

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN - TACNA

Facultad de Ciencias de la Salud

Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica

COMPARACIÓN DEL EFECTO BACTERICIDA *in vitro* DEL
DIÓXIDO DE CLORO A DISTINTAS CONCENTRACIONES
SOBRE LA FLORA MICROBIANA SALIVAL,
UNJBG - TACNA, 2016

TESIS

Presentada por:

Bach. Giovana Noemi Vilca Maquera

Para optar el Título Profesional de:

QUÍMICO FARMACÉUTICO

TACNA - PERÚ

2017

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN

Facultad de Ciencias de la Salud

Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica

“COMPARACIÓN DEL EFECTO BACTERICIDA *in vitro* DEL DIÓXIDO DE CLORO A DISTINTAS CONCENTRACIONES SOBRE LA FLORA MICROBIANA SALIVAL, UNJBG-TACNA, 2016”

TESIS

PRESENTADA POR:

BACH. GIOVANA NOEMI VILCA MAQUERA

Para optar el Título Profesional de:

QUÍMICO FARMACÉUTICO

Aprobado por:, ante el siguiente jurado:



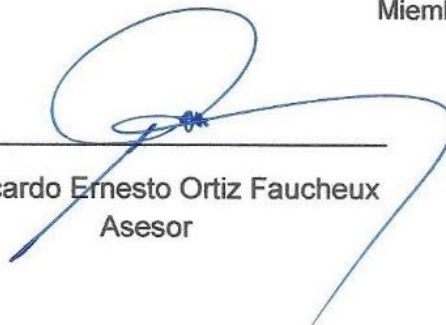
Q.F. Edgard Guido Calderón Copa
Presidente



Q.F. Orlando Agustín Rivera Benavente
Miembro



Dr. Juan José Evaristo Changllo Roas
Miembro



Dr. Ricardo Ernesto Ortiz Faucheux
Asesor

DEDICATORIA

A Dios, por guiarme, protegerme y darme fortaleza, sin él nada somos y con él todo lo podemos.

A mi familia, por el apoyo incondicional, en especial a mi madre por el inmenso amor que me brinda, a mi padre por su esfuerzo y sacrificio, a mi hermana por protegerme siempre y a mi sobrino Aleksy.

AGRADECIMIENTO

*Al Dr. Ricardo Ernesto Ortiz
Faucheux, por su valiosa asesoría y
consejos brindados.*

*A mi docente Q.F. Orlando Rivera
Benavente, por su apoyo, motivación,
guía y por brindarme conocimientos
muy valiosos para el desarrollo de
esta tesis.*

*A mis profesores, por todos estos
años de enseñanza y consejos.*

ÍNDICE

| | |
|---|------|
| PÁGINA DEL JURADO..... | ii |
| DEDICATORIA | iii |
| AGRADECIMIENTOS..... | iv |
| ÍNDICE..... | v |
| ÍNDICE DE TABLAS | viii |
| ÍNDICE DE GRÁFICOS | ix |
| ÍNDICE DE ANEXOS..... | x |
| RESUMEN | xi |
| ABSTRACT | xii |
| | |
| INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| | |
| CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN | |
| 1.1 Descripción del Problema | 3 |
| 1.2 Formulación del problema | 5 |
| 1.2.1 Problema principal..... | 5 |
| 1.2.2 Problemas secundarios..... | 5 |
| 1.3 Justificación e importancia de la investigación | 6 |
| 1.4 Objetivos..... | 7 |
| 1.4.1 Objetivo general | 7 |
| 1.4.2 Objetivos específicos | 8 |

| | |
|---|----|
| 1.5 Hipótesis | 8 |
| 1.5.1 Hipótesis General..... | 8 |
| 1.5.2 Hipótesis Específicas | 9 |
| 1.6 Variables..... | 9 |
| 1.6.1 Variable Independiente | 9 |
| 1.6.2 Variable Dependiente..... | 10 |
| 1.6.3 Operacionalización de las variables | 11 |

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

| | |
|---|----|
| 2.1. Antecedentes del estudio..... | 12 |
| 2.2 Bases Teóricas | 16 |
| 2.2.1 Ecología de la Cavidad Bucal..... | 16 |
| 2.2.2 Dióxido de cloro..... | 25 |
| 2.3. Definición de términos | 49 |

CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO

| | |
|--|----|
| 3.1 Tipo y diseño de la Investigación..... | 51 |
| 3.1.1 Tipo de investigación..... | 51 |
| 3.1.2 Diseño de investigación | 52 |
| 3.1.3 Nivel de Investigación | 52 |
| 3.2 Población y Muestra | 52 |
| 3.2.1 Población..... | 52 |

| | |
|--|-----|
| 3.2.2 Muestra | 53 |
| 3.3 Técnicas e instrumentos para la recolección de datos | 53 |
| 3.4 Materiales y/o instrumentos | 62 |
| 3.4.1 Materiales..... | 62 |
| 3.4.2 Instrumentos..... | 63 |
| 3.5 Procesamiento de datos | 64 |
| CAPÍTULO IV: RESULTADOS | |
| DISCUSIÓN..... | 81 |
| CONCLUSIONES | 92 |
| RECOMENDACIONES..... | 94 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 95 |
| ANEXOS..... | 106 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | | |
|-------------------|---|----|
| Tabla N° 1 | Halos de inhibición de las diferentes concentraciones del dióxido de cloro..... | 66 |
| Tabla N° 2 | Grado de sensibilidad de la flora microbiana salival generado por el dióxido de cloro a diferentes concentraciones según la escala de Duraffourd..... | 68 |
| Tabla N° 3 | Análisis de varianza de las comparaciones del efecto bactericida a distintas concentraciones del dióxido de cloro | 69 |
| Tabla N° 4 | Halos de inhibición del efecto bactericida de las distintas concentraciones del ClO ₂ | 71 |
| Tabla N° 5 | Prueba de significancia de Tukey, comparación múltiple | 73 |
| Tabla N° 6 | Resumen de la prueba de significancia de Tukey | 74 |
| Tabla N° 7 | Prueba de significación de Tukey | 77 |

ÍNDICE DE GRÁFICOS

| | |
|--|----|
| Gráfico N° 1: Promedio de halos de inhibición | 72 |
| Gráfico N° 2: comparación múltiple: diagrama de cajas | 79 |

ÍNDICE DE ANEXOS

| | |
|-------------------------|-----|
| Anexo N° 1 | 107 |
| Anexo N° 2 | 108 |
| Anexo N° 3 | 109 |
| Anexo N° 4 | 112 |
| Anexo N° 5 | 115 |
| Anexo N° 6 | 117 |
| Anexo N° 7 | 120 |

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue determinar y comparar el efecto bactericida *in vitro* del dióxido de Cloro (ClO_2) a distintas concentraciones sobre la flora microbiana salival, tomando como control negativo el agua destilada. Se utilizó el método de difusión en disco (Kirby Bauer) y se incubó en condiciones de aerobiosis por 24 horas a 37 °C, para luego proceder a la lectura del diámetro de los halos de inhibición formados alrededor de los discos de papel filtro embebido con cada una de las sustancias. El análisis fue realizado por la prueba estadística ANOVA y la prueba de significación de Tukey. Todas las concentraciones utilizadas presentan efecto bactericida *in vitro* sobre la flora microbiana salival. A las concentraciones de 0,03 %, 0,05 %, 0,08 %, 0,10 % y 0,15 %, se logró obtener una media de 13,98 mm, 17,32 mm, 21,60 mm, 22,34 mm y 29,34 mm respectivamente. En las comparaciones múltiples se observó que el ClO_2 al 0,08 % y al 0,10 % no presentó diferencia estadísticamente significativa entre sus medias, a diferencia de las demás concentraciones de ClO_2 que si presentaron diferencias estadísticamente significativas.

Palabras clave: Dióxido de Cloro, flora microbiana salival, halo de inhibición.

ABSTRACT

The objective of this research was to determine and compare the in vitro bactericidal effect of chlorine dioxide (ClO_2) at different concentrations on the salivary microbial flora, taking as negative control the distilled water. The disc diffusion method (Kirby Bauer) was used and incubated under aerobic conditions for 24 hours at 37°C , then proceeded to read the diameter of the inhibition halos formed around the filter paper disks embedded with Each of the substances. The analysis was performed by the ANOVA statistical test and the Tukey significance test. All the concentrations used have an in vitro bactericidal effect on the salivary microbial flora. At the concentrations of 0,03 %, 0,05 %, 0,08 %, 0,10 % and 0,15 %, a mean of 13,98 mm, 17,32 mm, 21,60 mm, 22,34 mm and 29,34 mm respectively. In the multiple comparisons it was observed that the 0,08 % and 0,10 % ClO_2 did not present a statistically significant difference between their means, unlike the other concentrations of ClO_2 that did present statistically significant differences.

Key words: Chlorine dioxide, salivary microbial flora, inhibition halo.

INTRODUCCIÓN

En la cavidad oral se dan condiciones micro ambientales ideales de temperatura y nutrientes adecuados para la presencia de una gran variedad de microorganismos. La boca es el hogar de cientos de especies de bacterias que producen varias sustancias fétidas como resultado de la degradación de proteínas ⁽¹⁾. El mal olor bucal, también llamado halitosis o mal aliento es un término utilizado para describir un olor desagradable que emana de la cavidad oral ⁽²⁾.

Los enjuagues bucales o colutorios son soluciones que se emplean después del cepillado con el fin de eliminar gérmenes y bacterias combatiendo y eliminando la placa bacteriana y la halitosis. Algunas de estas soluciones simplemente enmascaran el mal olor bucal. Los enjuagues bucales que contiene aceites esenciales, tiene una actividad antiplaca y antigingivitis, sin embargo, su alta concentración de alcohol reducen la sensación del gusto y puede causar dolor oral ⁽³⁾. Los Iones de Zinc inhiben el mal olor bucal, pero tiene un problema de sabor. El triclosán y cloruro de Cetilpiridino son agentes antimicrobianos utilizados como

agentes antisépticos, sin embargo, su reducción clínica de compuestos de azufre volátiles (VSC) es cuestionable ⁽⁴⁾.

El dióxido de cloro es un desinfectante químico capaz de destruir una amplia variedad de bacterias, hongos, virus y esporas. Es una sustancia no tóxica aprobado por la Administración de Alimentos y Fármacos de Estados Unidos (FDA) como un agente antimicrobiano. El aditivo se utiliza como un agente antimicrobiano en productos agrícolas crudos en la preparación, envasado, o conservación de los alimentos con fines comerciales, a concentraciones de 500 a 1200 partes por millón (ppm) de clorito de sodio en combinación con cualquier ácido a niveles suficientes para alcanzar un pH de 2,3 a 2,9 ⁽⁵⁾.

Diversos estudios ponen de manifiesto que el dióxido de cloro es eficaz para reducir el mal olor bucal, sin presentar efectos secundarios pudiéndose utilizar esta solución a largo plazo evitando la coloración dental producido por las soluciones con Clorhexidina ⁽⁶⁾. El trabajo se dividió en capítulos, el primero trata el planteamiento de la investigación, el segundo desarrolla el marco teórico, el tercero comprende la metodología y por último el cuarto describe resultados, discusión, conclusiones y recomendaciones.

CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN

1.1 DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA

Como ha señalado la Organización Mundial de la Salud (OMS) recientemente, las enfermedades bucodentales y, en particular, la caries y las enfermedades periodontales constituyen un problema de salud de alcance mundial. El control de la placa microbiana y de sus efectos sobre la salud bucal es una preocupación constante. Lo más comúnmente usado es el control mecánico mediante cepillado; sin embargo tiene resultados muy limitados ⁽⁷⁾.

Existe evidencia científica que los enjuagues pueden desempeñar un papel clave y de un valor significativo como coadyuvantes de los métodos mecánicos para la prevención y tratamiento de las enfermedades periodontales.

El dióxido de cloro es un gas cuyo poder oxidante es antimicrobiano. El gas penetra en células bacterianas, reacciona con aminoácidos vitales en el citoplasma. Se ejerce su efecto bactericida mediante la fijación de proteínas de la membrana celular ⁽⁸⁾.

La Clorhexidina (CHX), es el agente antimicrobiano más estudiado y eficaz en el control químico de la placa dental, siendo considerado como el control positivo (patrón oro), a la que se deben comparar todos los demás agentes antiplaca ⁽⁹⁾.

En consecuencia, en el futuro en las evaluaciones será necesario definir con mayor precisión el potencial antimicrobiano del Dióxido de Cloro en comparación con la Clorhexidina. Son pocos los estudios que han examinado los efectos del dióxido de cloro en las medidas de salud oral.

El objetivo en el presente estudio fue demostrar el efecto bactericida *in vitro* del dióxido de cloro mediante la formación de los halos de inhibición alrededor de los discos de papel filtro embebido con cada una de las concentraciones sobre flora microbiana salival.

1.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

1.2.1 Problema principal

¿Cuál es el efecto bactericida *in vitro* del dióxido de cloro comparándola con las distintas concentraciones sobre la flora microbiana salival?

1.2.2 Problemas Secundarios

1. ¿Cuál es el efecto bactericida *in vitro* del dióxido de cloro a las concentraciones de 0,03 %, 0,05 %, 0,08 %, 0,10 % y 0,15 % sobre la flora microbiana salival?
2. ¿Cuál es el grado de sensibilidad de la flora microbiana salival generado por el dióxido de cloro a las concentraciones de 0,03 %, 0,05 %, 0,08 %, 0,10 % y 0,15 %?
3. ¿Existe diferencias estadísticamente significativas entre efecto bactericida *in vitro* del dióxido de cloro a las

concentraciones de 0,03 %, 0,05 %, 0,08 %, 0,10 % y 0,15 %
sobre la flora microbiana salival?

1.3 JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN

La incidencia de enfermedades de la cavidad bucal, de las glándulas salivales y los maxilares ha aumentado en los últimos años siendo la primera causa de morbilidad general en la región Tacna representando un total de 21,6 % en el 2014 ⁽¹⁰⁾.

Para mantener la salud de la cavidad bucal, en la actualidad existe una cantidad considerable de productos de diferentes marcas, pero con un objetivo común, disminuir el crecimiento de la placa bacteriana y suprimir el mal olor oral. Existen pruebas que indican que los compuestos de azufre volátiles (VSC) producidas por las bacterias periodontales, tienen efectos perjudiciales sobre el tejido gingival y son, por lo tanto, más que un problema cosmético ⁽¹¹⁾.

Parte de los productos que podemos utilizar para mantener la salud de la cavidad bucal son los enjuagatorios que contienen Clorhexidina, catalogados como especializados o medicados, con una

alta capacidad de eliminar la placa bacteriana. Aunque es considerado el agente antiséptico oral más eficaz, el uso durante periodos prolongados de tiempo está relacionado con algunos efectos secundarios, tales como coloración de los dientes, tinción del dorso de la lengua, mal gusto y la sensación de sabor reducido ⁽¹²⁾.

Diversos estudios ponen de manifiesto la necesidad de una mayor investigación de los beneficios potenciales del dióxido de cloro en la salud periodontal ⁽¹³⁾.

El presente estudio aporta nueva información para un mejor manejo preventivo de las enfermedades bucales pudiéndose aplicar más adelante en clínica brindando a los pacientes tratamientos alternativos seguros y más eficaces.

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 Objetivo general

Comparar el efecto bactericida *in vitro* del dióxido de cloro a distintas concentraciones sobre la flora microbiana salival.

1.4.2 Objetivos Específicos

1. Determinar el efecto bactericida *in vitro* del dióxido de cloro a las concentraciones de 0,03 %, 0,05 %, 0,08 %, 0,10 % y 0,15 % sobre la flora microbiana salival.
2. Establecer el grado de sensibilidad de la flora microbiana salival generado por el dióxido de cloro a las concentraciones de 0,03 %, 0,05 %, 0,08 %, 0,10 % y 0,15 %.
3. Determinar si el efecto bactericida *in vitro* del dióxido de cloro a las concentraciones de 0,03 %, 0,05 %, 0,08 %, 0,10 % y 0,15 %, presentan diferencias estadísticamente significativas sobre la flora microbiana salival.

1.5 HIPÓTESIS

1.5.1 Hipótesis General

El dióxido de cloro presenta un efecto bactericida *in vitro* sobre la flora microbiana salival.

1.5.2 Hipótesis Específicos

1. El dióxido de cloro a las concentraciones de 0,03 %, 0,05 %, 0,08 %, 0,10 % y 0,15 % presenta un efecto bactericida *in vitro* sobre la flora microbiana salival.
2. La flora microbiana salival presenta grado de sensibilidad generado por el dióxido de cloro a las concentraciones de 0,03 %, 0,05 %, 0,08 %, 0,10 % y 0,15 %.
3. El efecto bactericida *in vitro* del dióxido de cloro a las concentraciones de 0,03 %, 0,05 %, 0,08 %, 0,10 % y 0,15 % presenta diferencias estadísticamente significativas sobre la flora microbiana salival.

1.6 VARIABLES

1.6.1 Variable Independiente:

- Concentración del dióxido de cloro.

1.6.2 Variable Dependiente:

- Efecto bactericida sobre la flora Microbiana salival.

1.6.3 Operacionalización de las variables

| VARIABLE | DEFINICIÓN CONCEPTUAL | DEFINICIÓN OPERACIONAL | DIMENSIÓN | INDICADORES | ESCALA |
|---|--|---|----------------------|--|---------|
| VARIABLE INDEPENDIENTE Concentración del dióxido de cloro. | Cantidad de dióxido de cloro en un volumen determinado de agua destilada. | Son las diferentes concentraciones de dióxido de cloro que se obtuvieron diluyendo el producto formulado que contiene 10 % de dióxido de cloro estabilizado, libre de fuentes de cloro y ajustando el pH. | Cuantitativa | Concentración al 0,03 % Concentración al 0,05 % Concentración al 0,10 % Concentración al 0,15 % | Razón |
| VARIABLE DEPENDIENTE Efecto bactericida sobre la flora Microbiana salival | Es la inhibición del crecimiento de las bacterias que produce el dióxido de cloro. | Es el resultado de la formación del halo de inhibición en mm alrededor del disco donde la sustancia empleada es capaz de impedir el crecimiento de la bacteria al cabo de 24 horas de incubación. | Escala de Duraffourd | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Nula (-): <= 8 mm ▪ Sensible (+): 9 a 14 mm ▪ Muy sensible (++): 15 a 19 mm ▪ Sumamente sensible (+++): >=20 mm | Ordinal |

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 ANTECEDENTES DEL ESTUDIO

ÁMBITO INTERNACIONAL

Kandwal A. y Ghani B. en la India en el 2014, realizaron un estudio titulado: “Evaluación comparativa del efecto del enjuague de dióxido de cloro en la placa inducida por la gingivitis y el mal olor bucal”. El objetivo de este estudio fue evaluar los efectos clínicos del enjuague bucal con dióxido de cloro en la placa inducida por la gingivitis y el mal olor bucal. Se incluyeron 30 pacientes en el estudio y se dividieron en tres grupos. Grupo-I: 10 pacientes utilizando solamente dióxido de cloro, Grupo II: 10 pacientes utilizando dióxido de cloro + SRP (raspado y alisado radicular) y Grupo III: 10 pacientes con un índice de SRP Gingival, el índice de placa y mediciones organolépticas se registraron al inicio del estudio, día siete y a los 14 días. Se demostró que el enjuague bucal de dióxido de cloro utilizado en un período de 14 días,

fue eficaz en la reducción del mal olor oral de la mañana. En conclusión, los parámetros clínicos de gingivitis se redujeron con el enjuague bucal experimental utilizado durante 14 días. El enjuague bucal que contiene dióxido de cloro mejoró la halitosis ⁽¹⁴⁾.

Downs R D, et al., en EEUU, en el 2015, realizaron un estudio *in vitro* que compara el enjuague bucal de dióxido de cloro y la Clorhexidina. El objetivo fue probar la capacidad de un enjuague bucal de dióxido de cloro activado (Oracare) para reducir o eliminar compuestos de azufre volátil, toxinas bacterianas, y los productores de bacterias como un precursor de los estudios *in vivo* para mejorar la cicatrización de heridas y el tratamiento de la enfermedad periodontal. Los resultados para la CIM para Oracare fueron más altos que los de clorhexidina cuando se compara directamente contra un panel de 11 especies microbianas. Sin embargo, cuando se normaliza a partes por millón de los ingredientes activos, dióxido de cloro activado (Oracare) rivalizó la actividad de la clorhexidina y superó en actividad hacia el patógeno periodontal *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. El enjuague Oracare elimina estadísticamente mayor porcentaje de compuestos de azufre volátil (VSC) que la clorhexidina en relación con el control de agua. Los resultados demuestran el potencial

antimicrobiano potente del dióxido cloro activado del enjuague bucal. Además, el enjuague de este compuesto, cuando se utiliza como un complemento al tratamiento periodontal convencional, puede ayudar a promover la salud periodontal mediante la neutralización de organismos bacterianos y subproductos ⁽¹⁵⁾.

Carvalho Weyne S, et al., en Brasil en el 2011, estudiaron “El efecto de un enjuague bucal que contiene dióxido de cloro en la reducción clínica de compuestos volátiles de azufre”. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto clínico de un enjuague bucal que contiene 0,3 % de dióxido de cloro en la reducción de compuestos de azufre volátil (VSC) por vía oral. Este estudio fue un estudio aleatorizado, Double Blind, cruzado, controlado con placebo, ensayo clínico, con un período de lavado de al menos 15 días entre los tratamientos. Los resultados del presente estudio demuestran que la halitosis se puede reducir con éxito por el enjuague bucal de ensayo que contenía 0,3 % ClO₂, 0,07 % CPC, y 0,05 % NaF, basado sobre su eficacia en la reducción de los niveles de CAV de hasta 3 horas, similar a CHX. No hubo diferencia entre la solución de ensayo y la solución CHX en las tasas de reducción de VSC ⁽⁶⁾.

Shinada K, et al., en Japón en el 2010, estudiaron “*Los efectos de un enjuague bucal con dióxido de cloro sobre los malos olores y bacterias salivales orales*”. Este ensayo clínico fue un diseño aleatorizado, doble ciego y cruzado con un período de lavado de 7 días y controlado con placebo. Los resultados mostraron que el enjuague bucal que contiene dióxido de cloro mejoró el mal aliento de la mañana y redujo las concentraciones de sulfuro de hidrógeno (H₂S), metil mercaptano (CH₃SH) y sulfuro de dimetilo [(CH₃)₂S] medidos mediante cromatografía de gases en sujetos sanos. Por otra parte, el enjuague bucal que contiene dióxido de cloro, utilizado durante un período de 7 días, fue eficaz en la reducción de la placa, la acumulación de recubrimiento de la lengua y los cargos de *Fusobacterium nucleatum* en la saliva ⁽¹³⁾.

Peruzzo D C, et al., en Brasil en el 2006, estudiaron “El uso de 0,1 % de dióxido de cloro para inhibir la formación de compuestos volátiles de azufre de la mañana (VSC)”. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de inhibición de VSC de un enjuague bucal (dióxido de cloro 0,1 %) disponible en el mercado en comparación con su placebo. Un estudio doble ciego de 2 pasos, cruzado, aleatorizado se llevó a cabo con 14 estudiantes de odontología con periodonto sano,

que se abstuvieron de cualquier control mecánico de la placa de revestimiento y la lengua durante dos períodos experimentales de 4 días. Los resultados sugieren que un enjuague bucal que contiene dióxido de cloro parece mantener los compuestos volátiles de azufre (VSC) en los niveles inferiores de la respiración de la mañana cuando se compara con un enjuague bucal o con un placebo ⁽¹⁶⁾.

2.2 BASES TEÓRICAS

2.2.1 Ecología de la Cavidad Bucal

La ecología comprende el estudio de las relaciones entre los microorganismos y el ambiente. La cavidad bucal se considera un ambiente, y sus propiedades influyen en la composición y la actividad de los microorganismos. El sitio donde los microorganismos crecen es el habitat. Los microorganismos que permanecen y se desarrollan en un habitat particular constituyen una comunidad microbiana ⁽¹⁷⁾.

A. Origen y desarrollo de la flora microbiana oral

La cavidad bucal del feto en el útero se encuentra libre de gérmenes. A partir del nacimiento dicha cavidad queda expuesta a microorganismos del tracto vaginal materno, donde aparecen microorganismos tales como especies de Corinebacterias, Lactobacilos, Coliformes y cocos anaerobios facultativos, anaerobios estrictos y algunas veces protozoos. Los microorganismos que colonizan al recién nacido a partir de las ocho horas del alumbramiento constituyen la denominada comunidad pionera ⁽¹⁷⁾. Los primeros en instalarse y los más numerosos son los estreptococos (*Streptococcus* grupo *Salivarius*) en la lengua, las mucosas y libres en la saliva. Pueden identificarse otros generos: estafilococos, lactobacilos, neumococos, coliformes, sarcinas, *Neisseria*, *Haemophilus* y *Candida albicans*. El más común, que se aísla de la boca de los recién nacidos, es el *Streptococcus salivarius* y junto con el *staphylococcus albus*, la especie *Neisseria* y la *Veillonella* forman el conglomerado inicial ⁽¹⁸⁾.

Infancia y niñez: La erupción de los dientes temporales proporciona una superficie diferente para la adherencia microbiana y esto se caracteriza por la aparición del *Streptococcus sanguis* y *Streptococcus mutans* como habitantes regulares de la cavidad bucal. Con el aumento en el número de dientes y los cambios en la alimentación se modificarán las proporciones globales de los microorganismos. Unos cuantos anaerobios llegan a establecerse pero como el surco gingival no es profundo, su número permanece pequeño. Habitualmente se encuentran actinomicetos, lactobacilos y Rothia ⁽¹⁸⁾.

Adolescencia: Se incrementa el número de microorganismos en la boca por la erupción de los dientes permanentes. Los espacios interproximales son mucho mayores que en la dentición temporal pues los dientes tienen un "cuello" más pronunciado en la unión amelocementaria. El surco gingival es más profundo que en los dientes temporales y permite un incremento mayor en los microorganismos anaerobios. La especie *Bacteroides* queda fijada en cantidad abundante, así como las especies

Leptotrichia, *Fusobacterium* y las *espiroquetas*. Las lesiones de la caries dental crearán un ambiente nuevo en el cual surgirán algunos microorganismos, en especial, estreptococos ⁽¹⁸⁾.

Edad adulta: Puede haber cantidades variables de placa dental y el grado de enfermedad periodontal crónica estará en relación al número y tipos de microorganismos encontrados ⁽¹⁸⁾.

De acuerdo con las tendencias observadas en el adolescente hay un incremento en la especie *Bacteroides* y las *espiroquetas* con el avance de la enfermedad periodontal y la madurez de la placa dental. La placa superficial contiene numerosos estreptococos, principalmente *Streptococcus mutans* y *sanguis*. También se aíslan con regularidad actinomicetos y otros filamentos grampositivos y gramnegativos ⁽¹⁷⁾.

Conforme los dientes se pierden, el número de sitios disponibles para la colonización microbiana disminuye; se

reduce la cantidad de bacterias y varias especies disminuyen en cantidades desproporcionadas. Los individuos edéntulos albergan pocas espiroquetas y bacteroides pero aumenta el número, de levaduras ⁽¹⁷⁾.

B. Factores que afectan el desarrollo de los microorganismos en la cavidad bucal

Factores físico-químicos

- **Temperatura:** La temperatura de la cavidad bucal oscila entre 35 y 36 °C. Esta temperatura resulta óptima para el desarrollo de un amplio espectro de microorganismos. Los factores que pueden ser influidos por la temperatura incluyen pH, actividad iónica, solubilidad de los gases y agregación de macromoléculas ⁽¹⁷⁾.
- **Potencial de óxido-reducción (Eh):** Los niveles de óxido-reducción suelen ser expresados como potencial redox (Eh). Se han demostrado potenciales de óxido-reducción de +30 a 310 mV para la lengua, la saliva y la

encia adherente y otros tan bajos como -200 mV para la biopelícula coronaria y -360 mV para el área del surco gingival. En la cavidad bucal y especialmente en la biopelícula dental hay diversos gradientes de concentración de O₂ y Eh. Los microorganismos con gran capacidad de tolerancia al oxígeno pueden sobrevivir en el biofilm durante más tiempo ⁽¹⁷⁾.

- **Concentración de Hidrogeniones (pH):** El pH está regulado por la saliva. El pH salival normal oscila entre 6,5 y 7. Los niveles de acidez de la biopelícula dental dependen de la cantidad de ácido producido por los microorganismos del biofilm. Las bacterias que producen cantidades importantes de ácido como los *S. mutans* y *Lactobacillus spp.* se conocen como acidogénicas ⁽¹⁷⁾.
- **Dióxido de Carbono:** Numerosos microorganismos depende de la presencia de dióxido de carbono para su crecimiento y desarrollo; para muchas especies la concentración necesaria es de alrededor del 0,03 % ⁽¹⁷⁾.

- **Nutrientes**

Nutrientes Exógenos

- **Hidratos de carbono:** Los carbohidratos exógenos son utilizados por los microorganismos de la placa cariogénica para producir energía, conformar la matriz de la placa y generar un medio ácido que actúa como factor limitante, porque permite el desarrollo de microorganismos acidógenos y acidúricos, como los estreptococos y los lactobacilos ⁽¹⁷⁾.
- **Degradación de aminoácidos:** Algunas bacterias originan amoníaco a partir de la arginina, cadaverina a partir de la lisina o histamina a partir de la histidina, originan compuestos que pueden ser utilizados como fuente de nitrógeno por otros microorganismos ⁽¹⁷⁾.

Nutrientes Endógenos

- **Fluido gingival:** El fluido gingival o crevicular es un derivado del suero que se encuentra en el surco gingival. En él se detectan albúmina, glucoproteínas, lipoproteínas, hemina M, alfa 2-globulina, son imprescindibles para el desarrollo de las bacterias del biofilm subgingival ⁽¹⁷⁾.

Nutrientes provenientes de interacciones bacterianas

Las bacterias denominadas primeros consumidores, utilizan únicamente los productos disponibles; elaboran como fruto de su metabolismo sustancias que otras bacterias aprovechan y por eso a esas se las denomina consumidores secundarios ⁽¹⁷⁾.

C. Flora microbiana salival

La saliva contiene 99 % de agua y 1 % de sólidos disueltos, los sólidos pueden ser diferenciados en tres

grupos: componentes orgánicos proteicos, los no proteicos y los componentes inorgánicos o electrolitos. Entre los componentes orgánicos se encuentra carbohidratos, lípidos, aminoácidos, inmunoglobulinas (IgA, IgM, IgG), proteínas ricas en prolina, glucoproteínas, mucinas, histinas, esterinas, cistatinas, urea, ácido úrico, lactato y algunas enzimas, tales como alfa amilasas, peroxidasa salivales y anhidrasas carbónicas. La saliva presenta, además gases disueltos como nitrógeno, oxígeno, y dióxido de carbono ⁽¹⁹⁾.

La saliva es incolora, insípida, inodora, algo espumosa y muy acuosa ⁽²⁰⁾. El volumen de saliva segregado por una persona varía entre 700 y 800 ml diarios con un promedio de 0,3 ml por minuto ⁽²¹⁾.

Los microorganismos que forman lo que se denomina flora de la saliva son todos los que se han desprendido de los sitios diversos de la cavidad bucal en donde se han asentado poblaciones bacterianas (piezas dentarias, lengua, mucosa de los carrillos y membranas mucosas de la faringe). La saliva del ser humano tiene aproximadamente 6000 millones

(6 x 10⁹) de bacterias por mililitro, entre las cuales están *streptococos*, *peptostreptococos*, *Veillonella*, *Corynebacterium*, *Neisseria*, *Nocardia*, *Fusobacterium*, *Bacteroides*, *lactobacilos*, *Actinomyces*, *espiroquetas*, *levaduras*, *protozoarios* y otras ⁽¹⁹⁾.

Las investigaciones realizadas para conocer la posible fuente de bacterias en la saliva indican que *S. salivarius* comprende 47 % de los estreptococos facultativos presentes en la saliva ⁽¹⁹⁾.

2.2.2 Dióxido de cloro

Tanto el dióxido de cloro (ClO₂) como su precursor, clorito de sodio (NaClO₂), son oxidantes fuertes con conocidas propiedades biocidas y viricidas. Este gas fue producido por primera vez en 1811 por Humphrey Davy haciendo reaccionar ácido sulfúrico (H₂SO₄) y clorato potásico (KClO₃). Más tarde fue introducido como blanqueante de pulpa de madera para la industria papelera y aún hoy es ampliamente utilizado. Como desinfectante de agua se usó por primera vez en Ostende

(Bélgica) a principios del siglo XX. De hecho, gran parte de los estudios científicos se centran en su uso en el tratamiento del agua, desde que en los años 70 se descubriera la producción de trihalometanos (THM) durante el proceso de cloración. Su ventaja frente al cloro (Cl_2) es que no genera estos trihalometanos ⁽²²⁾.

Fue usada terapéuticamente por primera vez en 1926 a una concentración de 3,5 % con el nombre de oxígeno estabilizado por el Dr. William Koch quien lo aplicó en niños con retraso mental esperando que tras su ingesta liberaría oxígeno no tóxico en el cerebro y estos mejorarían, sin embargo no sucedió de esa forma pues el oxígeno liberado se combinaba con los hidrógenos del organismo y se transformaba en agua.

Luego de muchos años se volvió a estudiar científicamente sus posibilidades terapéuticas, en 1990 Yu-Shiaw Chen y James M. Vaughn dieron a conocer un trabajo titulado Applied and environmental microbiology que presentaron ante la American Society for Microbiology sobre el papel del Dióxido de Cloro en la eliminación de rotavirus en

monos y hombres. Posteriormente en el 2000, el Dr Friederich W. Kuhne aprovecharía lo que había leído y lo patentaría en Estados Unidos (patente nº 6.086922) como tratar el VIH y el Sida con dióxido de cloro. Finalmente Jim Humble descubrió el dióxido de cloro por casualidad usándolo para tratar la malaria. Llegando a la conclusión de que combinando clorito sódico diluido en agua al 28 % con un ácido débil como el ácido cítrico e ingerido disuelto en agua generaba un gas el dióxido de cloro que se dice tiene efectos sorprendentes en caso de malaria.

El dióxido de cloro, se encuentra bajo regulación FDA, Capítulo 21 CRF 178,1010 como agente desinfectante de superficies de industrias alimentarias, FDA, Capítulo 21 CRF 173,300 como aditivo secundario de alimentos, es decir en el tratamiento de agua potable y en el lavado de frutas, vegetales y otros. Según la FDA (2001) las concentraciones no deben superar los 5 ppm para el tratamiento de frutas y hortalizas sin pelar. El uso de clorito acidificado (Dióxido de Cloro), en concentraciones entre 500 y 1200 ppm, ha sido aprobado como sanitizante de frutas y verduras por la FDA de Estados Unidos.

Se aprueba su uso en conjunto con ácidos reconocidos como seguros, tanto para baño como para aplicación por aspersión ⁽²³⁾.

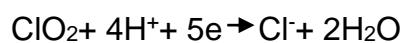
2.2.2.1 Características

- Es considerado el más eficiente bactericida, fungicida, virucida y algicida.
- Aprobado para potabilización de agua por la EPA y aprobado por la FDA como desinfectante de alimentos.
- Efectivo a bajas concentraciones.
- Acción más rápida.
- Eficaz a pH variable.
- No permite la transferencia de información genética para el desarrollo de bacterias resistentes.
- No forma compuestos tóxicos y no deja residuos.
- Diez veces más soluble que el cloro en el agua.

2.2.2.2 Propiedades

Es un gas de color verde amarillento con un peso molecular de 67,46. Es estable y sumamente soluble en soluciones acuosas de hasta 20 g/l. Además de sus propiedades biocidas, el dióxido de cloro mejora la calidad del agua potable, es decir, neutraliza olores, remueve el color y oxida al hierro y al manganeso ⁽²⁴⁾.

Una de las propiedades más interesantes del dióxido de cloro es su eficacia biocida en un amplio rango de pH (3 a 9). Es sensible a la luz ultravioleta y su capacidad de oxidación se incrementa con la acidez ⁽²⁴⁾.



Debido a que este compuesto existe como un gas inestable, el producto no puede comprimirse ni distribuirse en cilindros como el cloro gaseoso. Este gas aunque soluble y estable en agua es altamente

explosivo bajo presión. Debe producirse in situ mediante el uso de un generador mecánico ⁽²⁵⁾.

2.2.2.3 Mecanismo de acción del Dióxido de Cloro

Tiene una amplia acción biocida, siendo especialmente útil como fungicida y bactericida ⁽²⁶⁾. Es un oxidante, biológicamente muy efectivo en concentraciones relativamente bajas a pH entre 5 y 10. Presenta múltiples sitios de acción bioquímica sobre los microorganismos, interfiriendo la acción de algunas proteínas, del ácido ribonucleico y altera la funcionalidad de las membranas celulares ⁽²⁴⁾.

El producto posee alta acción desinfectante, actúa directamente inhibiendo la formación de proteínas y ácidos nucleicos, y su efectividad depende solo de la velocidad del metabolismo de los microorganismos, abarcando un amplio rango, elimina microorganismos por acción a nivel de ciclo de Krebs en los microorganismos modificando la codificación del RNA,

provocando que el microorganismo no sintetice ácidos nucleicos ni proteínas por lo tanto mueren por inanición sin dejar información genética de resistencia (Acción virucida) ⁽²⁷⁾.

La investigación reciente en los Estados Unidos y Canadá demuestra que el dióxido de cloro destruye enterovirus, *E. coli* y amebas y es efectivo en la destrucción de patógenos como *Giardia* y *Cryptosporidium* ⁽²⁶⁾.

Acción microbicida

El dióxido de cloro existe en el agua como ClO_2 (poca o ninguna disociación) y, por lo tanto, puede pasar a través de las membranas celulares de las bacterias y destruirlas. El efecto que tiene sobre los virus incluye su adsorción y penetración en la capa proteica de la cápside viral y su reacción con el RNA del virus. Como resultado, se daña la capacidad genética del virus ⁽²⁸⁾.

La efectividad del dióxido de cloro depende del pH final de la solución, disminuyendo considerablemente en la medida que el pH aumenta entre 7 y 10. En efecto, el pH sube al aumentar la concentración de dióxido de cloro mientras que la efectividad biocida disminuye, Por lo tanto, la recomendación de uso de dióxido de cloro formulado requiere verificar o modificar el pH para optimizar la capacidad de sanitización de este producto ⁽²⁷⁾.

Acción oxidante

La acción oxidante a menudo mejora el gusto, olor y color del agua. Reacciona en el agua con compuestos fenólicos, sustancias húmicas, sustancias orgánicas e iones metálicos. Por ejemplo, el dióxido de cloro oxida el hierro, el cual se precipita fuera del agua como hidróxido de hierro. Luego, el precipitado se remueve fácilmente mediante filtración ⁽²⁹⁾.

Reacciona con sustancias orgánicas, generalmente por oxidación, y forma pocos compuestos orgánicos clorados. Oxida al ácido húmico, un precursor de los THM, con lo que minimiza la formación de compuestos halogenados en el tratamiento secundario (29).

2.2.2.4 Proceso de generación del Dióxido de cloro

El dióxido de cloro puede ser generado en el lugar, cuando y donde se necesita por varios métodos. Un método consiste en hacer reaccionar la sal de clorito de sodio (NaClO_2) con un ácido (un compuesto que contiene iones de hidrógeno, H^+ , tales como HCl ácido clorhídrico) de acuerdo con la reacción:



A medida que el gas dióxido de cloro destruye los patógenos mediante la interrupción de las membranas celulares, se rompe en gran parte hacia abajo para

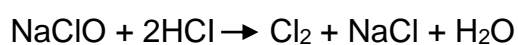
formar agua salada (tenga en cuenta el Na⁺ y Cl⁻ iones en el lado del producto de la reacción), por lo que es un desinfectante amigable con el medio ambiente ⁽³⁰⁾.

Comúnmente se genera mediante la reacción de clorito de sodio con cloro gaseoso (sistema de 2 compuestos químicos) o mediante la reacción de clorito de sodio con hipoclorito de sodio y ácido clorhídrico (sistema de 3 compuestos químicos) ⁽³¹⁾.

Proceso de generación del dióxido de cloro con dos compuestos químicos ⁽³¹⁾:



Proceso de generación del dióxido de cloro con tres compuestos químicos ⁽³¹⁾:



No existe ningún estándar industrial para el rendimiento de los generadores de dióxido de cloro ⁽³¹⁾.

2.2.2.5 Mecanismos Farmacocinéticos

El dióxido de cloro es químicamente reactivo cuando se ingiere. Ningún órgano en particular parece concentrarse selectivamente los subproductos después de la exposición ⁽³²⁾.

Después de la ingestión oral de los monos, el dióxido de cloro se convierte rápidamente en iones cloruro y, en menor medida, clorito y clorato ⁽³³⁾. En ratas, la excreción de cloruro y, en menor medida, ion clorito es principalmente a través de la orina, siendo cantidades menores excretado en las heces ⁽³⁴⁾. A niveles bajos típicos de agua potable, el dióxido de cloro se descompone por reacciones de oxidación-reducción con la saliva y el contenido del estómago ⁽³⁵⁾.

Absorción: No se encontró información acerca de los mecanismos de absorción de dióxido de cloro. Al ser un fuerte oxidante, es probable que sufra reacciones redox rápidos dentro de los tejidos biológicos en lugar de ser absorbido como compuesto original. Niveles de clorito se han medido en la orina después de la exposición oral a dióxido de cloro o clorito, lo que indica que un cierto grado de clorito la absorción se produce a través del tracto digestivo. Debido a la naturaleza altamente reactiva del Clorito, en sí mismo un fuerte oxidante, se esperaría que la absorción ocurra a través de la difusión pasiva en vez de mecanismos de transporte activo ⁽³⁶⁾.

Distribución: No se encontró información sobre el transporte de dióxido de cloro en la sangre. Sin embargo, basado en el hecho de que la fuerte propiedad oxidante del dióxido de cloro probablemente se traduce en la conversión rápida a clorito (también un oxidante fuerte) en los sistemas biológicos, y en última instancia a cloruro de iones, sería de esperar que la distribución seguiría patrones de distribución iónicos normales ⁽³⁶⁾.

Metabolismo: Aunque no se encontró información sobre los mecanismos del metabolismo del dióxido de cloro y el clorito en la transformación final a los iones de cloruro es probable que se logre a través de las reacciones redox con una variedad de sustancias en sistemas biológicos que se oxidan fácilmente ⁽³⁶⁾.

Excreción: No se encontró información acerca de los mecanismos específicos de excreción del dióxido de cloro, clorito, o sus metabolitos. Sin embargo, ya que el ion cloruro es el producto de excreción principal de dióxido de cloro y clorito, se esperaría que los mecanismos excretores sean similares a los responsables de la excreción de otros iones ⁽³⁶⁾.

2.2.2.6 Perfil toxicológico

La OSHA (Administración de Salud y Seguridad en el Trabajo) regula el nivel de dióxido de cloro en el aire en el ambiente ocupacional. El límite de exposición ocupacional al dióxido de cloro para una jornada de 8 horas diarias, 40 horas por semana es de 0,1 partes por millón (0,28 miligramos por metro cúbico mg/m^3). La EPA (Agencia de Protección del Medio Ambiente), ha establecido una concentración máxima permitida en agua potable de 0,8 miligramos de dióxido de cloro por litro de agua (mg/L) y 1,0 mg/L del ión de clorito. Debido a que el dióxido de cloro se descompone rápidamente en el aire formando cloro gaseoso y oxígeno, es improbable que se respire niveles peligrosos de dióxido de cloro. Cuando reacciona en el agua, forma iones clorito, clorato y cloruro ⁽³⁶⁾.

El dióxido de cloro y el clorito actúan rápidamente cuando entran al cuerpo transformándose rápidamente a iones de clorito, los cuales se descomponen hasta

convertirse en iones de cloruro. En el cuerpo, estos iones son utilizados en muchos procesos normales. Algunos iones de cloruro abandonan el cuerpo, principalmente en la orina, en cuestión de horas o días. La mayoría del clorito que no se descompone también abandona el cuerpo en la orina unos cuantos días luego de la exposición al dióxido de cloro o al clorito ⁽³⁶⁾.

El dióxido de cloro y el clorito son agentes oxidantes fuertes que reaccionan fácilmente al entrar en contacto directo con los tejidos biológicos, lo que resulta en irritación local, mecanismos por el cual ejercen efectos hematológicos tales como metahemoglobinemia en los seres humanos y animales. Alteraciones en otros factores de la sangre no se conocen actualmente ⁽³⁶⁾.

En estudios de hasta doce semanas con voluntarios no se observó ningún efecto sobre los parámetros sanguíneos con la dosis más alta evaluada (36 µg/kg de peso corporal al día) ⁽³⁶⁾.

Efectos sistémicos:

a) Efectos respiratorios

Se dispone de una información muy limitada sobre los efectos respiratorios en los seres humanos después de la exposición oral a dióxido de cloro o clorito. Sin embargo se presentó dificultad respiratoria en un paciente que había ingerido 10 g de clorito de sodio disuelto en 100 ml de agua en un aparente intento de suicidio ⁽³⁷⁾. Si se respira aire que contiene grandes cantidades de dióxido de cloro gaseoso, podría sufrir irritación de la nariz, la garganta, y los pulmones ⁽³⁶⁾.

b) Efectos gastrointestinales

La información relativa a los efectos gastrointestinales en los animales después de la exposición oral a dióxido de cloro o clorito es limitada. Informaron de eritema y ulceración de la

mucosa oral en monos verdes africanos adultos expuestos a dióxido de cloro en el agua de bebida durante 30 y 60 días a una concentración que dio lugar a una dosis de aproximadamente 9 mg/kg/día ⁽³⁸⁾.

Relacionada con la dosis, mayor gravedad de la salivación y alteraciones histopatológicas en el estómago (incluyendo hiperplasia escamosa epitelial, hiperqueratosis, ulceración, inflamación crónica, y edema) se observaron en los grupos de ratas administradas con clorito de sodio en dosis de alimentación por sonda de 25 o 80 mg/kg/día (equivalente a 19 o 60 mg de clorito/kg/día, respectivamente) durante 13 semanas; estos efectos no se observaron a una dosis de 7,4 mg de clorito/kg/día ⁽³⁹⁾.

c) Efectos hematológicos

No se observaron parámetros hematológicos alterados en sujetos varones adultos que consumieron dióxido de cloro en solución acuosa que resultó en una sola dosis de aproximadamente 0,34 mg/kg de dióxido de cloro o en otros adultos varones que consumieron aproximadamente 0,04 mg/kg/día durante 12 semanas ⁽⁴⁰⁾.

No se observaron efectos hematológicos con dióxido de cloro o clorito en los habitantes de un pueblo rural que fueron expuestos durante 12 semanas a través de dióxido de cloro en el agua potable en concentraciones medidas semanalmente entre 0,25 y 1,11 mg/L (dióxido de cloro) ⁽⁴¹⁾.

d) Efectos hepáticos

No hay indicios de efectos hepáticos adversos observados en sujetos varones adultos que

consumieron dióxido de cloro en solución acuosa que resultaron en una dosis de aproximadamente 0,34 mg/kg o en otros adultos varones que consumieron aproximadamente 0,04 mg/kg/día durante 12 semanas ⁽⁴²⁾ ⁽⁴³⁾.

e) Efectos renales

No hay alteración de la función renal con dióxido de cloro en los habitantes de un pueblo rural que fueron expuestos durante 12 semanas a través de dióxido de cloro en el agua potable en concentraciones medidas semanales oscila entre 0,25 y 1,11 mg/L (dióxido de cloro) ⁽⁴⁴⁾.

f) Efectos endocrinos

No hay informes que manifiesten que los efectos endocrinos podrían estar asociados con la exposición oral a dióxido de cloro o clorito en los seres humanos. Los estudios en animales se limitan

a la reducción significativa en los niveles de la hormona tiroidea T4 en monos verdes africanos que consumieron aproximadamente 9 mg de dióxido de cloro/kg/día desde el agua de bebida durante 6 semanas o aproximadamente 58,4 mg de clorito/kg/día durante 8 semana ⁽³⁸⁾.

g) Efectos peso corporal

No hay informes en la que los efectos del peso corporal pueden estar asociados con la exposición oral al dióxido de cloro o clorito en los seres humanos.

Sin embargo se redujo significativamente el aumento de peso corporal (hasta un 18 % más bajo que los controles) en ratas macho expuestas a dióxido de cloro en el agua de bebida durante 11 meses a concentraciones resultantes en dosis estimadas que van desde 0,12 hasta 120 mg/kg/día ⁽⁴⁵⁾.

h) Efectos Inmunológicos y Linforreticular

No hay informes en la que los efectos inmunológicos o linforreticulares podrían estar asociados con la exposición oral a dióxido de cloro o clorito en los seres humanos.

Los datos en animales se restringen a las cuentas limitadas de alteración del peso del timo y el bazo relacionados con el tratamiento ⁽⁴⁶⁾.

i) Efectos neurológicos

No hay informes en la que los efectos neurológicos podrían estar asociados con la exposición oral a dióxido de cloro o clorito en humanos o animales.

j) Efectos sobre la reproducción

No hay informes en la que los efectos reproductivos podrían estar asociados con la exposición oral a dióxido de cloro o clorito en los seres humanos.

Existe una escasez de pruebas de efectos reproductivos en animales después de la exposición oral a dióxido de cloro o clorito. Ligera, pero significativamente alterado la morfología y motilidad de los espermatozoides se observaron en ratas macho expuestas a clorito de sodio en el agua de bebida durante 66 - 76 días a concentraciones que dieron lugar a las dosis estimadas de clorito 9 y 37 mg/kg/día. No hay alteraciones relacionadas con la dosis en las tasas de fertilidad o tejidos reproductores (tanto el examen macroscópico e histopatológico) fueron vistos y no se observaron efectos adversos en un nivel de dosis de clorito de 0,9 mg/kg/día ⁽⁴⁷⁾ ⁽⁴⁸⁾.

k) Cáncer

No hay informes situados en el que el cáncer podría estar asociado con la exposición oral al dióxido de cloro en los seres humanos.

l) La exposición dérmica

No hay informes respecto a los efectos adversos en los seres humanos después de la exposición dérmica a dióxido de cloro o clorito. No se sabe si es posible absorber dióxido de cloro o clorito a través de la piel.

La información disponible en los animales se limita a un informe de que una solución que contiene las concentraciones de dióxido de cloro de aproximadamente 9,7 a 11,4 mg/L era irritante para la piel de los ratones en un ensayo de 48 horas ⁽³⁶⁾.

La exposición cutánea a altas concentraciones da lugar a irritación, debido a las propiedades oxidantes de dióxido de cloro y el clorito. El clorito de sodio no fue carcinogénico en ratones tratados por vía dérmica durante 51 semanas ⁽³⁶⁾.

No hay informes respecto a la muerte en los seres humanos o los animales después de la exposición cutánea a dióxido de cloro o clorito.

m) Genotoxicidad

No hay informes sobre la genotoxicidad de dióxido de cloro o clorito en los seres humanos.

El potencial genotóxico de dióxido de cloro y el clorito se ha evaluado en una serie de sistemas de prueba de genotoxicidad estándar, lo que resulta en resultados positivos y negativos. El dióxido de cloro no fue mutagénico (ya sea con o sin activación

metabólica) en un ensayo Ames de cepas de Salmonella typhimurium TA 97, TA98, TA100 y TA102 ⁽⁴⁹⁾, pero una respuesta débilmente positivo (sin activación metabólica) en la cepa TA100 se observó en otro ensayo de Ames. El dióxido de cloro no aumentó aberraciones cromosómicas en células de hámster chino ⁽⁵⁰⁾.

2.3 DEFINICIÓN DE TÉRMINOS

Antimicrobiano: Sustancia que impide el desarrollo de los microorganismos: bacterias, hongos, protozoos y virus.

Bactericida: Que destruye o lisa las bacterias.

Compuestos de azufre volátiles (vsc): Son compuestos sulfúricos volátiles, como el sulfuro de hidrógeno, mercaptano de metilo, sulfuro de dimetilo y otras sustancias químicas (cadaverina y putrescina, diaminas fétidas), son en parte, responsables por el olor de que se quejan los pacientes con halitosis.

Flora salival: Géneros y especies microbianas presentes en la saliva.

Halitosis: También conocida como mal aliento, es un conjunto de olores desagradables que se emiten por la boca. El mal aliento de origen bucal, surge generalmente por procesos de putrefacción provocados por bacterias. Las bacterias producen productos metabólicos sulfurados que son la causa real del mal aliento.

Halo de Inhibición: zona alrededor de un disco en el que no se produce crecimiento bacteriano en una placa de agar inoculada con el germen.

Saliva en reposo o no estimulada: Se define como aquella que es producida espontáneamente, en ausencia de estímulos salivales exógenos o farmacológicos y en situación de relajación.

Saliva estimulada: Es la que se obtiene después de haber sometido al sujeto a estímulos por una variedad de agentes (gustatorios y masticatorios) como cera o parafina. Difiere de la de reposo no solamente por la cantidad, sino también por presentar cambios en su composición.

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

3.1 Tipo y diseño de la investigación

3.1.1 Tipo de la investigación

Aplicada: Porque busca la aplicación o utilización de los conocimientos que se adquieren, hace uso de los métodos del pasado o teorías de la investigación básica para resolver un problema existente.

Transversal: Todas las variables son medidas en una sola ocasión; por ello de realizar comparaciones, se trata de muestras independientes.

Prospectivo: Porque el registro de los datos necesarios para el estudio son recogidos después de efectuado el experimento.

3.1.2 Diseño de investigación

Cuasi-Experimental: Porque manipula al menos una variable independiente para observar su efecto y relación con una o más variables dependientes.

3.1.3 Nivel de investigación

Explicativa: porque tienen la finalidad de explicar el comportamiento de una variable en función de otra u otras.

3.2 Población y Muestra

3.2.1 Población

La población estuvo conformada por 160 muestras de saliva de los estudiantes de la escuela de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Jorge Basadre Grohmann.

3.2.2 Muestra

Estuvo conformada por 25 muestras de saliva. El tipo de muestreo fue no probabilístico a conveniencia, debido a que antes de tomar las muestras de los participantes, se verificó si estos cumplían los criterios de inclusión y exclusión.

3.3 Técnicas e instrumentos para la recolección de datos

3.3.1 Selección del paciente

Para la selección de los participantes se tuvo en cuenta los siguientes criterios:

a) Criterios de inclusión

- No haberse cepillado los dientes antes del tratamiento por lo menos en una hora.
- Pacientes que firmaron su consentimiento informado para la obtención de muestra.
- Participantes en buen estado de salud general.

- Participantes que no estén recibiendo medicación antibiótica, antiséptica, o antiinflamatoria.
- No tener hábito de consumo de alcohol o droga.

b) Criterios de exclusión

- Participantes que estén usando enjuagues bucales de cualquier tipo.
- Participantes que tengan enfermedad periodontal de forma generalizada.
- Participantes que estuvieron con medicación antibiótica.
- Participantes que tengan enfermedades sistémicas.

El trabajo se realizó en los ambientes del laboratorio de Microbiología de la escuela de Farmacia y Bioquímica de la universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann.

3.3.2 Obtención del Dióxido de Cloro a diferentes concentraciones

En este trabajo se utilizó dióxido de cloro (ClO₂) formulado como HIDROCHLORR-100DC (HYDROTECH PERÚ IMPORT

E.I.R.L, Lima Perú) que contiene 10 % (100 000 ppm) de dióxido de cloro, estabilizado, sin cloro libre u otros cloritos y carente de efecto residual.

Las diferentes concentraciones de dióxido de cloro se obtuvieron diluyendo el producto formulado con agua destilada, libre de fuentes de cloro, en el mismo día de uso, ajustando el pH con HCl al 4 %, hasta obtener un pH óptimo de 5 - 6.

La obtención del dióxido de cloro a la concentración de 0,03 % se realizó de la siguiente manera:

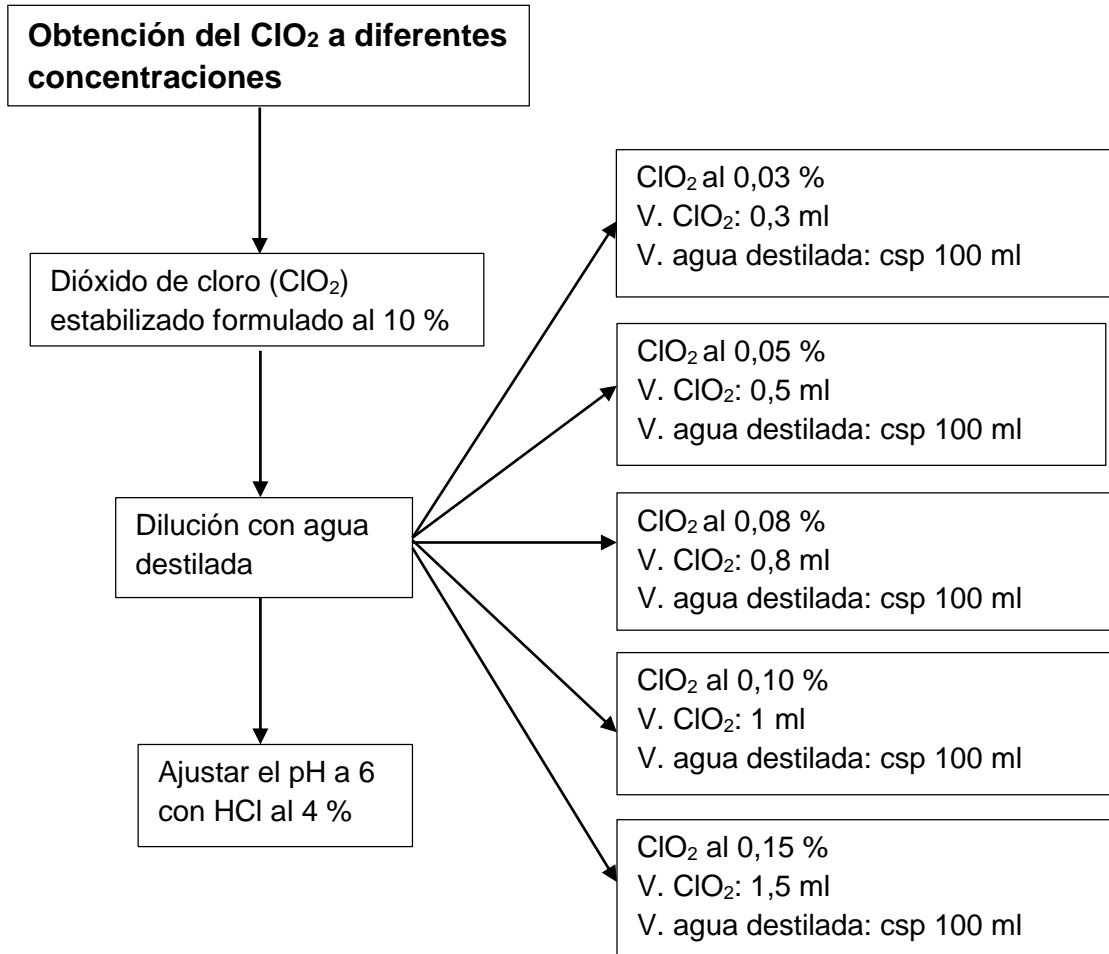
$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$10 \% \times V_1 = 0,03 \% \times 100 \text{ ml}$$

$$V_1 = 0,3 \text{ ml}$$

Colocamos en un frasco 0,3 ml de Dióxido de Cloro al 10 % y completamos hasta 100 ml con agua destilada. Ajustamos el pH inicial de 7,5 a 6 empleando HCl al 4 %. Se realizó el mismo procedimiento para las demás concentraciones de dióxido de cloro.

DIAGRAMA DE FLUJO



3.3.3 Obtención de la muestra Salival

Se procedió a la recolección de muestras de saliva no estimulada de los participantes seleccionados de la escuela de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Jorge Basadre Grohmann, en frascos estériles en un volumen mínimo de 2 ml de saliva por persona. La muestra fue transportada al laboratorio y se procedió a procesarla dentro de los 30 minutos.

3.3.4 Estandarización de la muestra salival

La muestra se estandarizo comparándola con la escala de turbidez del tubo N° 0,5 de la escala de Mc Farland.

3.3.5 Siembra de la muestra

Bajo condiciones estériles se procedió a sembrar por diseminación con asa bacteriológica 100 µl de la muestra salival estandarizada en placas Petri que contenían Agar Tripticasa Soya (TSA). Utilizándose el método de difusión en agar. Se dejó de 3 a 5 minutos para el secado.

3.3.6 Preparación de los discos de sensibilidad con las diferentes Concentraciones del Dióxido de Cloro.

Se utilizó el método de difusión en disco, el cual consistió en preparar discos de papel de filtro estériles, los cuales fueron sumergidos en solución de dióxido de cloro a diferentes concentraciones y en agua destilada.

Con pinzas estériles se procedió a colocar en cada placa discos con un diámetro de 6 mm con 5 ul de agua destilada (Control Negativo) y discos con 5 ul de dióxido de cloro en concentraciones de 0,03 %, 0,05 %, 0,08 %; 0,10 % y 0,15 %.

3.3.7 Incubación

Posteriormente se colocaron las placas Petri en la incubadora a 37 °C por 24 horas para luego proceder con la lectura.

3.3.8 Coloración Gram

Basándose en su reacción a la tinción Gram, las bacterias pueden dividirse en dos grupos: Gram (+) y Gram (-). Las bacterias Gram (+) se ven de color púrpura-violeta y las Gram (-) de color rojizo-rosado.

En un porta se colocó una gota de agua destilada a la cual con el asa de siembra, previamente esterilizada a la llama, se lleva unas colonias que crecieron alrededor de los halos y se procedió a realizar la coloración Gram, al llevarlo al microscopio se observó que estos pertenecían al grupo de bacterias cocos Gram positivos y Gram negativos.

3.3.9 Recolección de Datos

La recolección de datos se realizó de forma manual, para lo cual se utilizaron fichas de datos.

Consentimiento informado

Todos los procedimientos realizados en el presente estudio fueron previamente explicados a los participantes absolviendo cualquier duda e inquietud, preservando la integridad y los derechos fundamentales de los participantes, de acuerdo con los lineamientos de las buenas prácticas clínicas, garantizándose la confidencialidad de los datos obtenidos.

Ficha de recolección de datos

En el presente trabajo se utilizó un instrumento (ver anexo N° 2) que fue llenado por el investigador. A las 24 horas de haber realizado la siembra y posterior incubación a 37 °C se procedió a realizar la lectura y el llenado de la ficha de recolección de datos. El instrumento tuvo la función de recolectar y registrar los datos sobre la medida individual de los halos en mm, formados en cada uno de los discos embebidos con el Dióxido de Cloro a diferentes concentraciones, y agua destilada, tomándose en cuenta los siguientes criterios:

- Identificación de la muestra.
- Identificación de las concentraciones utilizadas.
- Medida en milímetros del halo de inhibición formado.

Análisis de resultados

Para interpretar los resultados del estudio de acuerdo a los objetivos e hipótesis, se midieron y compararon los diámetros de los halos de inhibición, entre las diferentes concentraciones del Dióxido de Cloro. Para la interpretación de los resultados en la evaluación de tipo cuantitativa se tomó como referencia los diámetros de halo de inhibición y para la interpretación de los resultados en la evaluación de tipo cualitativa se tomó como referencia la escala de Duraffourd (1983).

- Nula (-) si fue inferior o igual a 8 mm.
- Sensible (Sensible =+) de 9 a 14 mm.
- Muy sensible (muy sensible =++) de 15 a 19 mm.
- Sumamente sensible (S.S.=+++) si fue igual ó superior a 20 mm.

3.4 Materiales y/o instrumentos

3.4.1 Materiales

- Tubos de ensayo.
- Placas Petri 10x100.
- Pipetas automáticas.
- Pipetas de 1 ml y 5 ml.
- Matraz de 50 ml.
- Vasos precipitados de 200 ml.
- Porta objetos.
- Mechero de vidrio.
- Asa bacteriológica.
- Pinzas.
- Hisopos estériles.
- Frascos de vidrio de 100 ml.
- Envases estériles para toma de muestra.
- Guantes descartables.
- Guantes estériles.
- Mascarilla simple.
- Gorros descartables.

- Papel Whatmann N°41.
- Agar Tripticasa Soya (TSA).
- HCl al 4 %.
- Dióxido de cloro 10 %.
- Suero fisiológico.
- Agua destilada.
- Alcohol 70 %.
- Cristal violeta.
- Lugol.
- Colorante Gram.
- Safranina.
- Tira de pH.

3.4.2 Instrumentos

- Balanza Analítica aeAdam PW124.
- Incubadora BIONET SA. U-53226904-0005.
- Autoclave Solingen 32220025-0007.
- Estufa Tomos ODMG-9030.
- Microscopio Phenix XSP-15A 04020001

3.5 Procesamiento de datos

Los datos obtenidos de la ficha de recolección fueron procesados utilizando el programa estadístico SPSS v24.0 y la base de datos Excel. Los datos se compararon utilizándose el método de análisis estadístico, tales como el promedio, máximo, mínimo, y desviación estándar. Para establecer las diferencias significativas entre las concentraciones se utilizó la prueba de significancia de Tukey. Obteniéndose resultados que serán presentados en tablas y gráficos de acuerdo con los objetivos señalados.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

Basado en los resultados del presente trabajo de investigación *in vitro* para evaluar el efecto bactericida *in vitro* a diferentes concentraciones del dióxido de cloro sobre la flora microbiana salival, se trabajó con 25 muestras para cada dilución, evaluándose la susceptibilidad de la flora microbiana salival por el método de difusión en disco (Kirby Bauer) utilizándose discos de papel filtro, impregnados con dióxido de cloro a la concentración de 0,03 %; 0,05 %; 0,08 %; 0,10 %; 0,15 % y agua destilada, comprobándose la sensibilidad de las bacterias que conforman la flora microbiana salival. Obteniéndose las siguientes tablas y figuras para la mejor interpretación de los resultados.

Tabla N° 1. Halos de inhibición de las diferentes concentraciones de Dióxido de Cloro

| Muestra salival | Dióxido de Cloro (ClO ₂) | | | | | Agua destilada |
|-----------------|--------------------------------------|--------------|-------------|--------------|--------------|----------------|
| | 0,03% | 0,05 % | 0,08 % | 0,10 % | 0,15 % | |
| 1 | 15 | 12,5 | 23,5 | 19,5 | 25 | 6 |
| 2 | 14,5 | 13,5 | 24 | 17,5 | 26 | 6 |
| 3 | 13 | 14 | 25 | 18 | 25,5 | 6 |
| 4 | 13,5 | 16,5 | 23 | 19,5 | 28 | 6 |
| 5 | 15 | 16 | 19 | 19,5 | 27,5 | 6 |
| 6 | 14 | 16,5 | 21,5 | 20 | 26,5 | 6 |
| 7 | 15,5 | 18 | 24,5 | 20 | 29,5 | 6 |
| 8 | 15 | 18,5 | 25 | 19,5 | 31,5 | 6 |
| 9 | 12,5 | 17 | 22,5 | 20,5 | 29 | 6 |
| 10 | 12 | 17 | 23,5 | 21,5 | 30,5 | 6 |
| 11 | 13,5 | 17,5 | 22 | 23 | 27,5 | 6 |
| 12 | 14 | 18 | 23 | 25,5 | 29,5 | 6 |
| 13 | 13 | 20 | 20,5 | 23,5 | 32 | 6 |
| 14 | 13,5 | 17,5 | 19,5 | 22 | 28,5 | 6 |
| 15 | 14,5 | 17 | 18 | 23 | 29 | 6 |
| 16 | 15,5 | 19 | 21 | 22,5 | 29,5 | 6 |
| 17 | 15 | 19,5 | 19,5 | 22 | 30 | 6 |
| 18 | 13,5 | 20 | 20 | 23 | 30,5 | 6 |
| 19 | 12,5 | 18,5 | 19 | 25 | 33,5 | 6 |
| 20 | 13 | 19 | 20,5 | 24,5 | 32,5 | 6 |
| 21 | 14,5 | 16,5 | 20 | 24 | 30 | 6 |
| 22 | 13,5 | 17 | 22,5 | 23,5 | 33,5 | 6 |
| 23 | 15 | 18,5 | 21 | 26 | 31 | 6 |
| 24 | 14 | 19 | 20,5 | 27 | 29 | 6 |
| 25 | 14,5 | 16,5 | 21,5 | 28,5 | 28,5 | 6 |
| PROMEDIO | 13,98 | 17,32 | 21,6 | 22,34 | 29,34 | 6 |

Fuente: Elaboración propia

Todas las concentraciones utilizadas del Dióxido de Cloro presentan efecto bactericida. Este efecto se incrementa conforme va aumentando las concentraciones, aumentando así el halo de inhibición. El menor halo de inhibición obtenido fue de 12 mm, en la muestra 10 a una concentración de

0,03 % y el mayor halo de inhibición fue de 33,5 que se obtuvo de la muestra 19 y 22 a una concentración de 0,15 %.

En cuanto al promedio de los halos los resultados obtenidos indican que el menor promedio de halo que fue de 13,98 mm se obtuvo a la concentración de 0,03 % y el mayor promedio de halo de inhibición fue de 29,34 mm a la concentración de 0,15%.

El agua destilada no presentó halo de inhibición. Los halos de inhibición formados sobre la flora microbiana salival, mediante el método de difusión en disco (Kirby Bauer) se midieron en milímetros.

Tabla N° 2. Grado de sensibilidad de la flora microbiana salival generado por el dióxido de cloro a diferentes concentraciones según la escala de Duraffourd.

| GRADO DE SENSIBILIDAD | CONCENTRACIÓN DE DIÓXIDO DE CLORO | | | | | AGUA DESTILADA |
|--|-----------------------------------|--------|--------|--------|--------|----------------|
| | 0,03 % | 0,05 % | 0,08 % | 0,10 % | 0,15 % | |
| Nula (-) < = 8 mm | | | | | | 6 |
| Sensible (+) 9-14 mm | 13,98 | | | | | |
| Muy sensible (++) 15-19 mm | | 17,32 | | | | |
| Sumamente sensible (+++) 20 mm a mas | | | 21,60 | 22,34 | 29,34 | |
| Total | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 |

Fuente: *Elaboración propia*

En la presente tabla, se observa el grado de sensibilidad de la flora microbiana salival de acuerdo a los promedios de halos de inhibición según la escala de Duraffourd. Se determinó que a la concentración de 0,03 % presentó halos de inhibición catalogado como sensible (+); a la concentración de 0,05 % presentó halos de inhibición catalogado como muy sensible (++); a la concentración de 0,08 %, 0,10 %, 0,15 % presentó halos de inhibición catalogados como sumamente sensibles (+++). El control negativo (Agua destilada) no presentó halos de inhibición, manteniéndose como constante 6 mm que es el diámetro de los disco de papel estéril, obteniéndose una sensibilidad Nula (-).

Tabla N° 3. Análisis de varianza de las comparaciones del efecto bactericida a distintas concentraciones del dióxido de cloro (ClO_2).

| ANOVA | | | | | |
|------------------------------------|-------------------|--------------------|------------------|---------|-------|
| Medida de Halos de inhibición (mm) | | | | | |
| | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Media cuadrática | F | Sig. |
| Entre grupos | 3362,468 | 4 | 840,617 | 189,827 | 0,000 |
| Dentro de grupos | 531,400 | 120 | 4,428 | | |
| Total | 3893,868 | 124 | | | |

Fuente: SPSS Statistics v 24

El modelo del análisis de varianza de un factor del diseño completamente aleatorizado es la ecuación:

$$X_{ij} = \mu_i + \varepsilon_{ij} \quad i = 1, 2, 3, 4, 5 \quad j = 1, 2, \dots, 125$$

1) Formular la hipótesis:

$H_0 : \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 = \mu_5$ (Los tratamientos no difieren entre sí)

$H_1 : \mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3 \neq \mu_4 \neq \mu_5$ (Los tratamientos difieren entre sí)

2) Nivel de significancia:

$$\alpha = 5 \% = 0,05$$

3) Estadístico de prueba:

ANOVA, Prueba de Tukey

4) Decisión

$P = 0,000 < \alpha = 0,05$ entonces se rechaza H_0

5) Conclusión

Al nivel del 5 % de significancia se concluye que existen diferencias significativas entre las medias de las concentraciones del dióxido de cloro $P = 0,000 < 0,05$ (estadísticamente significativo).

Tabla N° 4. Halos de inhibición del efecto bactericida de las distintas concentraciones del ClO₂.

| Concentraciones del ClO ₂ | N | Desviación | | | |
|--------------------------------------|-----|------------|----------|--------|--------|
| | | Media | estándar | Mínimo | Máximo |
| 0,03 % | 25 | 13,980 | 0,9840 | 12,0 | 15,5 |
| 0,05 % | 25 | 17,320 | 1,8978 | 12,5 | 20,0 |
| 0,08 % | 25 | 21,600 | 1,9948 | 18,0 | 25,0 |
| 0,10 % | 25 | 22,340 | 2,8893 | 17,5 | 28,5 |
| 0,15 % | 25 | 29,340 | 2,2900 | 25,0 | 33,5 |
| Total | 125 | 20,916 | 2,0112 | 12,0 | 33,5 |

Fuente: SPSS Statistics v 24

En la tabla N° 4, se observa la medida de los halos de inhibición producido por las diferentes concentraciones del dióxido de cloro sobre la flora microbiana salival. A la concentración de 0,03 %, se observa que el mayor diámetro de halo de inhibición fue de 15,0 mm y el menor de 12.0 mm. A la concentración de 0,05 %, el mayor diámetro de halo de inhibición fue de 20,0 mm y el menor de 12.5 mm. A la concentración de 0,08 %, el mayor diámetro de halo de inhibición fue de 25,0 mm y el menor de 18.0 mm. A la concentración de 0,10 %, el mayor diámetro de halo de inhibición fue de 28,5 mm y el menor de 17,5 mm, también se aprecia que a esta concentración se obtuvo una mayor desviación estándar que fue de 2,8893. A la concentración de 0,15 %, se observa que el mayor diámetro de halo de inhibición fue de 33,5 mm y el menor de 25,0 mm.

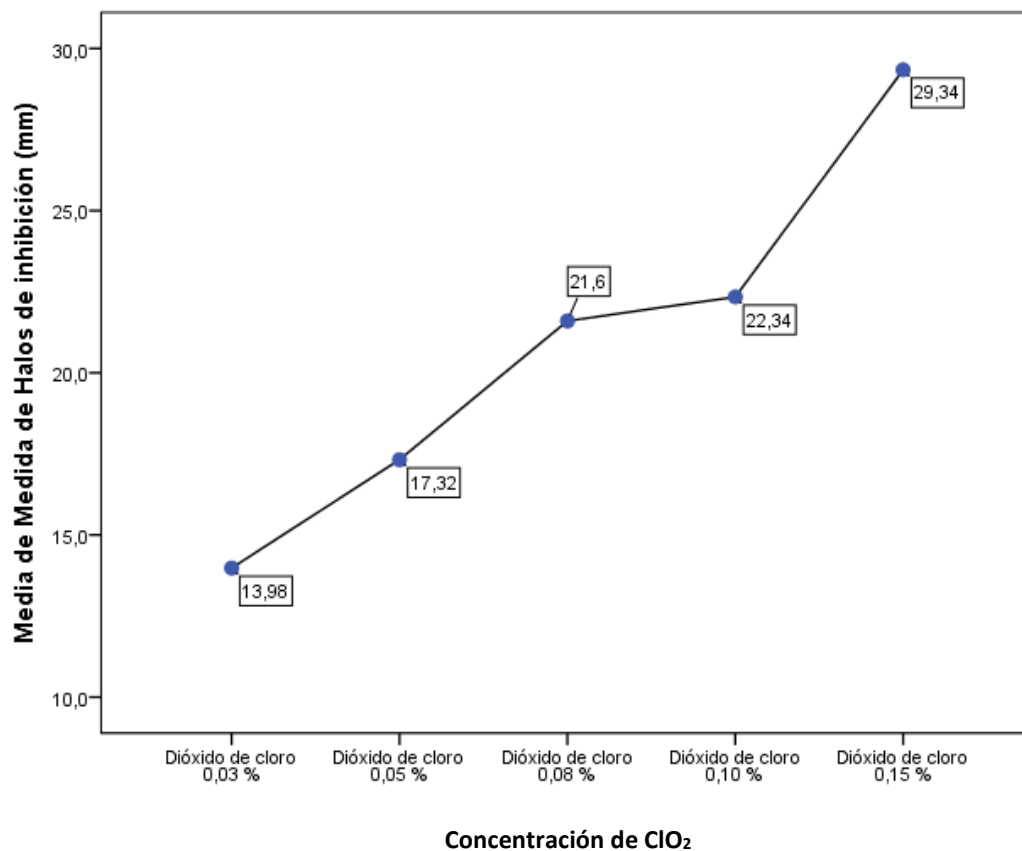


Gráfico N° 1. Promedio de los halos de Inhibición de las diferentes concentraciones del dióxido de cloro.

Fuente: Tabla N° 4

En el gráfico N° 1, se observa los promedios de halos de inhibición de las diferentes concentraciones, como se puede apreciar el efecto bactericida se incrementa a medida que aumenta la concentración del dióxido de cloro.

Tabla N° 5. Prueba de significancia de Tukey: Comparación múltiple.

| Comparaciones múltiples | | | |
|--|---------------------|----------------------------|-------|
| Variable dependiente: MEDIDA DE HALOS DE INHIBICIÓN (mm) | | | |
| HSD Tukey | | | |
| (I) CONCENTRACIONES | (J) CONCENTRACIONES | Diferencia de medias (I-J) | Sig. |
| Dióxido de cloro 0,03 % | 0,05 % | -3,3400* | 0,000 |
| | 0,08 % | -7,6200* | 0,000 |
| | 0,10 % | -8,3600* | 0,000 |
| | 0,15 % | -15,3600* | 0,000 |
| Dióxido de cloro 0,05% | 0,03 % | 3,3400* | 0,000 |
| | 0,08 % | -4,2800* | 0,000 |
| | 0,10 % | -5,0200* | 0,000 |
| | 0,15 % | -12,0200* | 0,000 |
| Dióxido de cloro 0,08 % | 0,03 % | 7,6200* | 0,000 |
| | 0,05 % | 4,2800* | 0,000 |
| | 0,10 % | -0,7400 | 0,726 |
| | 0,15 % | -7,7400* | 0,000 |
| Dióxido de cloro 0,10 % | 0,03 % | 8,3600* | 0,000 |
| | 0,05 % | 5,0200* | 0,000 |
| | 0,08 % | 0,7400 | 0,726 |
| | 0,15 % | -7,0000* | 0,000 |
| Dióxido de cloro 0,15 % | 0,03 % | 15,3600* | 0,000 |
| | 0,05 % | 12,0200* | 0,000 |
| | 0,08 % | 7,7400* | 0,000 |
| | 0,10 % | 7,0000* | 0,000 |

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

Fuente: SPSS Statistics v 24

En la tabla N° 5, se observan las comparaciones múltiples entre las distintas concentraciones de dióxido de cloro, determinándose si presenta diferencia estadísticamente significativa en el efecto bactericida.

Tabla N° 6. Resumen de la prueba de significancia de Tukey.

| Comparaciones múltiples | | | |
|-------------------------|---------------------|----------------------------|-------|
| (I) CONCENTRACIONES | (J) CONCENTRACIONES | Diferencia de medias (I-J) | Sig. |
| Dióxido de cloro 0,05% | 0,03 % | 3,3400* | 0,000 |
| Dióxido de cloro 0,08 % | 0,03 % | 7,6200* | 0,000 |
| | 0,05 % | 4,2800* | 0,000 |
| Dióxido de cloro 0,10 % | 0,03 % | 8,3600* | 0,000 |
| | 0,05 % | 5,0200* | 0,000 |
| Dióxido de cloro 0,15 % | 0,03 % | 15,3600* | 0,000 |
| | 0,05 % | 12,0200* | 0,000 |
| | 0,08 % | 7,7400* | 0,000 |
| | 0,10 % | 7,0000* | 0,000 |

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

Fuente: SPSS Statistics v 24

- En la comparación por pares entre el dióxido de cloro a la concentración de 0,05 % y al 0,03 % se observa que si hay diferencia significativa entre las medias ($p < 0,05$); por lo tanto no tienen efecto bactericida similar, con una diferencia de media de 3,3400 mm a favor del dióxido de cloro al 0,05 %.

- En la comparación por pares entre el dióxido de cloro a la concentración de 0,08 % y al 0,03 % se observa que si hay diferencia significativa entre las medias ($p < 0,05$); por lo tanto no tienen efecto bactericida similar, con una diferencia de media de 7,6200 mm a favor del dióxido de cloro al 0,08 %.

- En la comparación por pares entre el dióxido de cloro a la concentración de 0,08 % y al 0,05 % se observa que si hay diferencia significativa entre las medias ($p < 0,05$); por lo tanto no tienen efecto bactericida similar, con una diferencia de media de 4,2800 mm a favor del dióxido de cloro al 0,08 %.
- En la comparación por pares entre el dióxido de cloro a la concentración de 0,10 % y al 0,03 % se observa que si hay diferencia significativa entre las medias ($p < 0,05$); por lo tanto no tienen efecto bactericida similar, con una diferencia de media de 8,3600 mm a favor del dióxido de cloro al 0,10 %.
- En la comparación por pares entre el dióxido de cloro a la concentración de 0,10 % y al 0,05 % se observa que si hay diferencia significativa entre las medias ($p < 0,05$); por lo tanto no tienen efecto bactericida similar, con una diferencia de media de 5,0200 mm a favor del dióxido de cloro al 0,10 %.
- En la comparación por pares entre el dióxido de cloro a la concentración de 0,15 % y al 0,03 % se observa que si hay diferencia significativa entre las medias ($p < 0,05$); por lo tanto no tienen efecto

bactericida similar, con una diferencia de media de 15,3600 mm a favor del dióxido de cloro al 0,15 %.

- En la comparación por pares entre el dióxido de cloro a la concentración de 0,15 % y al 0,05 % se observa que si hay diferencia significativa entre las medias ($p < 0,05$); por lo tanto no tienen efecto bactericida similar, con una diferencia de media de 12,0200 mm a favor del dióxido de cloro al 0,15 %.
- En la comparación por pares entre el dióxido de cloro a la concentración de 0,15 % y 0,08 % se observa que si hay diferencia significativa entre las medias ($p < 0,05$); por lo tanto no tienen efecto bactericida similar, con una diferencia de media de 7,7400 mm a favor del dióxido de cloro al 0,15 %.
- En la comparación por pares entre el dióxido de cloro a la concentración de 0,15 % y al 0,10 % se observa que si hay diferencia significativa entre las medias ($p < 0,05$); por lo tanto no tienen efecto bactericida similar, con una diferencia de media de 7,0000 mm a favor del dióxido de cloro al 0,15 %.

Tabla N° 7. Prueba de Significación de Tukey.

| MEDIDA (mm) | | | | | |
|-------------------------|----|--|--------|--------|--------|
| HSD Tukey ^a | | | | | |
| | | Subconjunto para alfa = 0,05 (medida de halos mm) | | | |
| CONCENTRACIONES | N | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Dióxido de cloro 0,03 % | 25 | 13,980 | | | |
| Dióxido de cloro 0,05 % | 25 | | 17,320 | | |
| Dióxido de cloro 0,08 % | 25 | | | 21,600 | |
| Dióxido de cloro 0,10 % | 25 | | | 22,340 | |
| Dióxido de cloro 0,15 % | 25 | | | | 29,340 |
| Sig. | | 0,000 | 0,000 | 0,726 | 0,000 |

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 25,000.

N: Número de muestras.

Fuente: SPSS Statistics v 24

En la tabla N° 6, se expresa la prueba de significación de Tukey al 95 % de confiabilidad. Se ilustra las medias de los halos de inhibición agrupadas en las cinco distintas concentraciones del dióxido de cloro, se observa que las medias de los halos de inhibición formados para las concentraciones del dióxido de cloro al 0,08 % y 0,10 % no muestran diferencias estadísticamente significativas entre ellas. La concentración del dióxido de cloro al 0,03 % muestra diferencias estadísticamente significativas con respecto a las concentraciones de 0,05 %; 0,08 % 0,10 % y 0,15 %. La concentración del dióxido de cloro al 0,05 % muestra diferencias

estadísticamente significativas con respecto a las concentraciones de 0,03 % 0,08 % 0,10 % y 0,15 %. La concentración del dióxido de cloro al 0,08 % muestra diferencias estadísticamente significativas con respecto a la concentración de 0,03 %, 0,05 %, 0,15 %. La concentración del dióxido de cloro al 0,10 % muestra diferencias estadísticamente significativas con respecto a las concentraciones de 0,03 %, 0,05 % y 0,15 %. La concentración del dióxido de cloro al 0,15 % muestra diferencias estadísticamente significativas con respecto a las concentraciones de 0,03 %, 0,05 %, 0,08 % y 0,10 %.

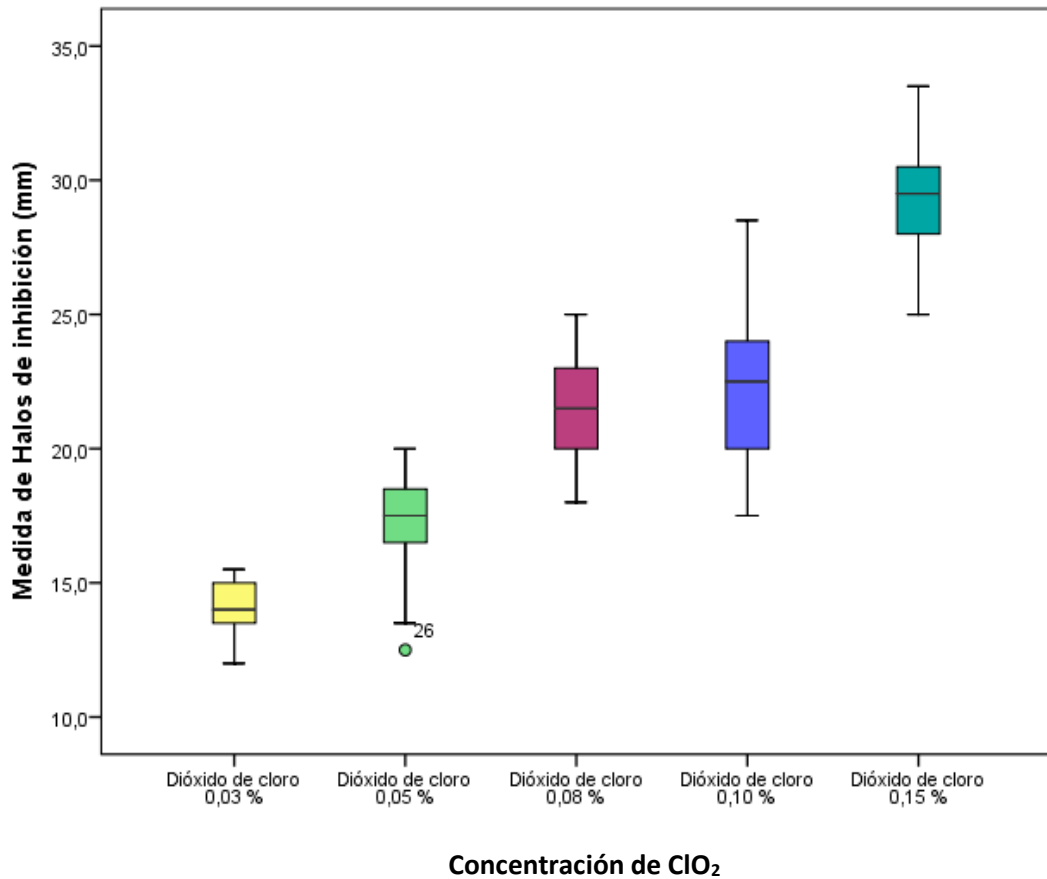


Gráfico N° 2. Comparación múltiple: Diagrama de cajas

Fuente: SPSS Statistics v 24

En el gráfico N° 2, se muestra las medias e intervalos de Tukey HSD al 95,0 %, no apreciándose diferencia estadística significativa entre el dióxido de cloro al 0,08 % y al 0,10 %; sin embargo se aprecia diferencias estadísticas significativas entre las demás concentraciones. El que presenta mayor variabilidad con respecto a la medida de halos de inhibición fue el dióxido

de cloro a la concentración de 0,10 % y el que presenta menor variabilidad fue el dióxido de cloro a la concentración de 0,03 %.

DISCUSIÓN

En la presente investigación de tipo cuasi-experimental, se demostró y comparó el efecto bactericida *in vitro* del dióxido de cloro (ClO₂) a cinco diferentes concentraciones 0,03 %, 0,05 %, 0,08 %, 0,10 % y 0,15 % sobre la flora microbiana salival.

Las diferentes concentraciones fueron obtenidas mediante dilución del producto formulado (10 %) con agua destilada libre de fuentes de cloro, ajustando el pH a 6.

Para determinar el efecto bactericida *in vitro* por el método se difusión en disco, se consideró el método recomendado por la NCCLS (National Committee For Clinical Laboratory Standards, 2000). Este método involucra el uso de un volumen de antimicrobiano impregnado en un disco de papel estéril colocado sobre la superficie del agar en la cual se ha cultivado el microorganismo en cuestión. Transcurrido el tiempo necesario se formará así por difusión, un gradiente de concentración del antimicrobiano y la sensibilidad del microorganismo estará indicada por el tamaño de la zona de inhibición (halo) formado alrededor de los discos.

Para la interpretación del grado de sensibilidad, se tomó como referencia las pautas de Duraffourd y Lapraz (1983), considerándose a) Nula (-) si presenta un diámetro inferior o igual a 8 mm. b) Sensible (+) si presenta un diámetro de 9 a 14 mm. c) Muy sensible (++) si presenta un diámetro de 15 a 19 mm. d) Sumamente sensible (+++) si presenta un diámetro igual ó superior a 20 mm.

Para determinar el efecto bactericida en la fase preliminar del trabajo se prepararon varias concentraciones de dióxido de cloro: 0,03 %, 0,05 %, 0,08 %, 0,10 %, 0,15 %, 0,25 % y 0,50 %, tomándose al final las menores concentraciones debido a que a medida que aumenta la concentración se obtuvieron halos de inhibición que no fueron posible medirlos debido a su gran tamaño. Además se tomó como referencia estudios que se realizaron utilizando el dióxido de cloro a la concentración de 0,10 % como enjuague bucal.

En la tabla N° 1, se observa el efecto bactericida del dióxido de cloro frente a la flora microbiana salival, por el método de difusión en disco (Kirby Bauer), todas las concentraciones utilizadas del Dióxido de Cloro presentan efecto bactericida, evidenciándose en la formación de los halos de inhibición. Los datos obtenidos indican que el menor promedio de halo que

fue de 13,98 mm se obtuvo a la concentración de 0,03 % y el mayor promedio de halo de inhibición fue de 29,34 mm a la concentración de 0,15%. No hay trabajos reportados respecto al efecto bactericida *in vitro* del Dióxido de Cloro sobre a la flora microbiana salival mediante el método de difusión en disco; sin embargo se ha comprobado su efecto bactericida mediante otros métodos y pruebas *in vivo*.

En la tabla N° 2, se observa que el efecto bactericida varía al utilizar el dióxido de cloro a diferentes concentraciones, y este efecto se incrementa en relación directamente proporcional a las concentraciones utilizadas, conforme va aumentando las concentraciones, aumenta el halo de inhibición, estableciéndose el grado de sensibilidad de forma cualitativa para la flora microbiana salival por el método de difusión en disco según las pautas de Duraffourd, el cual resultó estar en el rango sumamente sensible a la concentración del 0,08 %, 0,10 % y 0,15 % demostrando alta potencia de efectividad del Dióxido de Cloro. Esto se puede evidenciar debido a que la efectividad bactericida que ha demostrado el dióxido de cloro se debe a que este gas penetra en las células bacterianas y reacciona con los aminoácidos vitales en su citoplasma. Se ejerce su efecto bactericida mediante la fijación a proteínas de la membrana celular, como consecuencia de su potencial de oxidación. El fuerte carácter oxidante

sugiere que el mecanismo de acción antimicrobiana se basa en la ruptura de la pared celular de las células bacterianas, lo que implica que las proteínas y los ácidos nucleicos se escapen del material celular, inhibiendo la síntesis proteica ⁽²⁸⁾.

La eficacia del dióxido de cloro depende de la concentración y del pH de la solución. Disminuyendo la efectividad a medida que el pH aumenta. Esto se contrasta con los resultados obtenidos en Chile por J. P. Zoffoli en el 2005 ⁽²⁴⁾; en donde se evaluó la efectividad del Dióxido de Cloro, en función de la Concentración, pH y Tiempo de Exposición, en el control de *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum* y *Rhizopus stolonifer* concluyéndose que el pH subió al aumentar la concentración de dióxido de cloro; mientras, que la efectividad biocida disminuyó.

Se tuvo que ajustar el pH final de la solución de dióxido de cloro para obtener el efecto bactericida deseado, ya que al aplicarlo directamente no se observa la formación significativa de los halos de inhibición. Similar resultado fue hallado en un estudio *in vivo* realizado por Richard D. Downs en el 2015 ⁽¹⁵⁾ en donde se demostró la diferencia en la eficacia del gas dióxido de cloro con el dióxido de cloro estabilizado. Demostrándose que Oracare (gas dióxido de cloro) fue el único enjuague bucal capaz de

eliminar cantidades estadísticamente significativas más altos de VSC (compuestos sulfúricos volátiles) que el control agua. Esto debido a que algunas formulaciones comerciales contienen lo que se conoce como “dióxido de cloro estabilizado”. En realidad se trata de soluciones de clorito de sodio buffereadas con bicarbonato o fosfatos, los cuales manteniendo un pH alto estabilizan el clorito de sodio. El poder oxidante del clorito de sodio es mucho menor que el dióxido de cloro y por lo tanto su acción antimicrobiana también es mucho menor. Sin embargo, llevando la solución a pH ácido, se forma dióxido de cloro a partir del clorito en solución.

Para la presente investigación utilizamos como control negativo el agua destilada, la cual no formo halos de inhibición en ninguna de las placas, manteniéndose como constante 6 mm que es el diámetro de los discos de papel filtro utilizados.

En la tabla N° 3, se aprecia el ANOVA determinándose que existen diferencias significativas entre las distintas concentraciones del dióxido de cloro, ya que la significancia fue $0,000 < 0,05$ (estadísticamente significativo).

En la tabla N° 4, se observa la media de los halos de inhibición producido por el dióxido de cloro sobre la flora microbiana salival. Obteniéndose a la concentración de 0,03 %, una media de 13,98 mm. A la concentración de 0,05 % una media de 17,32. A la concentración de 0,10 % una media de 22,34 mm y al 0,15 % una media de 29,34 mm. Estos resultados corroboran su amplia acción biocida, siendo un potente bactericida. La susceptibilidad de las bacterias de la flora microbiana salival al dióxido de cloro es consistente con los hallazgos de autores como Richard D. Dows en el 2015 ⁽¹⁵⁾ que comparó los efectos del dióxido de cloro con la clorhexidina 0,12 % en su actividad antimicrobiana y la capacidad de inactivar compuestos de azufre volátil (VSC). La eficacia de cada enjuague para eliminar VSCs generados *in vitro* por el patógeno periodontal *Porphyromonas gingivalis* se midió con un halímetro. Un enjuague con agua sirvió como un control negativo, demostrándose que el enjuague a base de dióxido de cloro elimina un mayor porcentaje de VSCs, una reducción que fue estadísticamente significativa en comparación tanto con la clorhexidina y el control agua. Como la clorhexidina, el dióxido de cloro tenía un amplio espectro de actividad contra especies de bacterias Gram (+) y Gram (-), incluidas las especies cariogénicas y periodontopáticas. Estos resultados demuestran el potencial antimicrobiano de un enjuague bucal a base de dióxido de cloro.

En la tabla N° 5, 6 y 7, se observan las comparaciones múltiples, prueba de significancia de Tukey al 95 % de confiabilidad entre los promedios de las concentraciones del dióxido de cloro, utilizando para ello el tamaño muestral de 25; determinándose que existen diferencias estadísticamente significativas con respecto al tamaño de los halos de inhibición formados entre las diferentes concentraciones ($P = 0,000 < 0,05$), excepto entre las concentraciones de 0,08 % y 0,10 % que no presentaron diferencias estadísticamente significativas ($P = 0,726 > 0,05$). Diferentes investigaciones avalan el efecto bactericida del dióxido de cloro, como el realizado por Kayoko Shinada en el 2010 ⁽¹³⁾; en un estudio *in vivo* en el que se utilizó un enjuague bucal experimental a base de dióxido de cloro durante siete días, mostrándose inhibición bacteriana en la saliva de *Fusobacterium nucleatum* (*Fn*) estadísticamente significativa ($p < 0,01$) en comparación con la línea base, el grupo placebo no mostró ninguna inhibición estadísticamente significativa. También se observó reducción del recuento medio de *Prophyromonas gingivalis* (*Pg*), sin embargo no hubo diferencia significativa en comparación con la línea base. Estudios previos realizados por Shinada han sugerido que el dióxido de cloro y el anión clorito (ClO_2^-) oxidan los VSC a productos que no son malolientes, esto debido a que a través de esta oxidación, se consumen los aminoácidos como la cisteína y

la metionina que actúan como precursores de los VSC y son también poderosamente bactericidas frente a los microorganismos salivales.

Un estudio *in vivo* en la India realizado por Abhishek Kandwal en el 2014 ⁽¹⁴⁾; demostró que el enjuague que contiene dióxido de cloro fue eficaz en la reducción del mal olor oral de la mañana y de la placa. Los parámetros clínicos de gingivitis reducen con el enjuague bucal experimental utilizado durante 14 días. El enjuague bucal que contiene dióxido de cloro mejoró la halitosis. Futuros estudios son necesarios para examinar más efectos a largo plazo del enjuague bucal en pacientes con gingivitis y halitosis tomando una muestra de mayor tamaño.

Los implantes dentales deben estar permanentemente en una fase de mantenimiento, al igual que los dientes naturales están expuestos a la acumulación de placa bacteriana. La desinfección de las prótesis dentales por inmersión en soluciones químicas inactivan los microorganismos patógenos presentes disminuyendo los efectos adversos. Un estudio realizado por Abdel R. Mohammad en el 2004 ⁽⁵¹⁾ titulado “Eficacia clínica y microbiológica del dióxido de cloro en el tratamiento de candidiasis atrófica crónica”. En este estudio se les indicó a los pacientes que se enjuagaran la boca con ClO₂ al 0,8 % (DioxiDent) dos veces al día durante

un minuto y remojaran su dentadura postiza durante la noche con el ClO₂ durante 10 días. Concluyéndose que el dióxido de cloro mejoro significativamente el aspecto clínico y el recuento microbiano después del tratamiento, sin efectos secundarios significativos. Demostrándose la efectividad del dióxido de cloro (0,8 %) en el manejo de la candidiasis atrófica crónica, siendo una opción segura y clínicamente eficaz.

Otro estudio realizado por Kimoto Kazunari en el 2004 ⁽⁵²⁾ investigó los efectos antibacterianos de un enjuague bucal que contiene dióxido de cloro y su citotoxicidad sobre las células orales humanas, con el fin de utilizarlo como un agente bactericida para los dientes naturales, los implantes dentales y, en general dentro de la cavidad oral. Concluyendo que el enjuague bucal que contiene dióxido de cloro es inofensivo, inocuo para las células humanas y es posible utilizarlo como un agente bactericida para los implantes dentales.

Los estudios realizados *in vivo* por diversos investigadores mencionados anteriormente toman como referencia el dióxido de cloro a la concentración de 0,10 %, 0,30 %, 0,80 %, siendo la concentración del 0,10 % el más utilizado. Las concentraciones utilizadas en este estudio contienen 0,1 ppm aprox. de dióxido de cloro molecular, que es equivalente

a 0,1 mg/L. Este valor es solo referencial ya que el dióxido de cloro se hidroliza a clorito rápidamente. La EPA (Agencia de Protección del Medio Ambiente), ha establecido una concentración máxima permitida en agua potable de 0,8 miligramos de dióxido de cloro por litro de agua (mg/L) y 1,0 mg/L del ión de clorito ⁽³⁶⁾.

Las enfermedades periodontales y las caries son un problema prioritario, siendo necesaria la flora bacteriana para el desarrollo de ambas patologías, por lo tanto es necesario un control eficaz de la flora bacteriana para la prevención, tratamiento y mantenimiento de la salud periodontal. La proliferación de bacterias orales es responsable de la liberación de gases desagradables, la mayoría de los cuales son compuestos de azufre volátil, esto es descrito como mal aliento y se produce incluso en personas sanas. Las personas sanas que sufren de mal aliento son propensas a usar enjuagues bucales que contienen agentes antimicrobianos.

Aunque el presente estudio se realizó *in vitro*, los resultados sugieren que un enjuague bucal que contiene dióxido de cloro puede disminuir la carga bacteriana salival y reducir el mal olor bucal en pacientes con enfermedad periodontal. Futuros estudios deberán comparar la eficacia del

dióxido de cloro con el tratamiento estándar actual para la enfermedad periodontal.

Las ventajas del uso de dióxido de cloro como agente bactericida incluyen su amplio espectro antiséptico, minimización del riesgo de desarrollar resistencia, reducción del costo y facilidad de uso.

CONCLUSIONES

PRIMERA: El dióxido de cloro a las concentraciones de 0,03 %, 0,05 %, 0,08 %, 0,10 % y 0,15 %, obtuvo medias de halos de 13,98 mm, 17,32 mm, 21,60 mm, 22,34 mm y 29,34 mm respectivamente. El efecto bactericida se incrementa a medida que aumenta la concentración de ClO₂. Resultado acorde a la hipótesis planteada.

SEGUNDA: El dióxido de cloro a concentraciones de 0,03 %, 0,05 %, 0,08 %, 0,10 % y 0,15 % presenta efecto bactericida *in vitro* frente a la flora microbiana salival, tal como se planteó en la hipótesis.

TERCERA: El grado de sensibilidad para la flora microbiana salival según la escala de Durafford a la concentración de 0,03 % fue catalogado como sensible (+), con la concentración al 0,05 % muy sensible (++) y a las concentraciones de 0,08 %, 0,10 % y 0,15 % como sumamente sensible (+++). Siendo acorde a la hipótesis planteada.

CUARTA: Las medias de los halos de inhibición formados para las concentraciones del dióxido de cloro al 0,08 % y 0,10 % no muestran diferencias estadísticamente significativas entre ellas. La concentración del dióxido de cloro al 0,03 % muestra diferencias estadísticamente significativas con respecto a las concentraciones de 0,05 %, 0,08 %, 0,10 % y 0,15 %. La concentración del dióxido de cloro al 0,05 % muestra diferencias estadísticamente significativas con respecto a las concentraciones de 0,03 %, 0,08 %, 0,10 % y 0,15 %. La concentración del dióxido de cloro al 0,08 % muestra diferencias estadísticamente significativas con respecto a la concentración de 0,03 %, 0,05 %, 0,15 %. La concentración del dióxido de cloro al 0,10 % muestra diferencias estadísticamente significativas con respecto a las concentraciones de 0,03 %, 0,05 % y 0,15 %. La concentración del dióxido de cloro al 0,15 % muestra diferencias estadísticamente significativas con respecto a las concentraciones de 0,03 %, 0,05 %, 0,08 % y 0,10 %.

RECOMENDACIONES

1. Comparar el efecto bactericida del dióxido de cloro en diferentes bacterias patógenas, causantes de infecciones en la cavidad bucal.
2. Realizar estudios *in vivo* en pacientes a fin de verificar si los resultados *in vitro* son similares.
3. Ampliar la investigación en la formulación y elaboración de pastas y colutorios dentales con dióxido de cloro.
4. Estudiar si existe una acción sinérgica entre el dióxido de cloro y la clorhexidina.
5. Realizar estudios utilizando el dióxido de cloro como irrigante, realizando la prueba de susceptibilidad a los irrigantes para evaluar el nivel de eficacia durante la irrigación de conductos necróticos. La clorhexidina al 2 % es el irrigante con mayor efectividad inhibitoria, seguida por el hipoclorito de sodio al 5 %.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Krespi YP, Shrime MG, Kacker A. La relación entre el mal olor bucal y las bacterias productoras de compuestos volátiles de azufre; 2005; 135, 671-676.
2. Tonzetich J. Producción y el origen del mal olor bucal: una revisión de los mecanismos y métodos de análisis Periodontal; 1977; 48: 13-20.
3. SJ Bolanowski, Gescheider GA, Suttin SVW. Relación entre el dolor oral y la concentración de etanol en los enjuagues bucales.1995; 30: 192-197.
4. Roldán S, D Herrera, M. Sanz. Biopelículas y la lengua: enfoques terapéuticos para el control de la halitosis oral. 2003; 189-197.
5. Administración de alimentos y drogas. FDA 21 CFR 173.325 (e). Soluciones acidificadas de clorito de sodio. [sede web]; 2016 [citado el 10 de setiembre del 2016]. Disponible en:
<Http://www.thefederalregister.com/dp/2004-12-30-04-28577>

6. Sergio de Carvalho Weyne, Roberto Luiz Guaitolini, Leo Guimaraes Soares. El efecto de un enjuague bucal que contiene dióxido de cloro en la reducción clínica de compuestos volátiles de azufre. *Pharmacotherapeutics*. 2011.
7. Enrile de Rojas, Francisco J. Santos Alemany, Antonio. Colutorios para el control de placa y gingivitis basados en la evidencia científica. 2005; Vol 10, N° 4, 445-452
8. Benarde, M.A., B.M. Israel, V.P. Olivieri, and M.L. Granstrom. Efficiency of chlorine dioxide as bactericide. *Applied Microbiology*. 1965; 776-780.
9. Herrera D, Roldán S, Santacruz I, Santos S, Masdevall M, Sanz M. Las diferencias en la actividad antimicrobiana de cuatro formulaciones de clorhexidina 0,12% de enjuague bucal comerciales: una prueba de contacto in vitro e salival estudio recuentos bacterianos. Universidad Complutense, Plaza Ramón y Cajal, s / n 28040 Madrid, España.
10. HIS-Oficina de Estadística e Informática DIRESA TACNA. Elaborado por la dirección ejecutiva de epidemiología. 2014.

11. NG W, Tonzetich J. M. Efecto del sulfuro de hidrogeno y metil mercaptano en la permeabilidad de la mucosa oral. J Dent Res 1984; 994-997.
12. José Carlos Guadrón Novoa. Efecto sobre la placa bacteriana de los antisépticos bucales; 2009.
13. Kayoko Shinada, Masayuki Ueno, Chisato Konishi, otros. Efectos de un enjuague bucal con dióxido de cloro sobre los malos olores y bacterias salivales orales: un ensayo aleatorio de 7 días y controlado con placebo. Ensayos. 2010; 11-14.
14. Abhishek Kandwal, Benazir Ghani. A comparative evaluation of effect of chlorine dioxide mouthrinse on plaque induced gingivitis and oral malodor: a clinical study International Journal of Dental and Health Sciences. Volume 01, Issue 01
15. Richard D. Downs, DDS, Jeffrey A. Banas, PHD, Y MIN ZHU, DDS, PHD. An in vitro study comparing a two-part activated chlorine dioxide oral rinse to chlorhexidine. 2015.

16. Daiane Cristina Peruzzo; Priscila Fontoura Castelo Branco Jandirobair.
El uso de 0,1% de dióxido de cloro para inhibir la formación de compuestos volátiles de azufre de la mañana (VSC). [sitio web]; 2006.
[Citado el 25 julio del 2016]. Disponible en:
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-83242007000100012
17. Negroni, MARTA (2009). Microbiología Estomatológica: Fundamentos y Guía Práctica.-2da ed. Buenos Aires: Médica Panamericana 656 pag. 2009:225-245.
18. Negroni M. Microbiología estomatológica. Ed. Médica Panamericana: 1ra ed. Buenos Aires; p. 200-207
19. Moromi H. Manual de prácticas de microbiología general y estomatológica. Lima, Perú 2002: 92-101
20. Nauntofte B, Tenevuo J, Lagerlöf F. Secretion and composition of saliva.
In: Fejerskov O and Kidd E. Eds. Dental Caries; The disease and its clinical management. Oxford. Blackwell Munksgard. 2003: 7- 29.

21. Tenovuo J. Antimicrobial agents in saliva – protection for the whole body. *J Dent Research*. 2002; 81(12): 807-809.
22. ECODENA. Nota informativa sobre el uso de dióxido de cloro en la industria papelera y la producción de celulosa. [Sede web] 2010 [Citado el 27 julio del 2016]. Disponible en:
http://www.ecodena.com/descargas/Nota_Informativa_Sobre_Dioxido_de_Cloro_en_la_Industria_Papelera_y_Produccion_de_la_Celulosa.pdf.
23. FDA. Chapter V. Methods to Reduce/Eliminate Pathogens from Produce and Fresh-Cut Produce: Analysis and Evaluation of Preventive Control Measures for the Control and Reduction/Elimination of Microbial Hazards on Fresh and Fresh-Cut Produce. [Sede web]; 2001. [Citado el 15 agosto del 2016]. Disponible en:
<http://www.fda.gov/food/foodscienceresearch/safepacticesforfoodprocesses/ucm091363.htm>
24. J.P. Zoffoli, B.A. Latorre, N. Daire Y S. Viertel. Efectividad del Dióxido de Cloro, en Función de la Concentración, pH y Tiempo de Exposición, en el Control de *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum* y *Rhizopus*

stolonifer. Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal, Departamento de Fruticultura y Enología, Pontificia Universidad Católica de Chile. 2005.

25. Benarde, M.A., B.M. Israel, V.P. Olivieri, and M.L. Granstrom. Efficiency of chlorine dioxide as bactericide. *Applied Microbiology* 1965; 776-780.

26. G.C. WHITE. "Handbook of chlorination and alternative disinfectants", cap.12, 1153-1202. 4ª Edición, Wiley-Interscience Publication, John Wiley & sons, Inc., 1999.

27. EPA. Chlorine dioxide. EPA Guidance Manual. Alternative Disinfectants and Oxidants. Environmental Protection Agency, USA. [sede web]; 1999. [citado el 12 de setiembre del 2016]. Disponible en:
www.epa.gov/safewater/mdbp/pdf

28. Junli, H., LI, W., Nenqi, R., Fang, M., and LI, J. Disinfection effect of chlorine dioxide on bacteria in water. *Wat. Res.*, 1997; 31, (3): 607-613.

29. Aieta, E.M. and Berg, J.D. A review of chlorine dioxide in drinking water treatment. *J. Amer. Water Works Assoc.*, 1986; 78, (6): 62-72.

30. CHLORINE CHEMISTRY. Chlorine Dioxide. [Sede web] 2004 [Citado el 29 julio del 2016]. Disponible en:
<http://www.chemistry.gov/chlorinewater/mdbp/pdf>
31. R.A. Deininger, A. Ancheta, A. Ziegler. Dióxido de cloro-Escuela de Salud Pública-The University of Michigan Ann Arbor, Michigan, EUA
32. Abdel-Rahman MS, Scatina J. The effect of Alcide, a new antimicrobial drug, on rat blood glutathione and erythrocyte osmotic fragility, in vitro. *J Appl Toxicol.* 1985;178-181.
33. Bercz JP, Jones L, Garner L. Subchronic toxicity of chlorine dioxide and related compounds in drinking water in the nonhuman primate. *Environ Health Perspect.* 1982; 46:47-55.
34. Abdel-Rahman MS, Couri D, Bull RJ. Metabolism and pharmacokinetics of alternate drinking water disinfectants. *Environ Health Perspect.* 1982; 46:19-23.
35. Abdel-Rahman MS, Couri D, Bull RJ. The kinetics of chlorite and chlorate in the rat. *J Am Coll Toxicol.* 1984; 261-267.

36. Jessilyn B. Taylor, David W. Wohlers, Richard Amata Toxicological profile for chlorine dioxide and chlorite. Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades. (ATSDR). 2004. Reseña Toxicológica del Dióxido de Cloro y Clorito (en inglés). Atlanta, GA: Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU., Servicio de Salud Pública.
37. LIN JL, LIM PS. Acute sodium chlorite poisoning associated with renal failure. *Ren Fail.* 1993; 645-648.
38. Bercz JP, Jones L, Garner L. Subchronic toxicity of chlorine dioxide and related compounds in drinking water in the nonhuman primate. *Environ Health Perspect.* 1982; 46:47-55.
39. Harrington RM, Romano RR, Gates D. Subchronic toxicity of sodium chlorite in the rat. *J Am Coll Toxicol.* 1995; 21-33.
40. Judith R. Lubbers, Sudha Chauhan, and Joseph R. Bianchine Controlled Clinical Evaluations of Chlorine Dioxide, Chlorite and Chlorate in Man. *Environmental Health Perspectives.* 1982; Vol. 46, pp. 57-62.

41. Michael GE, Miday RK, Bercz JP, Chlorine dioxide water disinfection: A prospective epidemiology study. Arch Environ Health. 1981; 20-27.
42. Lubbers JR, Chauhan S, Bianchine JR. Controlled clinical evaluations of chlorine dioxide, chlorite and chlorate in man. Fundam Appl Toxicol. 1981; 334-338.
43. Lubbers JR, Chauhan S, Miller JK. The effects of chronic administration of chlorine dioxide, chlorite and chlorate to normal healthy adult male volunteers. J Environ Pathol Toxicol Oncol. 1984; 229-238.
44. Michael GE, Miday RK, Bercz JP. Chlorine dioxide water disinfection: A prospective epidemiology study. Arch Environ Health. 1981; 36:20-27.
45. Abdel-Rahman MS, Couri D, Bull RJ. Toxicity of chlorine dioxide in drinking water. J Am Coll Toxicol. 1984; 277-284.
46. Daniel FB, Condie LW, Robinson M. Comparative subchronic toxicity studies of three disinfectants. J Am Water Works Assoc. 1990; 61-69.

47. Carlton BD, Smith MK. Reproductive effects of alternate disinfectants and their by-products. Water chlorination: chemistry, environmental impact and health effects. In: Proceedings of the fifth conference on water chlorination- environmental impact and health effects. 1984. Chelsea, MI: Lewis Publishers, Inc. 295-305.
48. Carlton BD, Habash DL, Basaran AH. Sodium chlorite administration in Long-Evans rats: reproductive and endocrine effects. Environ Res 1987; 238-245.
49. Ishidate M, Sofuni T, Yoshikawa K, (1984). Primary mutagenicity screening of food additives currently used in Japan. Food Chem Toxicol 22(8):623-636.
50. Abdel-Rahman MS, Couri D, Bull RJ. (1980). Kinetics of ClO₂ and effects of ClO₂, ClO₂⁻, and ClO₃⁻ in drinking water on blood glutathione and hemolysis in rat and chicken. J Environ Pathol Toxicol 3:431-449.
51. Mohammad AR, Giannini PJ, Preshaw PM, Alliger H. Clinical and microbiological efficacy of chlorine dioxide in the management of chronic atrophic candidiasis. International Dental Journal (2004) 54, 154–158.

52. Kimoto K, Hamada N, Ohno M, Furuya M, Kushida M, USUI S ETL.
Study on bactericidal effects of chlorine dioxide gas. Bull Kangawa
Dental College ,2004;32:77-82.

ANEXOS

ANEXO N° 01

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título de la investigación: COMPARACIÓN DEL EFECTO BACTERICIDA *in vitro* DEL DIÓXIDO DE CLORO A DISTINTAS CONCENTRACIONES SOBRE LA FLORA MICROBIANA SALIVAL, UNJBG-TACNA, 2016.

Investigador: Bach. VILCA MAQUERA, GIOVANA NOEMI

Institución: Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann de Tacna.

Objetivo de la investigación: Determinar el efecto bactericida *in vitro* del Dióxido de cloro sobre la flora microbiana salival.

Procedimientos que se seguirán durante la investigación

Usted será uno de los 25 estudiantes cuya muestra salival será recolectada en vasos estériles a razón de alrededor de 2 ml. Las muestras se procesarán hasta obtener diluciones comparándola con la escala de turbidez del tubo N° 0,5 de la escala de Mc Farland, empleando suero fisiológico. Después de ello, se procederá a sembrar en placas de Agar Tripticosa Soya (TSA) utilizando el método de difusión en disco. Se incubarán las placas invertidas a 37 °C por 24 horas en aerobiosis. Se medirán los halos de inhibición formados alrededor de los discos de papel filtro embebido con cada una de las concentraciones de Dióxido de Cloro y serán anotados en una ficha de registro. Complementariamente se utilizará agua destilada como control negativo.

Confidencialidad:

Los resultados de esta investigación podrán presentarse para la sustentación, sin embargo, su identidad no será divulgada en tales presentaciones.

Consentimiento:

Por el presente documento, Yo
.....he leído y entendido en
que consiste la investigación y acepto libre y voluntariamente participar en él.

Tacna,..... de..... del.....

Firma

DNI:.....

ANEXO N° 02

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

MEDIDA DE LOS HALOS DE INHIBICION EN LA PLACA TSA

| Flora microbiana salival | Concentración de la solución de Dióxido de Cloro | | | | | Control negativo (Agua destilada) |
|--------------------------------|---|--------|--------|--------|--------|--|
| | 0,03 % | 0,05 % | 0,08 % | 0,10 % | 0,15 % | |
| Muestra 01 | | | | | | |
| Muestra 02 | | | | | | |
| Muestra 03 | | | | | | |
| Muestra 04 | | | | | | |
| Muestra 05 | | | | | | |
| Muestra 06 | | | | | | |
| Muestra 07 | | | | | | |
| Muestra 08 | | | | | | |
| Muestra 09 | | | | | | |
| Muestra 10 | | | | | | |
| Muestra 11 | | | | | | |
| Muestra 12 | | | | | | |
| Muestra 13 | | | | | | |
| Muestra 14 | | | | | | |
| Muestra 15 | | | | | | |
| Muestra 16 | | | | | | |
| Muestra 17 | | | | | | |
| Muestra 18 | | | | | | |
| Muestra 19 | | | | | | |
| Muestra 20 | | | | | | |
| Muestra 21 | | | | | | |
| Muestra 22 | | | | | | |
| Muestra 23 | | | | | | |
| Muestra 24 | | | | | | |
| Muestra 25 | | | | | | |

ANEXO N° 03



Figura 1: Frascos con dióxido de cloro en concentraciones de 0,03 %, 0,05 %, 0,10 % y 0,15 %.



Figura 2: Agar TSA fundido y homogenizado.



Figura 3: Autoclavado de los agares.

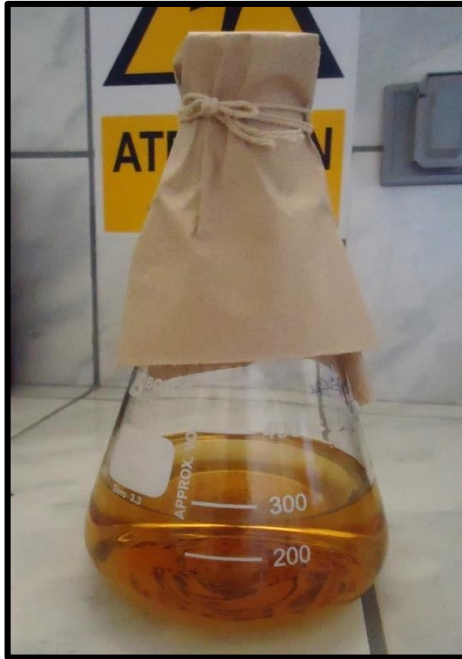


Figura 4: Agar Tripticasa de Soya.



Figura 5: Plaqueado del Agar Tripticasa de Soya en las placas Petri.

ANEXO N° 04



Figura 6: Muestra salival estandarizada a la escala de turbidez del tubo N° 0,5 del Nefelómetro de Mc Farland.



Figura 7. Muestra salival sembrada.



Figura 8: Discos estériles de papel filtro de 6 mm de diámetro.

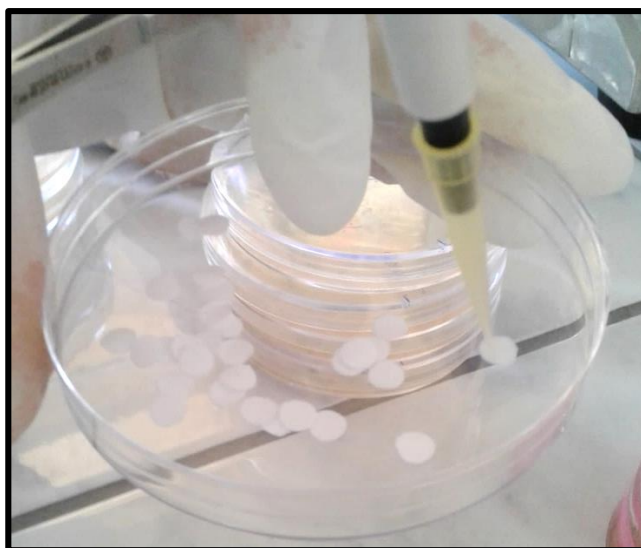


Figura 9: Discos estériles embebidos con 5 μ l de cada concentración de la sustancia

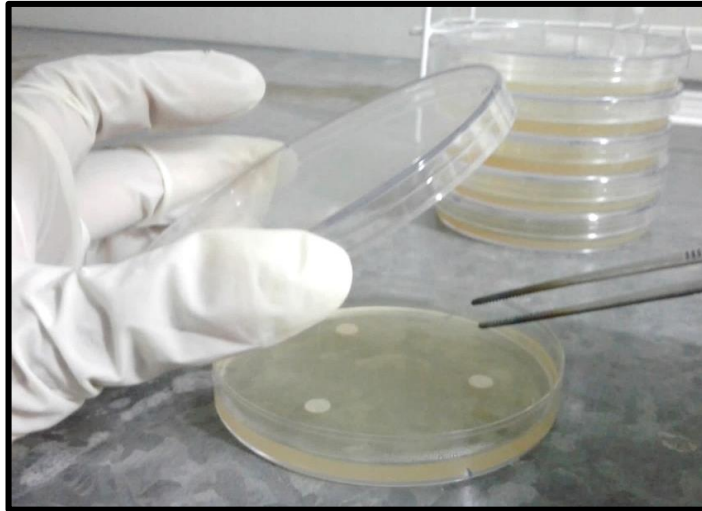


Figura 10: Discos estériles colocados en las placas Petri.



Figura 11: Placas Petri incubadas a 37 °C.

ANEXO N° 05

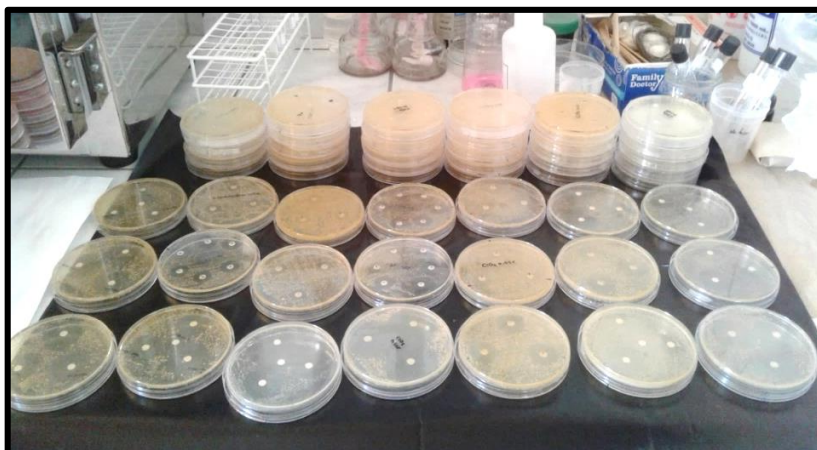


Figura 12: Halos de inhibición de las distintas concentraciones.

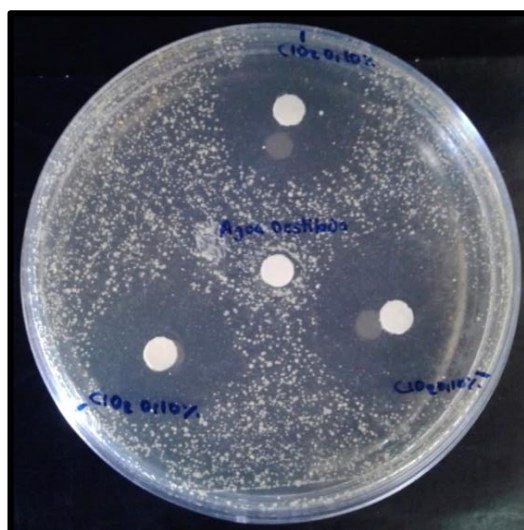


Figura 13: Halos de inhibición del dióxido de cloro al 0,10 % y agua destilada.

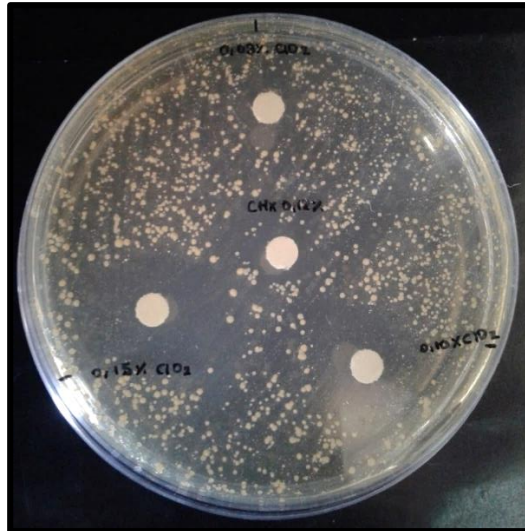


Figura 14: Halos de inhibición del dióxido de cloro al 0,03 %, 0,10 % y 0,15 %.

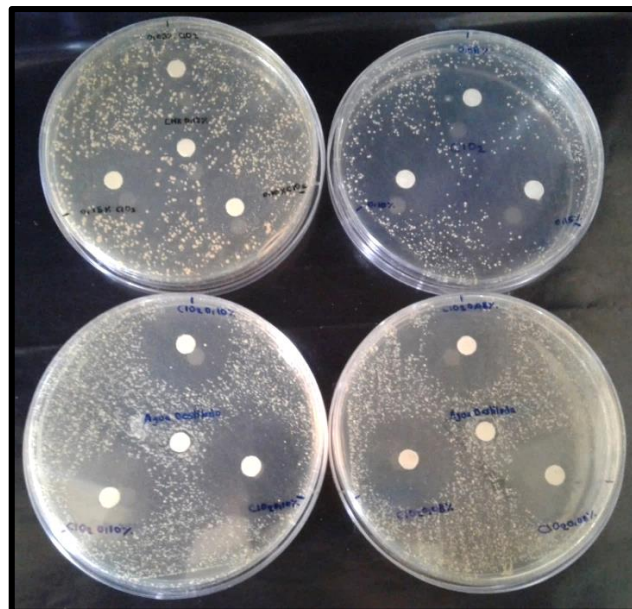


Figura 15: Halos de inhibición del dióxido de cloro al 0,03 %, 0,05 %, 0,08 %, 0,10 %, 0,15 % y agua destilada.

ANEXO N° 06

COLORACIÓN GRAM



Figura 16: Colonias de bacterias de la muestra salival.



Figura 17: Bacterias fijadas y extendidas.



Figura 25: Tinción con los colorantes.

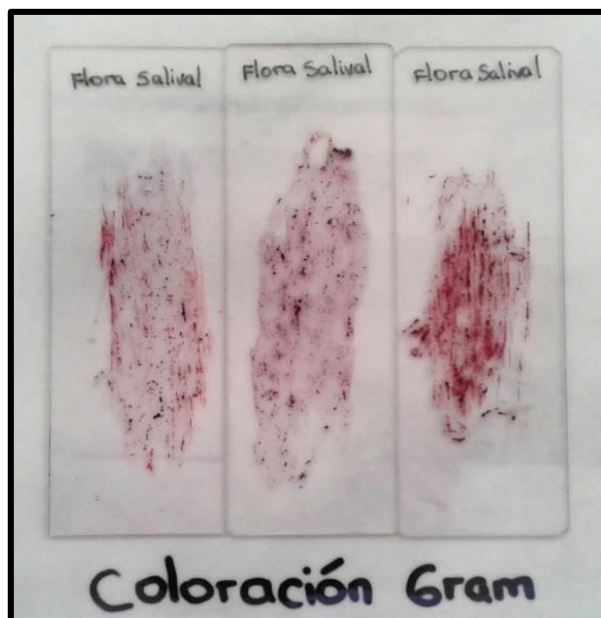


Figura 26: Coloración Gram final.



Figura 27: Bacterias visualizadas al microscopio.

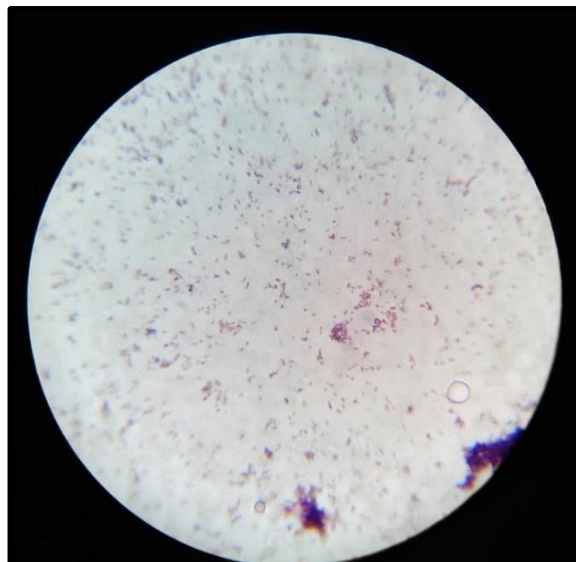


Figura 28: Bacterias cocos Gram (+) y Gram (-).

ANEXO N° 07

MATRIZ DE CONSISTENCIA

Título: "COMPARACIÓN DEL EFECTO BACTERICIDA *in vitro* DEL DIÓXIDO DE CLORO A DISTINTAS CONCENTRACIONES SOBRE LA FLORA MICROBIANA SALIVAL, UNJBG-TACNA, 2016"

| PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | OBJETIVOS | HIPÓTESIS | VARIABLES | METODOLOGIA | TÉCNICAS/ INSTRUMENTOS |
|---|--|---|---|---|---|
| <p>Problema principal</p> <p>¿Cuál es el efecto bactericida <i>in vitro</i> del dióxido de cloro comparándola con las distintas concentraciones sobre la flora microbiana salival?</p> | <p>Objetivo general</p> <p>Comparar el efecto bactericida <i>in vitro</i> del dióxido de cloro a distintas concentraciones sobre la flora microbiana salival.</p> | <p>Hipótesis General</p> <p>El dióxido de cloro presenta un efecto bactericida <i>in vitro</i> sobre la flora microbiana salival.</p> | <p>Variable Independiente</p> <p>Concentración del dióxido de cloro.</p> | <p>Tipo de estudio:</p> <p>Aplicada Transversal prospectivo</p> <p>Diseño de investigación:</p> <p>Cuasi-experimental</p> | <p>Técnicas estadísticas:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Tablas descriptivas: medias y desviación estándar. - Análisis de varianza ANOVA. - Prueba de significación de Tukey. |
| <p>Problemas específicos</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. ¿Cuál es el efecto bactericida <i>in vitro</i> del dióxido de cloro a las concentraciones de 0,03 %, 0,05 %, 0,08 %, 0,10 % y 0,15 % sobre la flora microbiana salival? 2. ¿Cuál es el grado de sensibilidad de la flora microbiana salival generado por el dióxido de cloro a las concentraciones de 0,03 %, 0,05 %, 0,10 % y 0,15 %? 3. ¿Existe diferencia estadísticamente significativa entre el efecto bactericida <i>in vitro</i> del dióxido de cloro a las concentraciones de 0,03 %, 0,05 %, 0,08 %, 0,10 % y 0,15 % sobre la flora microbiana salival? | <p>Objetivos Específicos</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Determinar el efecto bactericida <i>in vitro</i> del dióxido de cloro a las concentraciones de 0,03 %, 0,05 %, 0,08 %, 0,10 % y 0,15 % sobre la flora microbiana salival. 2. Establecer el grado de sensibilidad de la flora microbiana salival generado por el dióxido de cloro a las concentraciones de 0,03 %, 0,05 %, 0,10 % y 0,15 %. 3. Determinar si el efecto bactericida <i>in vitro</i> del dióxido de cloro a las concentraciones de 0,03 %, 0,05 %, 0,08 %, 0,10 % y 0,15 %, presentan diferencias estadísticamente significativas sobre la flora microbiana salival. | <p>Hipótesis Específicas</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. El dióxido de cloro a las concentraciones de 0,03 %, 0,05 %, 0,08 %, 0,10 % y 0,15 % presenta un efecto bactericida <i>in vitro</i> sobre la flora microbiana salival. 2. La flora microbiana salival presenta grado de sensibilidad generado por el dióxido de cloro a las concentraciones de 0,03 %, 0,05 %, 0,10 % y 0,15 %. 3. El efecto bactericida <i>in vitro</i> del dióxido de cloro a las concentraciones de 0,03 %, 0,05 %, 0,08 %, 0,10 % y 0,15 % presentan diferencias estadísticamente significativa sobre la flora microbiana salival. | <p>Variable Dependiente</p> <p>Efecto bactericida sobre la flora Microbiana salival.</p> | <p>Nivel de investigación:</p> <p>Explicativa</p> <p>Población:</p> <p>160 muestras de saliva de los estudiantes de la escuela de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Jorge Basadre Grohmann.</p> <p>Muestra:</p> <p>25 muestras de saliva.</p> <p>Muestreo:</p> <p>No probabilístico a conveniencia.</p> | <p>Instrumentos:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Ficha de recolección de datos. |