menos 15 min. Si no se usa de manera inmediata, almacene a una temperatura entre los 5°C - 10°C

Agar en tubos inclinados:

Vierta de 6-10 mL de agar nutritivo previamente calentado para disolver en tubos de ensayo. Esterilice (mismas especificaciones) e incline en una gradilla a 15°. Si no se usa de manera inmediata, almacene a una temperatura entre los 5°C - 10°C

\*\* Nunca use ninguno de los medios de cultivo que tengan más de un mes de almacenamiento.

#### **3.1.4 Caldo SCDLP (neutralizante)**

Disuelva 17,0 g de peptona caseína, 3,0 g de peptona de soya, 5,0 g de NaCl, 2,5 g de hidrógeno fosfato disódico, 2,5 g de glucosa y 1,0 g de lecitina en 1000 mL de agua destilada. Remueva y adicione 7,0 g de surfactante no iónico (monooleato de polioxietileno sorbitán). Ajuste el pH a un valor entre 6,8 - 7,0 con NaOH y HCl. Autoclave y almacene según las mismas especificaciones que los medios de cultivo.

Buffer fosfatos:

34 g de dihidrógeno fosfato de potasio en 500 mL de agua destilada. Ajuste el pH a un valor entre 6,8 – 7,0 y añada agua hasta los 1000 mL.

#### **3.1.6 Otros**

- Mechero
- Asa metálica
- Tubos de ensayo
- Gradilla para tubos de ensayo



### **3.2 Procesamiento de las muestras**

Los cepillos serán procesados sin previa preparación. Según las indicaciones de la norma, cada sustancia desinfectante debe ser probada por triplicado. Además, se necesitan tres muestras para probar la viabilidad de las células inmediatamente después de la inoculación y otras tres muestras se utilizarán para medir la viabilidad de las células después del tiempo de incubación establecido. Las pruebas de laboratorio fueron realizadas siguiendo el mismo procedimiento y las mismas condiciones de manejo, con dos tiempos de incubación diferentes en contacto con los microorganismos de prueba (*S. aureus*): 10 minutos y 24 horas

### **3.3 Preparación del inóculo.**

Transferir, con asa estéril proveniente de un cultivo en tubo inclinado que se haya tomado a partir de una cepa, una cantidad de cultivo a un tubo con caldo nutritivo, de manera que se obtenga una concentración entre  $2,5 \times 10^5$  y  $10 \times 10^5$  células/mL (idealmente  $6 \times 10^5$  células/mL). Utilizar esta solución como inóculo de prueba. Si no se utiliza inmediatamente se debe enfriar a 0°C y usarla dentro de las siguientes 2 horas posteriores. El inóculo se preparó tomando una muestra de la cepa *S. aureus* 6538 y haciendo una suspensión 0,5 en la escala McFarland, la que posteriormente fue diluida 1/1000

### 3.4 Inoculación de las muestras.

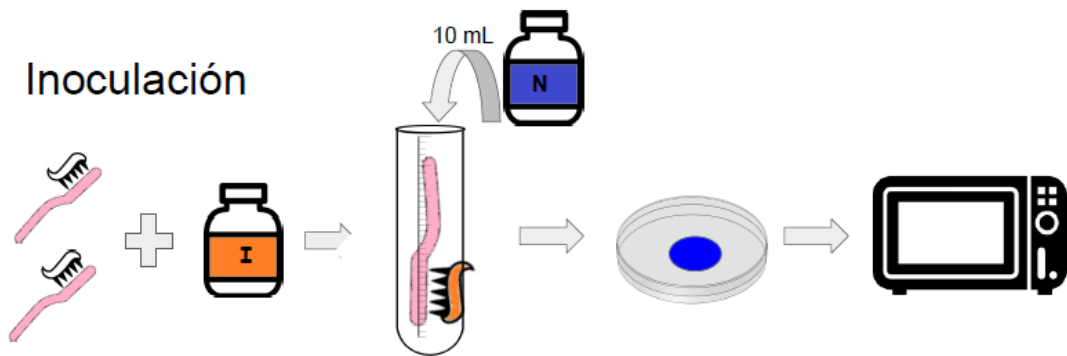
Se colocarán las muestras en tubos estériles con la parte a probar hacia el fondo del tubo. Se debe procurar que el inóculo se esparza de la forma más uniforme posible sobre la superficie. Dejar secar el inóculo de manera que no se contamine con microorganismos ambientales. Si el inóculo es muy líquido y escurre fuera de los bordes de la muestra, se recomienda espesar con agar u algún otro espesante inerte.

Durante el desarrollo de las pruebas de laboratorio, después de ser inoculadas con 400 microlitros del inóculo, las muestras se dejaron en reposo dentro de un tubo estéril por un período de 60 minutos para permitir que éste se secase en contacto con la superficie de prueba.

#### Materiales



Figura 7. Materiales  
Fuente: Cortés, 2016



1. Se inoculan dos muestras on 400 microlitros
2. Se agregan 10 mL de neutralizante y se agita vigorosamente
3. Se toma 1 inóculo de 1ml y se cultiva sobre un petri que se incuba inmediatamente a 35°C por 24 horas
4. Estas bacterias sirven para calcular la tasa de recuperación con el neutralizante que se escogió.

Figura 8. Inoculación muestras  
Fuente: Cortés, 2016

### Inoculación controles

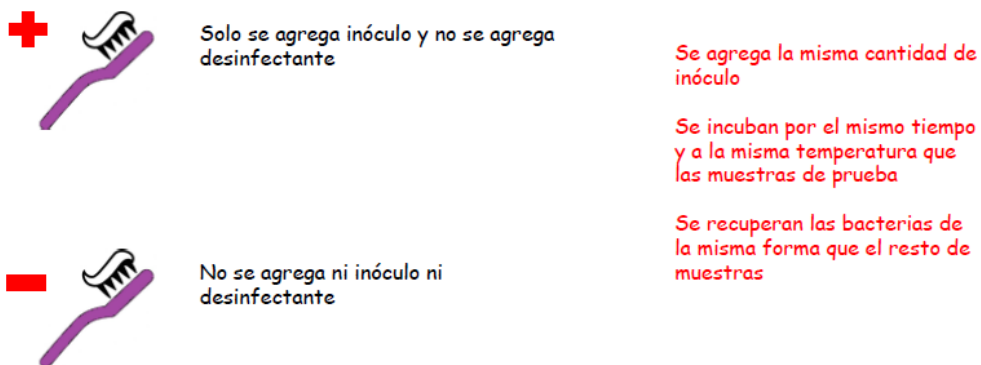


Figura 9. Inoculación controles  
Fuente: Cortés, 2016

### **3.5 Incubación de las muestras**

A menos de que se especifique lo contrario, se incuban las muestras de ensayo inoculadas (incluyendo la mitad de las muestras de ensayo sin tratar) a una temperatura de  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  y a una humedad relativa de no menos del 90% por  $24 \pm 1\text{h}$ . La eficacia antibacteriana de un producto se evalúa con base en la actividad antibacteriana obtenida a partir de la prueba a la temperatura de incubación específica. Se pueden usar otras temperaturas si concuerdan las partes. Si se utiliza una temperatura que no sea  $35 \pm 1^\circ\text{C}$ , se debe incluir en el informe.

NOTA: Si se utilizan temperaturas de incubación de menos de  $35^\circ\text{C}$ , se puede ver reducido el recuento total de bacterias viables. Esto puede afectar a la actividad antibacteriana en comparación con las mediciones llevadas a cabo utilizando una temperatura de incubación de  $35^\circ\text{C}$ . En el desarrollo de las pruebas de laboratorio la temperatura que se utiliza es la indicada por la norma.

### **3.6 Recuperación de bacterias de las muestras**

#### **3.6.1 Pruebas de especímenes inmediatamente después de la inoculación**

Inmediatamente después de la inoculación, se requiere procesar la mitad de las muestras no tratadas (3 muestras) mediante la adición de 10 mL

de cualquiera de SCDL (4.2.3.6) o un neutralizador validado y adecuado para el tubo que contiene el espécimen. Este valor se usará para determinar la tasa de recuperación de las bacterias. Es importante asegurarse de que el neutralizador lava completamente las muestras, lo que se realiza mediante el uso de una pipeta para recoger y liberar el caldo SCDLP al menos cuatro veces.

Se debe tomar una consideración especial para lograr una suficiente recuperación, sobre todo si la viscosidad de inóculo se ha incrementado, en cuyo caso puede ser necesaria una agitación mecánica, tal como "stomaching", agitación (Vórtex). Si éstas muestran una tasa de recuperación equivalente o superior a la obtenida con el método anterior, se pueden usar tales métodos. Si se usa un método de recuperación alternativa, se debe describir en el informe del ensayo.

Por otra parte, si se dificulta recuperar las bacterias con 10 mL del neutralizador debido al tamaño y las características de la muestra, entonces se puede aumentar el volumen de la solución. Si el volumen del neutralizador utilizado es diferente de 10 mL, se debe indicar en el informe de ensayo y tenerlo en cuenta en el cálculo del efecto antibacteriano.

El uso de diferentes métodos de lavado puede afectar la medición de la actividad antibacteriana y deberá discutirse su validez.

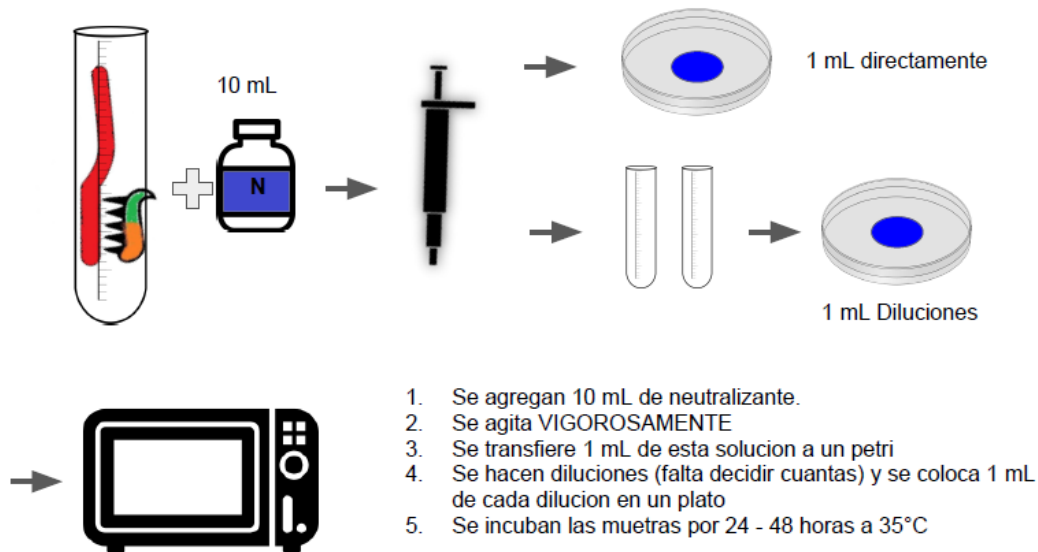


Figura 10. Recuperación de bacterias  
 Fuente: Cortés, 2016

### 3.6.2 Especímenes después de la incubación

Después de la incubación, se deben procesar las muestras de ensayo restantes de acuerdo con el tiempo de incubación establecido. (10 minutos y 24 horas). Inmediatamente después, contar las bacterias recuperadas viables.

### 3.6.3 Determinación de las bacterias viables por el método de cultivo por esparcimiento

Se deben enumerar las bacterias vivas mediante la realización de diluciones 1/10 del SCDLP en solución salina fisiológica. Colocar 1 mL de cada dilución y 1 mL de la SCDLP recuperados del espécimen en medios de cultivo y esparcir de manera homogénea. Dejar que las muestras se sequen e invertirlas para la incubación. Todo debe realizarse en duplicado. Incubar a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 40 - 48h. Durante el desarrollo del procedimiento en el

laboratorio, por disponibilidad de medios de cultivo, se utilizó la técnica de esparcimiento con inóculos de 500, 100, 10 y 1 microlitro de cada una de las muestras, por duplicado en agar ATS.

Después de la incubación, se procede a contar el número de colonias que contienen de 30 a 300 UFC en las cajas de Petri. Para cada serie, registrar el número de colonias recuperadas con dos cifras significativas y el factor de dilución para las placas utilizadas para el recuento. Si el número de colonias en las cajas que contienen alícuotas de 1 mL de SCDLP es inferior a 30, entonces se contabiliza el número de colonias en esas cajas. Si no hay colonias se debe registrar como "<1".



Se cuentan las placas que tengan el número más conveniente de colonias. Se dejan por fuera aquellas que tengan menos de 30 colonias o mas de 300. Se elije la que tenga la cantidad representativa más facil de contabilizar.

Figura 11. Recuento de colonias

Fuente: [http://bagginis.blogspot.com/2016\\_07\\_01\\_archive.html](http://bagginis.blogspot.com/2016_07_01_archive.html)

### **3.7 Modificaciones**

Por la disponibilidad de los reactivos en el laboratorio de microbiología, el neutralizante descrito en la norma (SCDLP) fue preparado de la manera que a continuación se describe:

#### **Receta ajustada a 250 mL**

- 4.25 g de peptona caseína
- 0.75 g de peptona soya
- 1.25 g de NaCl
- 0.6 g de fosfato de hidrógeno disódico
- 0.6 g de glucosa
- 0,25 g de lecitina (SE OMITE POR DISPONIBILIDAD)
- Todo en 250 mL de agua destilada
- Agregar 1.75 g de Tween. Ajustar el pH a un valor entre 6,8 - 7,2, autoclavar y conservar a una temperatura entre los 5°-10°C



## **CAPÍTULO IV**

## Análisis estadístico

Tras realizar el test de normalidad, se encuentra que no se cumple el supuesto de normalidad.

Al usar el test Jonckheere-Terpstra, no se encontró diferencia estadísticamente significativa ( $p=0.814$ ) en la variable tiempo.

### Jonckheere-Terpstra Test(a)

	ufc
Number of Levels in tiempo	2
N	10
Observed J-T Statistic	13,500
Mean J-T Statistic	12,500
Std. Deviation of J-T Statistic	4,249
Std. J-T Statistic	,235
Asymp. Sig. (2-tailed)	,814

a Grouping Variable: tiempo

Al no poder calcular entre cuales grupos existe diferencia, dadas las mediciones obtenidas, se realiza una transformación logarítmica estadística de los datos UFC a  $\ln(\text{UFC})$ . Los resultados de la transformación de la variable UFC en  $\ln(\text{UFC})$  cumplen con el supuesto de normalidad ( $p=0,05$ ) y homogeneidad de variancia ( $p=0.658$ ); según el tiempo, tampoco se encontró diferencia estadísticamente significativa ( $p=0,890$ ).

### ANOVA Ln(UFC)

	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F	Sig.
Dentro de grupo	,399	1	,399	,020	,890
Entre grupos	155,935	8	19,492		
Total	156,334	9			

Con respecto al medio, no se cumplieron los supuestos. Se forman los siguientes grupos con la variable Ln(UFC):

A: Clorhexidina, Cloruro de cetilpiridinio

B: Alcohol 70%

C: Control

#### Diferencia de grupos según Ln(UFC)

Grupo	1	2	3
Clorhexidina	0		
Cloruro Cetilp.	0		
Alcohol 70%		5,63	
Control			9,60

Al realizar la prueba Tukey, no se establecen diferencias entre los tres grupos

Inufc

		N	Subset for alpha = .05		
medion			1	2	3
Tukey HSD <sup>a</sup>	Clorox	2	,0000		
	Plax	2	,0000		
	Blanco	2	,0000		
	Etoh	2		5,6308	
	Control	2			9,5994
	Sig.		1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2,000.

## 4.2 Resultados y discusión

### 4.2.1 Resultados

El experimento de desinfección de los cepillos dentales se realizó con tres diferentes desinfectantes, estos eran enjuagues a base de cloruro de cetilpiridinio, digluconato de clorhexidina y una solución de alcohol al 70%, respectivamente. Para cada uno de los desinfectantes se realizó el proceso siguiendo la norma ISO 22196, con las modificaciones indicadas en la metodología, primeramente con 10 minutos de inoculación y luego con 24 horas, según indica la norma.

Una vez realizados los análisis estadísticos, se puede comprobar que no existe diferencia entre los tiempos de acción de los desinfectantes. El análisis de las muestras indica que, el desinfectante que contiene clorhexidina y el que contiene Cloruro de cetilpiridinio muestran el mismo nivel de desinfección de los cepillos dentales, tanto para 10 minutos como para 24 horas de contacto con el desinfectante; mientras que la solución

alcohólica al 70% muestra un menor nivel de desinfección cuando se compara con los dos anteriores, tanto para el tiempo 1 de 10 minutos como para el tiempo 2 de 24 horas.

Se obtuvo un proceso de desinfección adecuado al utilizar los desinfectantes clorhexidina al 0.12 % y cloruro de cetilpiridinio, no así para la solución alcohólica al 70%, existiendo diferencia estadísticamente significativa entre el grupo de los primeros dos desinfectantes (clorhexidina y cloruro de cetilpiridinio), el segundo grupo (alcohol) y el grupo de control. El grupo alcohol presenta diferencias estadísticamente significativas cuando se compara con el control y con el grupo 1. En el grupo 1, tanto a los 10 minutos como a las 24 horas, según los valores UFC, no existe proliferación de microorganismos. En el grupo 2 se encuentran valores de Ln (UFC) de 5.63. El grupo control presenta valores de Ln(UFC9) de 9.60.

#### **4.2.2 Discusión**

Los cepillos dentales son instrumentos útiles para la remoción del biofilme dental que se forma en la cavidad oral de las personas. Este biofilme está constituido por una gran cantidad de microorganismos, que encuentran el medio ideal para sobrevivir y crecer en este ambiente, y es un contaminante del mismo cepillo dental. Igualmente, al tener expuesto el cepillo dental al medio, este se convierte en un reservorio de microorganismos ajenos a la cavidad oral y potencialmente patógenos. Es sabido que en los servicios sanitarios puede haber una contaminación cruzada hacia los cepillos mal almacenados.

Diferentes compuestos se han usado para la limpieza y la desinfección del cepillo dental, entre los que se encuentran los utilizados en esta investigación. Se busca un método que sea práctico de utilizar por la población general y permita una desinfección tal, que los mismos cepillos no se conviertan en una fuente de contaminación y de inoculación de diversas enfermedades para la persona que los manipula. Se sabe de métodos efectivos para la desinfección de los cepillos dentales, pero que requieren de un contacto prolongado en el tiempo para que sean efectivos. Es por este motivo que estos desinfectantes no son prácticos para la población, ya que esperar 24 horas para lograr la limpieza del cepillo es algo que muy pocas personas lograrían.

En la presente investigación, se pudo comprobar que el uso de un método estandarizado para la desinfección de superficies es viable de replicar. Al tratar la desinfección del cepillo dental, no se encontró en la literatura científica consultada un método estandarizado para, específicamente, la desinfección de cepillos de dientes, por lo cual se realiza un gran aporte a futuras investigaciones al utilizar y probar con éxito el método descrito.

Otro aporte importante del estudio es el tiempo de desinfección. Esto se refiere a que, en el método estándar, el tiempo de contacto del cepillo dental inoculado debe de ser de 24 horas para que haya una efectiva desinfección. Según se pudo probar en este estudio, si se varía el tiempo de contacto a 10 minutos, se logra conseguir una desinfección igual que con las 24 horas. Lo anterior constituye un aporte para la población en general, ya

que se probó un método efectivo y sencillo de usar cuando se requiere una eliminación significativa de los microorganismos.

La efectividad es significativa cuando se usa el enjuague bucal que contiene clorhexidina y cloruro de cetilpiridinio al (compararse con los grupos de solución de alcohol al 70% y el control realizado). Se estableció que existe diferencia entre el grupo alcohol al 70% y el grupo control, por lo tanto el alcohol es una solución que debe ser tomada en cuenta al realizar desinfección de los cepillos dentales; sin embargo, al compararse con los enjuagatorios del grupo 1, estos últimos son mucho más efectivos que el alcohol. Los desinfectantes del grupo 1 se comportan de una manera similar, inhibiendo las bacterias totalmente en ambos tiempos. El alcohol es eficaz al compararse con el control, pero ha de tomarse en cuenta que si permite el crecimiento bacteriano.

## **CAPÍTULO V**



## 5.1 Conclusiones

Luego de completar el protocolo establecido para las desinfecciones de los cepillos dentales con la clorhexidina al 0,12% y cloruro de cetilpiridinio, se determinó que si existe diferencia estadísticamente significativa con el grupo control, lo que nos demuestra que su acción bactericida si es la esperada, pues los resultados evidencian una disminución completa de las UFC de los cepillos dentales que fueron expuestos a esta solución.

No existe diferencia significativa al desinfectar el cepillo dental con cualquiera de las soluciones estudiadas, ya se mantenga sumergido por 10 minutos o por 24 horas. 10 minutos es el tiempo adecuado para producir una desinfección significativa.

Se concluye que el enjuagatorio utilizado que contiene digluconato de clorhexidina al 0.12%, es efectivo inhibiendo la acción de las bacterias estudiadas, esto al ser el cepillo dental embebido en una solución de esta sustancia por un periodo de al menos 10 minutos. El enjuagatorio estudiado que contiene el cloruro de cetilpiridinio, se comporta similar a la clorhexidina en el mismo periodo de tiempo.

La solución de alcohol al 70% presenta eficacia como bactericida al usarse para desinfectar cepillos dentales, aunque debe tomarse en cuenta que no es completamente eficaz, sobre todo si se compara con la clorhexidina y el cloruro de cetilpiridinio; no obstante, si presenta diferencia al compararse con el control.

## **CAPITULO VI**

## 6.1 Cronograma de actividades

Fecha	Actividad	Recursos	Responsables	Evaluación del director	Evaluación del grupo
2-4-16	Distribución de primeras actividades	internet	Todos	Exc.	Exc.
7-4-2016	Definición de sustancias a utilizar para probar desinfección	Sustancias accesibles para la población general	Todos los integrantes y Dr. Ulate.	Exc.	Exc.
15-4-16	Búsqueda de métodos válidos para desinfección de cepillos.		Todos		
17-4-2016	Búsqueda de norma estandarizada para la desinfección de superficies		Mónica Cortés	Exc.	Exc.
27-4-2016	Reunión con el Dr. Ulate para ver avances en método y artículos científicos		Todos	Exc.	Exc.
2-5-16	Resumen de métodos de desinfección aceptados		Todos	Exc.	Exc.
17-5-2016	Depuración del método a utilizar en el estudio		Mónica Cortés	Exc.	Exc.
22-5-2016	División de tareas para iniciar aplicación de las pruebas		Todos	Exc.	Exc.
1-6-2016	Reunión con el Dr. Norman Rojas para definir asuntos de materiales y métodos		Dr. Ulate Mónica Cortés	Exc.	Exc.

8-7-2016	Distribución de tareas para la memoria		Todos	Exc.	Exc.
22-7-16	Entrega de cepillos y soluciones desinfectantes a microbiología	Cepillos dentales nuevos , Plax, Clorhexil	Todos	Exc.	Exc.
30-7-2016	Avance de memoria		Todos	Exc.	Exc.
10-8-2016	Toma de las muestras		Lab. microbiología	Exc.	Exc.
12-8-2016	Toma de fotografías del procedimiento		Lab. microbiología Glenda Sánchez	Exc.	Exc.
14-8-2016	Entrega de resultados por parte de microbiología		Microbiología	Exc.	Exc.
25-8-2016	Reunión con la estadística para comenzar tabulación de resultados	Datos y Resultados del laboratorio	Msc. Jaqueline Castillo María Fernanda Muñoz Stephanie Palacios Dr. Ulate	Exc.	Exc.
1-9-2016	Repetición del experimento		Lab. microbiología	Exc.	Exc.
13-9-2016	Visita a microbiología para fotos de la repetición		Dr. Ulate María Fernanda	Exc.	Exc.

			Muñoz		
14-9-2016	Entrega de nuevos resultados por parte de microbiología		Laboratorio microbiología	Exc.	Exc.
27-9-2016	Reunión con la estadística para tabulación de nuevos resultados		Dr. Ulate	Exc.	Exc.
29-9-16	Revisión de memoria completa hasta los resultados.		Todos y Dr. Ulate	Exc.	Exc.
29-9-2016	Reunión con el Dr. Ulate para establecer discusión y conclusiones		Todos los integrantes y Dr. Ulate	Exc.	Exc.
15-10-2016	Elaboración del borrador de la memoria		Todos los integrantes	Exc.	Exc.
25-10-2016	Reunión para realizar discusión, resultados y conclusiones		Todos y el Dr. Ulate	Exc.	Exc.
30-10-2016	Reunión para revisión final de memoria, corrección de errores y conclusiones.		Todos los integrantes y Dr. Ulate	Exc.	Exc.
4-11-2016	Envío de borrador de memoria a la comisión para su revisión		Todos los integrantes	Exc.	Exc.

## **6.2 Factores facilitadores. Obstáculos y dificultades**

### **6.2.1 Factores facilitadores**

Disposición del laboratorio de análisis microbiológico de la Facultad de Microbiología de la Universidad de Costa Rica

Suministro de cepillos dentales requeridos para las pruebas experimentales de parte de la empresa Oral B®

### **6.2.2 Obstáculos y dificultades**

Imposibilidad de suplir todos los reactivos para la preparación del neutralizante universal SCDLP. Esta situación se sustentó con la utilización de reactivos equivalentes en función a los sustituidos y que no alteraran la función de dicho preparado.

## Referencias

1. Nápoles I, Fernández M, Jiménez P. Evolución histórica del cepillo dental. Rev Cubana Estomatol. 2015; 52(2): 208-216.
2. Camacho M. Historia del Cepillo de Dientes. Creación y producción en diseño y comunicación. 2007; 4(13):59.
3. Raéd I, et al. Miswak (chewing stick). A cultural And Scientific Heritage. Saudi Dental Journal. 1999; 11(2):80-88.
4. Gil E, Segura M, Segura M. Prevención de la placa dental utilizando cepillos de dientes basados en dióxido de titanio TiO<sub>2</sub>. [Internet]. Madrid. 2008; Universidad Rey Juan Carlos. [citado 10 de octubre del 2015] Disponible en: [http://biopat.cs.urjc.es/conganat/files/2007-2008\\_G10.pdf](http://biopat.cs.urjc.es/conganat/files/2007-2008_G10.pdf)
5. Deacon SA, et al. Different powered toothbrushes for plaque control and gingival health. The Cochrane Database System Rev. 2010; 8(12)
6. Harrys N. Odontología preventiva primaria. 2ª ed. Mexico. Editorial El Manual moderno; 2005.
7. Sudasassi, R. Estudio de Diseño de los cepillos dentales. [Internet]. Costa Rica. 2010. Universidad Latinoamericana de Ciencia y Tecnología; 2010; [citado 10 de octubre del 2015]. Disponible en: <http://bb9.ulacit.ac.cr/tesinas/Publicaciones/040255.pdf>
8. Hoyos M, Gutiérrez L. Esterilización, desinfección, antisépticos y desinfectantes. Rev. Act. Clin. Med. 2014; Vol 49
9. Hugo W. A brief history of heat and chemical preservation and disinfection. Journal of Applied Bacteriology. 1991; 36:197-236
10. Medina E, Elaboracion y Documentacion del Programa de Desinfeccion de los Laboratorios de Microbiologia de la Pontificia Universidad Javeriana. [Internet]. Bogotá. 2006. Universidad Javeriana. [citado 29 de agosto del 2015]. Disponible en: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis281.pdf>
11. Asociación de Dentistas Americanos [Internet]. Estados Unidos: 2015. (Citado el 25/10/16) Disonible en: <http://www.ada.org/en>
12. OpenCourseWare de la Universidad politécnica de Madrid. (Internet) Planes de limpieza y desinfección. 2001. Citado el 29 de agosto 2015.

Disponible en: <http://ocw.upm.es/tecnologia-de-alimentos/seguridad-alimentaria/contenidos/Lecciones-y-Test/Lec-3.1..pdf>

13. McDonnell G, Russell AD. Antiseptics and Disinfectants: activity, action and resistance. *Clin Microbiol Rev.* 1999;12(1):147-179.
14. Aswini Y. et al. Antimicrobial Efficacy of Various Disinfecting Solutions in Reducing the Contamination of the Toothbrush – A Comparative Study. *Oral Health Prev Dent.* 2009; 7(2): 137-145.
15. Kahrs F. Principios generales de la desinfección. *Revista Sci. tech. Off. int. Epiz. Francia.* 1995; 14 (1):143-163.
16. Nelson F. Microbial contamination of toothbrushes and their decontamination. *Pediatric Dent.* 2003; 22(5):381-383.
17. Ryssel H, Kloeters O, Germann G, Shafer TH, Wiedemann G, Oehlbauer M. The antimicrobial effect of acetic acid-an alternative to common local antiseptics. *Burns.* 2009; 35(5): 695-700.
18. Herrera L, Caballero S, Claro A, Torres H, Martínez C. Actividad antimicrobiana del ácido acético y el cepillo colgate 360° antibacterial®: un estudio in vitro. *Rev Fac Odontología Universidad Antioquia.* 2012; 24(1): 62-65.
19. Ainda K, Andrade D, Watanab E, Yoko I. Atividade antimicrobiana in vitro do acético e dos vinagres branco e tinto sobre bacterias hospitalares. *Revista Ciências Médicas e Biológicas.* 2006; 5(2): 111-116.
20. Kustner, E. Antisépticos en Medicina Bucal: la clorhexidina. *Jano.* (Internet); 2003 [consultado 7 agosto 2015]; 59 (1) 1-3. Disponible en: <http://www.jano.es/ficheros/sumarios/1/64/1458/35/1v64n1458a13042292pdf001.pdf>
21. Arévalo, J. M., Arribas, J. L., Hernández, M. J., Lizán, M., & Herruzo, R. España. (Internet); Sociedad Española de medicina preventiva. 2001; [consultado 30 agosto 2015]; 1(1) disponible en : <http://www.sempsph.com/>
22. López, M. D. L. C. T., Álvarez, M. D., & Morales, A. A. La clorhexidina, bases estructurales y aplicaciones en; la estomatología. *Gaceta Médica Espirituana*, (Internet); 2009 [consultado 26 agosto 2016]; 11(1):1 Disponible en : [http://www.bvs.sld.cu/revistas/gme/pub/vol.11.\(1\)\\_08/p8.html](http://www.bvs.sld.cu/revistas/gme/pub/vol.11.(1)_08/p8.html)
23. Bascones A, Morante S. Antisépticos orales. Revisión de la literatura y



perspectiva actual. Av Periodon Implantol. (Internet); 2006; 18, (1): 31-59. [consultado 20 julio 2016]. Disponible en: <http://scielo.isciii.es/pdf/peri/v18n1/original3.pdf>

24. Hoyos, M. Gutiérrez L. Esterilización, desinfección, antisépticos y desinfectantes. Rev. Act. Clin. Med; (Internet); [consultado 2016 Sep 10]. 49 (1) Disponible en [http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?pid=S2304-37682014001000010&script=sci\\_arttext](http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?pid=S2304-37682014001000010&script=sci_arttext)