



Facultad Ciencias de la Salud

Tema:

Actividad antimicrobiana del ácido hipocloroso al 0,25%, 0,75% y 1.25% de concentración sobre cepas de *Streptococcus mutans* en arcos de ortodoncia Niti y Acero:

Estudio in vitro

Presentada por:

Janeth Elizabeth Barragán González

Tutor:

Dra. Krisnaya Muñoz

Quito, Junio de 2025

Resumen

En la actualidad se utilizan sustancias antimicrobianas que controlan la acumulación de placa dental teniendo como gold estándar el gluconato de clorhexidina, sin embargo, presenta efectos adversos a largo plazo que limitan su uso cotidiano, esto crea la necesidad de utilizar nuevas sustancias biocompatibles que disminuyan la proliferación de bacterias orales, el ácido hipocloroso se propone como un potente agente antimicrobiano y su relevancia en diferentes ámbitos de la salud y desinfección.

Este estudio tuvo como objetivo evaluar la actividad antimicrobiana del ácido hipocloroso a diferentes concentraciones sobre *Streptococcus mutans* presentes en alambres de ortodoncia mediante pruebas microbiológicas in vitro. En la primera fase se verificó la adhesión de la bacteria a alambres de ortodoncia calibre 0.019 x 0,025 tanto en NiTi como en Acero mediante conteo de colonias microbiológicas, para este procedimiento se formaron dos grupos: 10 tubos de ensayo con BHI con un segmento de alambres NiTi y otro grupo con 10 tubos de ensayo con BHI con un segmento de alambres Acero, que fueron incubados por 24 horas a 37°C con la bacteria mencionada, para evaluar la adherencia. Se realizó el conteo de colonias bacterianas a través de la siembra en agar BHI siguiendo la metodología empleada por Oliveira 2021.

Una vez comprobada la adherencia del *Streptococcus mutans* a los alambres de ortodoncia se evaluó el efecto inhibitorio del ácido hipocloroso a las siguientes concentraciones 0,25%, 0,75% y 1,25 %, mediante pruebas microbiológicas *In Vitro* se incubó la bacteria en agar BHI por 24 horas a 37°C, para cuantificar la actividad antimicrobiana se realizó un antibiograma utilizando la técnica de pozo adicional se incluyó el control negativo siendo el suero fisiológico y el control positivo a la clorhexidina 2%.

Resultados: Se reportó la mayor adherencia de *Streptococcus mutans* se identificó en arcos de acero en contraste con NiTi, además con el ácido hipocloroso al 1,25% se logró la mayor actividad antimicrobiana. Con respecto al efecto del control positivo (clorhexidina al 2%) se determinó que existió diferencia significativa entre el ácido hipocloroso al 1,25% ($p < 0,05$), donde se demostró que la clorhexidina tiene el menor efecto inhibitorio sobre *Streptococcus mutans*. El HClO al 0,25% y 0,75% presentó igual actividad inhibitoria que la clorhexidina al 2% sobre cepas de *Streptococcus mutans* ($p < 0,05$), además es similar estadísticamente a la acción inhibitoria de la concentración de HClO del 0,75% y 0,25%.

Conclusiones: A la mayor concentración de ácido hipocloroso aumenta la actividad antimicrobiana de *Streptococcus mutans*, sin embargo, es necesario mantener bajas proporciones de esta sustancia química para evitar la corrosión de los arcos de ortodoncia de acero y níquel-titanio. Con respecto a la adherencia microbiana se evidenció una menor cantidad de las unidades formadoras de colonias en la aparatología de ortodoncia de níquel-titanio.

Palabra clave: EFECTO INHIBITORIO, *STREPTOCOCCUS MUTANS*, AGAR HBI, ÁCIDO HIPOCLOROSO

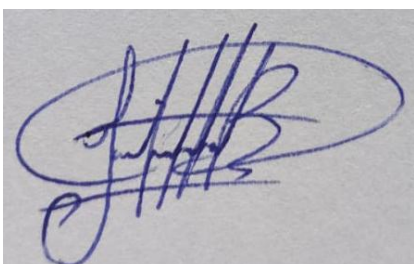
Declaración De Aceptación De Norma Ética Y Derechos

El presente documento se ciñe a las normas éticas y reglamentarias de la Universidad Hemisferios. Así, declaro que lo contenido en este ha sido redactado con entera sujeción al respeto de los derechos de autor, citando adecuadamente las fuentes. Por tal motivo, autorizo a la Biblioteca a que haga pública su disponibilidad para lectura dentro de la institución, a la vez que autorizo el uso comercial de mi obra a la Universidad de Los Hemisferios, siempre y cuando se me reconozca el cuarenta por ciento (40%) de los beneficios económicos resultantes de esta explotación.

Además, me comprometo a hacer constar, por todos los medios de publicación, difusión y distribución, que mi obra fue producida en el ámbito académico de la Universidad de Los Hemisferios.

De comprobarse que no cumplí con las estipulaciones éticas, incurriendo en caso de plagio, me someto a las determinaciones que la propia Universidad plantee.

Janeth Elizabeth Barragán González



1721993747

Dedicatoria

A Dios, por iluminar mi camino, darme fuerza en cada desafío y acompañarme con amor y sabiduría en cada paso de este proceso.

A mis padres, por su esfuerzo incansable, su amor incondicional y por enseñarme, con su ejemplo, el verdadero significado del sacrificio y la perseverancia.

A Edison mi compañero de vida por siempre estar a mi lado en momentos buenos y sobre todo en momentos malos.

Con todo mi cariño y gratitud.

Índice

Resumen	2
Declaración De Aceptación De Norma Ética Y Derechos	4
Dedicatoria.....	5
Índice	6
Índice De Tablas	7
Índice De Figuras	8
Índice De Gráficos.....	10
Resumen	11
Abstract.....	13
Introducción.....	14
Metodología.....	17
Hallazgos	37
Resultados.....	37
Análisis	43
Discusión Y Conclusiones.....	43
Discusión.	43
Conclusiones.....	46
Recomendaciones	46
Referencias	48
Anexos.....	53

Índice De Tablas

Tabla 1. Halos de inhibición (mm) por grupo y réplica	37
Tabla 2. Estadísticas descriptivas por grupo	38
Tabla 3. Prueba de normalidad (Shapiro-Wilk).....	40
Tabla 4. Prueba paramétrica ANOVA.....	41
Tabla 5. Comparaciones múltiples de medias de Tukey	41
Tabla 6. Comparaciones múltiples de medias de Tukey (cont).....	42

Índice De Figuras

<p>Figura 1. A) BHI en polvo. B) Peso inicial de BHI. C) Peso final de BHI. D) Demostración del peso posterior al pesado en la balanza de precisión. E) del BHI al volumen correspondiente de 400 mL de agua destilada.....</p>	19
<p>Figura 2. A) Corte de alambre de ortodoncia. B) Muestras de alambre. C) Inserción de los alambres en los tubos de precipitados. D) Tubos de precipitados con las muestras de alambres.....</p>	20
<p>Figura 3. A) Presencia uniforme de <i>S. mutans</i> en todas las muestras experimentales.....</p>	21
<p>Figura 4. A) Tubo de ensayo con 0,1 mL de la solución madre de <i>S. mutans</i> utilizando una pipeta estéril y muestra del alambre. B) Autoclave a 37 °C durante 24 horas bajo condiciones microaerófilas.....</p>	22
<p>Figura 5. A) Inoculación en HBI de las muestras de alambres</p>	23
<p>Figura 6. A) Proceso de turbidez</p>	24
<p>Figura 7. A) Muestras de alambres. B) Siembra en agar HBI.....</p>	24
<p>Figura 8. A) Tubos de ensayos con la muestra. B y C) Placas Petri inoculadas. D) Observación directa se cuantifico el número de colonias en cada caja Petri</p>	25
<p>Figura 9. A) Preparación de la muestra. B y C) Colocación de la muestra en el portaobjeto.....</p>	27
<p>Figura 10. A y B) Proceso de tinción</p>	28
<p>Figura 11. A y B) Secado y observación</p>	28
<p>Figura 12. A y B) Visualización del portaobjeto con aceite.....</p>	28
<p>Figura 13. Incubación de las placas Petri a 37°C durante 24 horas para permitir el crecimiento de <i>Streptococcus mutans</i></p>	30
<p>Figura 14. Materiales utilizados para el crecimiento bacteriano</p>	31

Figura 15. A, B, C y D) Procedimiento del crecimiento bacteriano.....	31
Figura 16. A) Preparación del cultivo bacteriano	32
Figura 17. A) Placas petri con el cultivo bacteriano. B) Incubadora termostática. C) Placa Petri con el crecimiento bacteriano. D) Medición del crecimiento de la bacteria	32
Figura 18. A y B) Tubos de ensayos con cultivo y alambres. C) Solución de ácido hipocloroso	35
Figura 19. A y B) Homegenización del tubo de ensayo con el alambre. C) El crecimiento bacteriano se ubica en una caja Petri esterilizada.	35
Figura 20. A, B y C) Incubación para evaluación del crecimiento bacteriano con el ácido hipocloroso.....	36
Figura 21. A) Incubación del crecimiento bacteriano	36
Figura 22. A) Evaluación de la cantidad de turbidez para determinar el efecto inhibitorio de las diferentes concentraciones de ácido hipocloroso y los controles (clorhexidina y suero fisiológico).....	37

Índice De Gráficos

Gráfico 1. Promedio de halo de inhibición \pm DE por grupo.....	39
Gráfico 2. Medias con los límites con un nivel de confianza.....	42

**ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ÁCIDO HIPOCLOROSO AL 0,25%,
0,75% Y 1.25% DE CONCENTRACIÓN SOBRE CEPAS DE *STREPTOCOCCUS
MUTANS* EN ARCOS DE ORTODONCIA NITI Y ACERO: ESTUDIO IN VITRO**

Janeth Elizabeth Barragán González

Janethbarragan_1991@hotmail.com

Resumen

En la actualidad se utilizan sustancias antimicrobianas que controlan la acumulación de placa dental teniendo como gold estándar el gluconato de clorhexidina, sin embargo, presenta efectos adversos a largo plazo que limitan su uso cotidiano, esto crea la necesidad de utilizar nuevas sustancias biocompatibles que disminuyan la proliferación de bacterias orales, el ácido hipocloroso se propone como un potente agente antimicrobiano y su relevancia en diferentes ámbitos de la salud y desinfección.

Este estudio tuvo como objetivo evaluar la actividad antimicrobiana del ácido hipocloroso a diferentes concentraciones sobre *Streptococcus mutans* presentes en alambres de ortodoncia mediante pruebas microbiológicas in vitro. En la primera fase se verificó la adhesión de la bacteria a alambres de ortodoncia calibre 0.019 x 0,025 tanto en NiTi como en Acero mediante conteo de colonias microbiológicas, para este procedimiento se formaron dos grupos: 10 tubos de ensayo con BHI con un segmento de alambres NiTi y otro grupo con 10 tubos de ensayo con BHI con un segmento de alambres Acero, que fueron incubados por 24 horas a 37°C con la bacteria mencionada, para evaluar la adherencia. Se realizó el conteo de colonias bacterianas a través de la siembra en agar BHI siguiendo la metodología empleada por Oliveira 2023.

Una vez comprobada la adherencia del *Streptococcus mutans* a los alambres de ortodoncia se evaluó el efecto inhibitorio del ácido hipocloroso a las siguientes

concentraciones 0,25%, 0,75% y 1,25 %, mediante pruebas microbiológicas *In Vitro* se incubo la bacteria en agar BHI por 24 horas a 37°C, para cuantificar la actividad antimicrobiana se realizó un antibiograma utilizando la técnica de pozo adicional se incluyó el control negativo siendo el suero fisiológico y el control positivo a la clorhexidina 2%.

Resultados: Se reportó la mayor adherencia de *Streptococcus mutans* se identificó en arcos de acero en contraste con NiTi, además con el ácido hipocloroso al 1,25% se logró la mayor actividad antimicrobiana. Con respecto al efecto del control positivo (clorhexidina al 2%) se determinó que existió diferencia significativa entre el ácido hipocloroso al 1,25% ($p < 0,05$), donde se demostró que la clorhexidina tiene el menor efecto inhibitorio sobre *Streptococcus mutans*. El HClO al 0,25% y 0,75% presentó igual actividad inhibitoria que la clorhexidina al 2% sobre cepas de *Streptococcus mutans* ($p < 0,05$), además es similar estadísticamente a la acción inhibitoria de la concentración de HClO del 0,75% y 0,25%.

Conclusiones: A la mayor concentración de ácido hipocloroso aumenta la actividad antimicrobiana de *Streptococcus mutans*, sin embargo, es necesario mantener bajas proporciones de esta sustancia química para evitar la corrosión de los arcos de ortodoncia de acero y níquel-titanio. Con respecto a la adherencia microbiana se evidenció una menor cantidad de las unidades formadoras de colonias en la aparatología de ortodoncia de níquel-titanio.

Palabra clave: EFECTO INHIBITORIO, *STREPTOCOCCUS MUTANS*, AGAR HBI, ÁCIDO HIPOCLOROSO

Abstract

Antimicrobial substances are currently used to control dental plaque accumulation, with chlorhexidine gluconate as the gold standard. However, it has long-term adverse effects that limit its daily use. This creates the need for new biocompatible substances that reduce the proliferation of oral bacteria. Hypochlorous acid is proposed as a potent antimicrobial agent and its relevance in various areas of healthcare and disinfection.

This study aimed to evaluate the antimicrobial activity of hypochlorous acid at different concentrations against *Streptococcus mutans* present on orthodontic wires using *in vitro* microbiological tests. In the first phase, the adhesion of the bacteria to 0.019 x 0.025 caliber orthodontic wires in both NiTi and Steel was verified by counting microbiological colonies. For this procedure, two groups were formed: 10 test tubes with BHI with a segment of NiTi wires and another group with 10 test tubes with BHI with a segment of Steel wires, which were incubated for 24 hours at 37°C with the bacteria, to evaluate adherence. Bacterial colonies were counted by inoculation on BHI agar following the methodology employed by Oliveira 2023.

Once the adherence of *Streptococcus mutans* to orthodontic wires was confirmed, the inhibitory effect of hypochlorous acid was evaluated at the following concentrations: 0.25%, 0.75%, and 1.25%, using *in vitro* microbiological tests. The bacteria were incubated in BHI agar for 24 hours at 37°C. To quantify antimicrobial activity, an antibiogram was performed using the extra-well technique. The negative control was physiological saline, and the positive control was 2% chlorhexidine.

Results: The highest adherence of *Streptococcus mutans* was reported to be identified on steel archwires in contrast to NiTi archwires. Furthermore, 1.25% hypochlorous acid achieved the highest antimicrobial activity. Regarding the effect of the positive control (2% chlorhexidine), a significant difference was found between 1.25%

hypochlorous acid and 1.25% hypochlorous acid ($p < 0.05$), with chlorhexidine showing the least inhibitory effect on *Streptococcus mutans*. 0.25% and 0.75% HClO presented the same inhibitory activity as 2% chlorhexidine on *Streptococcus mutans* strains ($p < 0.05$). It was also statistically like the inhibitory action of 0.75% and 0.25% HClO concentrations.

Conclusions: Higher concentrations of hypochlorous acid increased the antimicrobial activity of *Streptococcus mutans*. However, low levels of this chemical were necessary to prevent corrosion of steel and nickel-titanium orthodontic archwires. Regarding microbial adherence, a lower number of colony-forming units was observed on nickel-titanium orthodontic appliances.

Keywords: INHIBITORY EFFECT, STREPTOCOCCUS MUTANS, HBI AGAR, HYPOCHLOROUS ACID

Introducción

Una de las problemáticas que reportan los pacientes con ortodoncia es que al utilizar aparatos fijos y removibles empeora la higiene oral y promueve la diferenciación de la flora microbiana de la cavidad oral, que induce la presencia de caries y periodontitis (Türköz et al., 2012). Esta información es confirmada con investigaciones previas que durante o posterior al tratamiento de ortodoncia aumenta la prevalencia de bacterias cariogénicas como es el caso de *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus*, con aumento de la presencia de los niveles de estas bacterias durante la terapia de ortodoncia en aparatos removibles acrílicos, bandas y brackets (metal y cerámico). (Freitas et al., 2014; Kiatwarawut et al., 2022; Lucchese & Bondemark, 2021)

El *Streptococcus mutans* es un habitante normal de la cavidad bucal; es el tipo más cariogénico de todos los estreptococos orales que pueden provocar el inicio y progresión de la caries dental, también es importante considerar que existen otros factores que intervienen en la adhesión bacteriana como es la carga superficial, hidrofobicidad

superficial y la rugosidad que promueve la colonización bacteriana, donde el *Streptococcus mutans* es una especie hidrófoba Gram positiva, las bacterias en una suspensión acuosa pueden tener una carga negativa, lo que aumenta la probabilidad de que esta bacteria se adhiera a superficies de aparato ortodóntico y forme una biopelícula. (Al-Ali & Groosh, 2022)

En la actualidad existe varios agentes antimicrobianos, incluida la clorhexidina (CHX), y tabletas de limpieza, para eliminar la biopelícula del retenedor y de los aparatos de ortodoncia, en el caso de la clorhexidina es un antimicrobiano que actúa contra una amplia gama de patógenos, incluidos *Streptococcus mutans*, *Escherichia coli*, *Streptococcus sanguinis*, *Candida albicans* y *Staphylococcus aureus*, además reportan que la presencia de *Streptococcus mutans* era significativamente menos prevalente en retenedores de ortodoncia desinfectados con enjuague bucal con clorhexidina. (Kiatwarawut et al., 2022; Shpack et al., 2014)

Sin embargo, Al-lehaibi et al. (2021) en un estudio microbiológico demostraron que existen diferentes resultados de inhibición de la CHX frente a *S. mutans* y *Lactobacillus sp*, debido al mecanismos de resistencia hacia al CHX, evidenciaron que los aislados en pacientes que utilizan aparatos de ortodoncia mostraron resistencia a CHX, por el uso prolongado de esta sustancia, explicado por cambios genéticos que favorecen la aparición de nuevos clones de microorganismos con altas características de resistencia, además se ha demostrado que el uso cotidiano de CHX produce efectos adversos como pigmentación de piezas dentales y alteraciones del gusto. (Quiryneen et al. 2001)

Por esta situación, se ha investigado otra alternativa como es el caso del ácido hipocloroso (HClO), que tiene un compuesto activo del hipoclorito de sodio con menor cantidad de efectos secundarios, debido a que este compuesto es generado de manera natural por el cuerpo humano, específicamente en el sistema inmunitario, el efecto

antimicrobiano esta producido por la capacidad de penetrar la membrana bacteriana alterando la estructura y procesos metabólicos, causando su muerte (de Souza et al. 2020). Dentro de las características también encontró su biocompatibilidad con tejidos orales, así como el efecto antiinflamatorio en la mucosa oral, esta sustancia interfiere en la síntesis de proteínas en las células microbianas destruyéndolas, además de no presentar efectos adversos en el uso normal diario, ya que biológicamente el HClO es sintetizado por el cuerpo humano por el sistema inmune (neutrófilos y macrófagos) en un proceso llamado estallido respiratorio durante la fagocitosis de antígenos (Tartaglia et al. 2022).

En la odontología esta sustancia antimicrobiana no antibiótica es utilizada en la irrigación en endodoncia y como enjuagues bucales al 0,05% para minimizar la acumulación de bacterias y patógenos orales, es una solución que erradica eficazmente y rápidamente la mayoría de los microorganismos en estudios *In Vitro*, es capaz de eliminar la matriz polimérica externa de las biopelículas formadas por microorganismos de una manera similar a rasparlas físicamente (Lin et al., 2023).

También se ha demostrado que 180 ppm de HClO es eficaz para limpiar superficies de implantes de titanio contaminadas con biopelículas y es comparable a NaOCl y CHX, pero debe usarse en cuatro veces el volumen de NaOCl y CHX (Palone et al., 2024), además por la creciente amenaza de la resistencia bacteriana en todo el mundo, ha habido un interés importante en el uso de HClO para tratar enfermedades asociadas a biopelículas e infecciones virales (Gessa-Sorroche et al., 2022). De acuerdo Tsai et al. (2024), el HClO exhibió una actividad antimicrobiana y una biocompatibilidad dependientes de la concentración, y podría reducir significativamente las poblaciones de bacterias asociadas a la vía oral sin citotoxicidad adversa, a una concentración de 400 ppm de HClO pueden considerarse un antiséptico potencial en términos de actividad antimicrobiana y no citotoxicidad, además la proporción bacteriostática del tratamiento de 10 minutos fue

ligeramente mayor que la del tratamiento de 1 minuto. Por lo tanto, la solución antimicrobiana de HClO no antibiótica podría usarse como posible enjuague bucal para reducir la gingivitis y la placa, o como irrigante del conducto radicular y en el tratamiento de la periimplantitis.

No obstante, Lafaurie et al. (2015) expresa que la inhibición antimicrobiana del HClO es menor en bacterias Gram positiva y aumenta en los microorganismos Gram negativos, sobre esto Tsai et al. (2024) aducen que la eficacia de la solución de HClO contra los microorganismos está influenciada por muchos factores, incluido el pH, la concentración, el tiempo o el volumen, donde un mayor volumen, una alta concentración y un tiempo de tratamiento prolongado aumentarían la actividad bactericida, también demostró un efecto antimicrobiano del HClO mayor en las bacterias orales Gram negativas que las Gram positivas.

De acuerdo con lo antes descrito este estudio pretende determinar la capacidad antimicrobiana del ácido hipocloroso al 0,25%, 0,75% y 1,25% sobre cepas de *Streptococcus mutans* en aparatología de ortodoncia a través de pruebas microbiológicas.

Metodología

La investigación es tipo experimental e *In Vitro* debido a que se utilizó en el estudio microorganismos (la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175) que fue proporcionada por el laboratorio de la Universidad de los Hemisferios, en un ambiente controlado Laboratorio Biohack UIO para evaluar el efecto inhibitorio del ácido hipocloroso en concentraciones 0,25%, 0,75% y 1,25% sobre *Streptococcus mutans* en alambres de ortodoncia de acero y niti.

Se utilizó una muestra de 20 arcos de ortodoncia 10 níquel-titanio (Ni-Ti) y 10 acero inoxidable adheridos con *Streptococcus mutans* de 2 cm de longitud expuestos a

ácido hipocloroso en las siguientes concentraciones 0,25%, 0,75% y 1,25%, clorhexidina 2 % y solución estéril para determinar el efecto antibacteriano siguiendo la metodología empleada por Canongia, Acp, et al.

Este estudio tuvo tres fases la primera fue comprobar la adherencia del *Streptococcus mutans* a los alambres de ortodoncia, después se valoró el efecto inhibitorio de las diferentes sustancias sobre la bacteria y finalmente se evaluó el efecto inhibitorio del ácido hipocloroso sobre las bacterias en los alambres de ortodoncia.

1. Preparación del medio de cultivo y tubos de ensayo

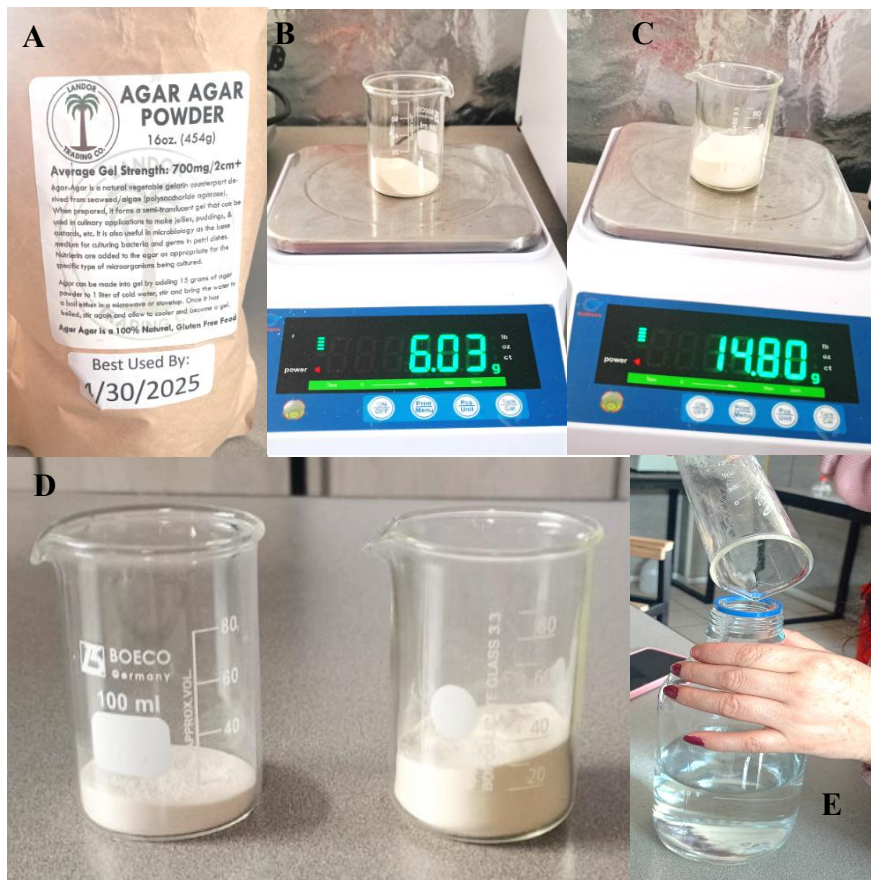
Para evaluar la adhesión de *Streptococcus mutans* a los diferentes tipos de alambres ortodónticos, se emplearon 20 tubos de ensayo con medio de cultivo Brain Heart Infusion (BHI). Se preparó el medio BHI disolviendo 37 g de polvo por litro de agua destilada, siguiendo las indicaciones del fabricante.

Procedimiento:

1. Se pesaron 14,8 g de BHI en polvo utilizando una balanza de precisión.
2. En un vaso de precipitados, se añadió el BHI al volumen correspondiente de 400 mL de agua destilada.
3. La mezcla se agitó cuidadosamente hasta que el BHI se disolvió completamente.
4. El medio se transfirió a tubos de ensayo.
5. La solución fue esterilizada en una autoclave a 121°C durante 15 minutos para eliminar cualquier agente contaminante.
6. Tras la esterilización, el medio se dejó enfriar antes de ser utilizado.

(Madigan,2015)

Figura 1. A) BHI en polvo. B) Peso inicial de BHI. C) Peso final de BHI. D) Demostración del peso posterior al pesado en la balanza de precisión. E) del BHI al volumen correspondiente de 400 mL de agua destilada.



Elaborado por: Janeth Elizabeth Barragán González Fuente: Investigación

Preparación de los alambres

Los alambres son marca Orthometric calibre 0.019 x 0.025 pulgadas tanto de acero como niti, estudios previos confirmaron que las propiedades químicas y la composición tenía similitud con marcas reconocidas como American Orthodontics, por lo antes mencionado utilizamos Orthometric por la aceptación a nivel de Latinoamérica (Hu, 2015)

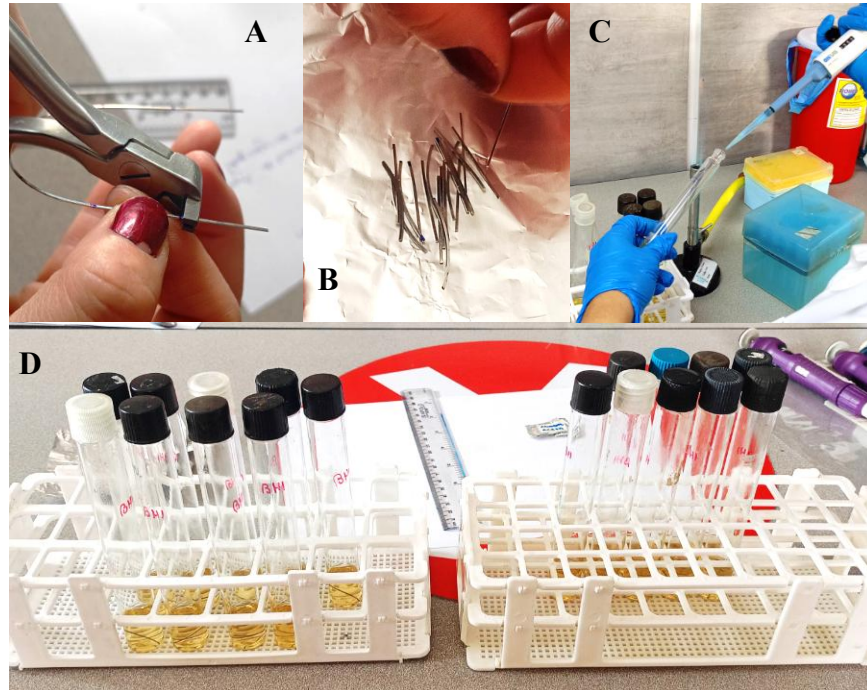
Los alambres fueron cortados previamente en segmentos de 2 cm, utilizando una regla milimétrica y clasificados según el tipo:

- i. 10 tubos contenían segmentos de alambre NiTi.
- ii. 10 tubos contenían segmentos de alambre de acero inoxidable.

Cada tubo recibió un segmento de alambre, sumergido completamente en el medio

BHI. (Oliveira, D. et al 2021)

Figura 2. A) Corte de alambre de ortodoncia. B) Muestras de alambre. C) Inserción de los alambres en los tubos de precipitados. D) Tubos de precipitados con las muestras de alambres.



Elaborado por: Janeth Elizabeth Barragan González Fuente: Investigación

Esterilización previa a la inoculación

Una vez preparados, los tubos de ensayo, junto con los alambres sumergidos, fueron introducidos en un esterilizador para eliminar cualquier agente contaminante que interfiera con el experimento.

Este paso adicional garantizó condiciones completamente asépticas antes de la inoculación bacteriana. (McDonnell, 1999)

Activación de *Streptococcus mutans*

La bacteria fue activada en un medio de cultivo Brain Heart Infusion (BHI) fresco, consistió en inocular una muestra del microorganismo en 10 mL de medio BHI estéril y someterlo a incubación a 37°C durante 24 horas. (Oliveira, D. et al 2021)

El crecimiento bacteriano fue confirmado visualmente mediante la observación de turbidez en el medio, indicando la proliferación de la bacteria.

Una vez activado, el cultivo fue utilizado como solución madre. Este se mezcló adecuadamente para homogeneizar la concentración bacteriana y se empleó como fuente para inocular los tubos de ensayo, asegurando la presencia uniforme de *S. mutans* en todas las muestras experimentales. (Oliveira, D. et al 2021)

Figura 3. A) Presencia uniforme de *S. mutans* en todas las muestras experimentales.



Elaborado por: Janeth Elizabeth Barragan González Fuente: Investigación

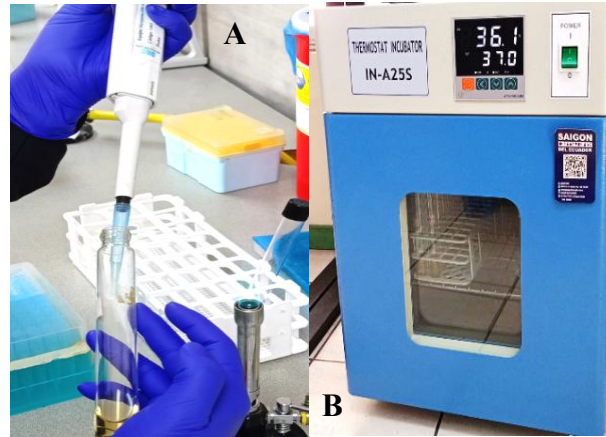
Inoculación de los tubos de ensayo

Los tubos de ensayo contenían previamente:

- a) 5 mL de medio BHI estéril.
- b) Un segmento de alambre (niti o acero inoxidable) de 2 cm de longitud que fue previamente esterilizado.

A cada tubo se le añadieron 0.1 mL de la solución madre de *S. mutans* utilizando una pipeta estéril, asegurando condiciones asépticas en todo momento. Los tubos fueron sellados y llevados a incubación a 37°C durante 24 para permitir la interacción entre las bacterias y los alambres. (Oliveira, D. et al 2021)

Figura 4. A) Tubo de ensayo con 0,1 mL de la solución madre de *S. mutans* utilizando una pipeta estéril y muestra del alambre. B) Autoclave a 37 °C durante 24 horas bajo condiciones microaerófilas. (Oliveira, D. et al 2021)



Elaborado por: Janeth Elizabeth Barragan González Fuente: Investigación

Evaluación del crecimiento de *Streptococcus mutans*

Tras la incubación inicial de 24 horas, se observó el crecimiento de *Streptococcus mutans* alrededor de los segmentos de alambre. Para cuantificar la cantidad de bacterias adheridas y en suspensión, se siguieron los siguientes pasos:

a) Retiro de los alambres

Cada alambre fue retirado cuidadosamente de los tubos de ensayo utilizando pinzas estériles para evitar la contaminación cruzada y asegurar condiciones asépticas durante todo el proceso. (Oliveira, D. et al 2021)

b) Lavado de la superficie de los alambres

Los alambres se sometieron a un lavado suave con solución salina estéril para eliminar las bacterias no adheridas. Este proceso se repitió en tres ocasiones, asegurando la eliminación de cualquier bacteria libre o suspendida en el medio que no estuvo adherida firmemente a la superficie del alambre. (Oliveira, D. et al 2021)

Durante el lavado, los alambres fueron sumergidos y agitados suavemente en la solución salina para facilitar la remoción de las bacterias.

Después de desprender las bacterias no adheridas se toma el alambre y se colocó en medio HBI y se incubó por 24 horas. (Oliveira, D. et al 2021)

c) Preparación para la cuantificación

Transcurrido este tiempo, se observa una elevada turbidez, por lo que es necesario realizar diluciones de la solución antes de la siembra en agar BHI y el posterior conteo de colonias. (Oliveira, D. et al 2021)

Figura 5. A) Inoculación en HBI de las muestras de alambres



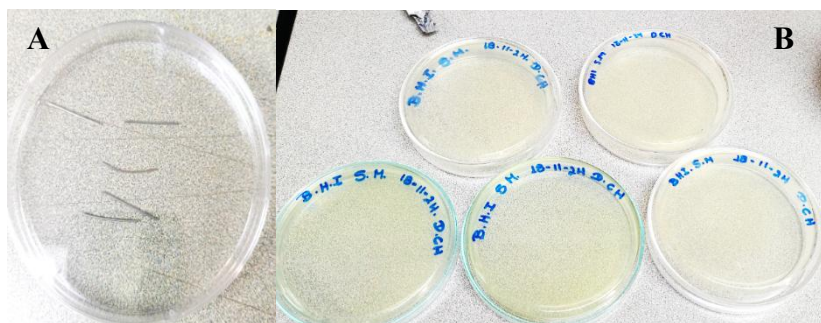
Elaborado por: Janeth Elizabeth Barragan González Fuente: Investigación

Figura 6. A) Proceso de turbidez



Elaborado por: Janeth Elizabeth Barragan González Fuente: Investigación

Figura 7. A) Muestras de alambres. B) Siembra en agar HBI



Elaborado por: Janeth Elizabeth Barragan González Fuente: Investigación

Siembra en medio sólido BHI y proceso de incubación

a. Siembra en cajas Petri con medio BHI sólido

Se prepararon las cajas Petri con medio BHI sólido previamente esterilizado y enfriado a temperatura ambiente. De cada dilución (10^{-5} , 10^{-6}), se pipetearon 100 μ L de la muestra en la superficie de las placas Petri. La siembra se realizó utilizando el método de extensión superficial, con asa de Drigalski asegurando que las bacterias se distribuyeron de manera uniforme en la superficie del agar. (Oliveira, D. et al 2021)

La muestra distribuida de la siguiente manera:

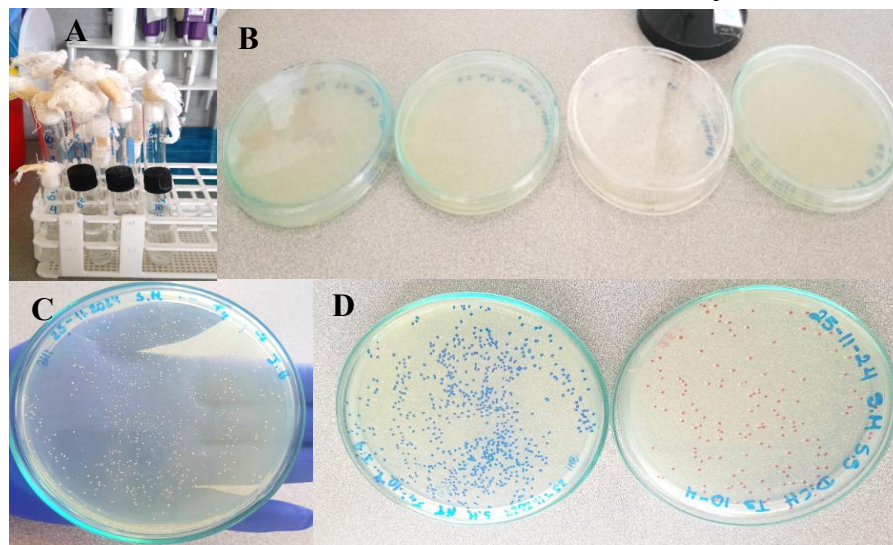
1. Dilución 10⁻⁵ en alambre NiTi fueron 9 cajas Petri
2. Dilución 10⁻⁶ en alambre NiTi fueron 11 cajas Petri
3. Dilución 10⁻⁵ en alambre acero fueron 8 cajas Petri
4. Dilución 10⁻⁶ en alambre de acero fueron 10 cajas Petri

Las placas sembradas fueron cuidadosamente etiquetadas y colocadas en la incubadora a 37°C durante 24 horas, para favorecer el crecimiento de *Streptococcus mutans*. Durante la incubación, las bacterias presentes en las diluciones comenzaron a multiplicarse, formando colonias visibles en la superficie del agar. (Forbes, 2007)

Las colonias de *S. mutans* fueron fácilmente identificables debido a su morfología característica. Mediante observación directa se cuantificó el número de colonias en cada caja Petri. Las colonias fueron contadas manualmente. (Madigan, 2015)

Se registraron los resultados de cada dilución para calcular la cantidad de *Streptococcus mutans* en la muestra original, expresada como unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro. (Forbes, 2007)

Figura 8. A) Tubos de ensayos con la muestra. B y C) Placas Petri inoculadas. D) Observación directa se cuantificó el número de colonias en cada caja Petri



Elaborado por: Janeth Elizabeth Barragan González Fuente: Investigación

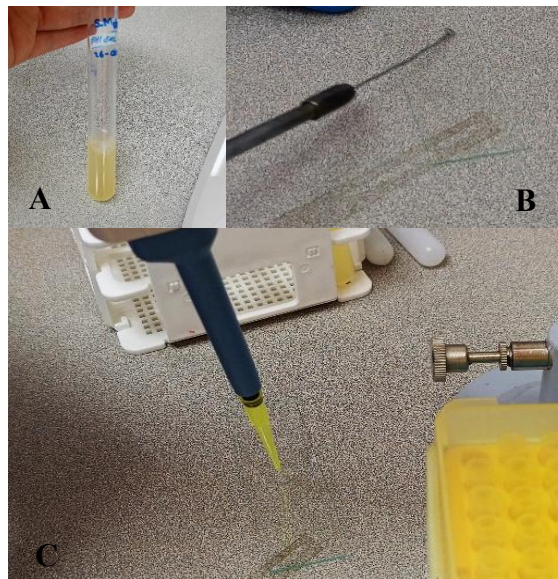
b. **Tinción de Gram**

Para confirmar que la bacteria fue un coco Gram positivo y asegurarse de que la muestra no estuviera contaminada, se realizó la tinción de Gram siguiendo estos pasos:

- i. Preparación de la muestra:** Se tomó una pequeña cantidad de la muestra bacteriana y se colocó sobre un portaobjetos. Luego, se extendió bien para formar una capa delgada y la dejó secar al aire. Para fijarla mejor, se acercó el portaobjetos a la llama del mechero. (Madigan, 2015)
- ii. Fijación de las bacterias:** Una vez seca, se pasó el portaobjetos rápidamente por la llama del mechero. Esto ayuda a que las bacterias se adhieran al vidrio y evita que se desprendan durante el proceso de tinción. (Madigan, 2015)
- iii. Tinción con cristal violeta:** Se aplicó unas gotas de cristal violeta sobre la muestra y se dejó actuar por un minuto. Este colorante hace que todas las bacterias se tiñan de morado. Luego, se enjuagó suavemente con agua destilada para eliminar el exceso. (Madigan, 2015)
- iv. Fijación con lugol:** Se agregó una gota de lugol y se esperó otro minuto. Este reactivo refuerza la unión del cristal violeta con la pared celular de las bacterias. Después, se enjuagó nuevamente con agua destilada. (Madigan, 2015)
- v. Decoloración con alcohol:** Se agregó alcohol y se dejó actuar durante 15 segundos. En este paso, las bacterias Gram negativas pierden el color morado porque la membrana externa se disuelve, mientras que las Gram positivas lo retienen gracias a la pared celular más gruesa. Para evitar una decoloración excesiva, se enjuagó rápidamente con agua destilada. (Madigan, 2015)

- vi. **Contratinción con safranina:** Se aplicó unas gotas de safranina y se dejó actuar por un minuto. Este colorante tiñe de rojo las bacterias Gram negativas, que habían perdido el color morado. Después, se enjuagó con agua destilada para retirar el exceso. (Madigan, 2015)
- vii. **Secado y observación:** Se dejó que el portaobjetos se secase al aire y luego lo observamos bajo el microscopio. Primero se utilizó un objetivo de baja magnificación para ubicar la muestra y luego un objetivo de inmersión en aceite (100x) para analizarla con más detalle. Finalmente, se confirmó que las bacterias eran cocos Gram positivos (morados) y que la muestra estaba libre de contaminación. (Forbes, 2007)

Figura 9. A) Preparación de la muestra. B y C) Colocación de la muestra en el portaobjeto.



Elaborado por: Janeth Elizabeth Barragan González Fuente: Investigación

Figura 10. A y B) Proceso de tinción



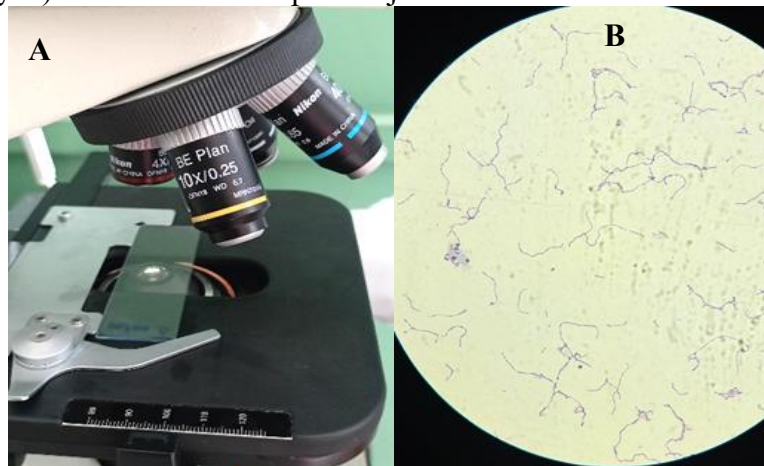
Elaborado por: Janeth Elizabeth Barragan González Fuente: Investigación

Figura 11. A y B) Secado y observación



Elaborado por: Janeth Elizabeth Barragan González Fuente: Investigación

Figura 12. A y B) Visualización del portaobjeto con aceite



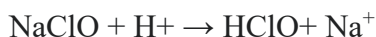
Elaborado por: Janeth Elizabeth Barragan González Fuente: Investigación

2. Actividad antimicrobiana de ácido hipocloroso sobre *Streptococcus mutans*

El ácido hipocloroso fue realizado en un laboratorio de manera controlada con el método de acidificación de hipoclorito de sodio (NaClO) que se encuentra comercialmente como cloro líquido (White, 2010)

El NaClO es un líquido amarillento con fuerte olor a cloro cuya concentración comercial concentrada va desde el 9,5 al 12 % de cloro activo, mientras que el NaClO de uso doméstico tiene concentraciones de entre 3 a 5 % (Gordon, 2001).

En un reactor, se desarrolla la reacción entre el NaClO de concentración conocida y un ácido orgánico también de concentración conocida de acuerdo con la siguiente reacción química (Prevention, 2008):



Se realizan los cálculos estequiométricos para determinar el reactivo limitante, de acuerdo con la concentración de HClO que se necesita obtener. El ácido orgánico es una solución de concentración conocida (Prevention, 2008)

En el reactor (frasco de reacción) donde se va a realizar el proceso químico, se vierte el volumen calculado estequiométricamente del NaClO y luego se va añadiendo poco a poco la solución de ácido orgánico. Todo el proceso debe realizarse en campana de extracción y con equipo de protección personal para laboratorio químico ya que, los vapores que se desprenden de la reacción son tóxicos (White, 2010).

Se deja reaccionar por el lapso de 30 minutos; una vez terminada la reacción se debe realizar el ensayo de cuantificación de cloro activo para conocer la concentración de HClO formado. Una vez realizado el ensayo y si la concentración encontrada está dentro del rango requerido; se procede a regular el PH con una solución buffer (tampón) recién preparada y un estabilizante, el producto final se trasvasa a un frasco de polietileno de alta densidad con tapa hermética ya que, pese a estar estabilizada la solución de HClO puede

cambiar de concentración por su alta inestabilidad (Gordon, 2001). Cada solución de HClO para este trabajo fue obtenida de manera individual.

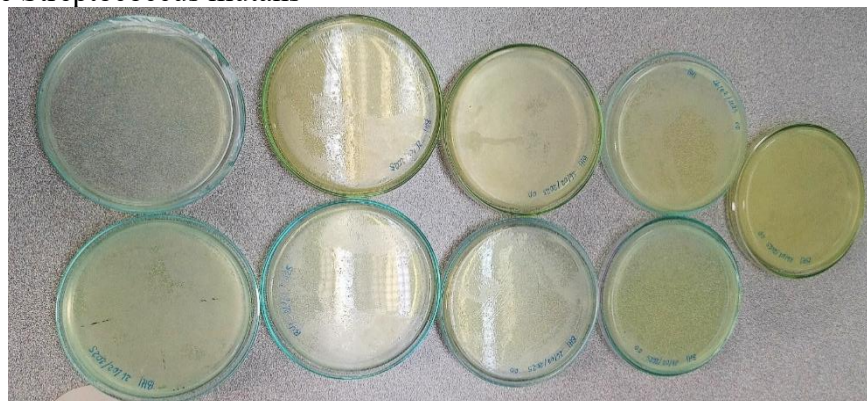
Para evaluar el efecto inhibitorio del ácido hipocloroso sobre *Streptococcus mutans*, se prepararon 16 cajas Petri con medio de cultivo agar HBI, y se sembró *Streptococcus mutans* en cada una utilizando la técnica de césped que se activó previamente (Madigan, 2015)

En cada caja, se realizó un agujero en el agar utilizando la técnica de pozo para realizar el antibiograma. A continuación, se colocaron las siguientes sustancias en los pozos:

- i. Cuatro cajas con ácido hipocloroso a una concentración de 0,25%.
- ii. Cuatro cajas con ácido hipocloroso a una concentración de 0,75%.
- iii. Cuatro cajas con ácido hipocloroso a una concentración de 1,25%.
- iv. Tres cajas con clorhexidina al 2% (control positivo).
- v. Una caja con suero fisiológico (control negativo).

Las cajas fueron incubadas a 37°C durante 24 horas para permitir el crecimiento de *Streptococcus mutans* y la interacción con las sustancias aplicadas. (Forbes, 2007)

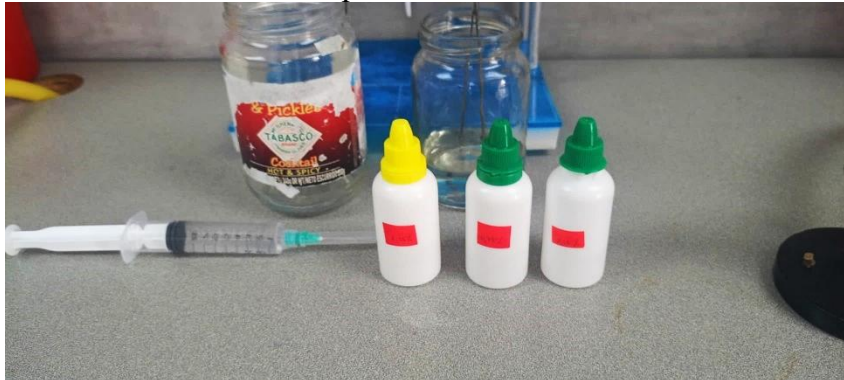
Figura 13. Incubación de las placas Petri a 37°C durante 24 horas para permitir el crecimiento de *Streptococcus mutans*



Elaborado por: Janeth Elizabeth Barragán González Fuente: Investigación

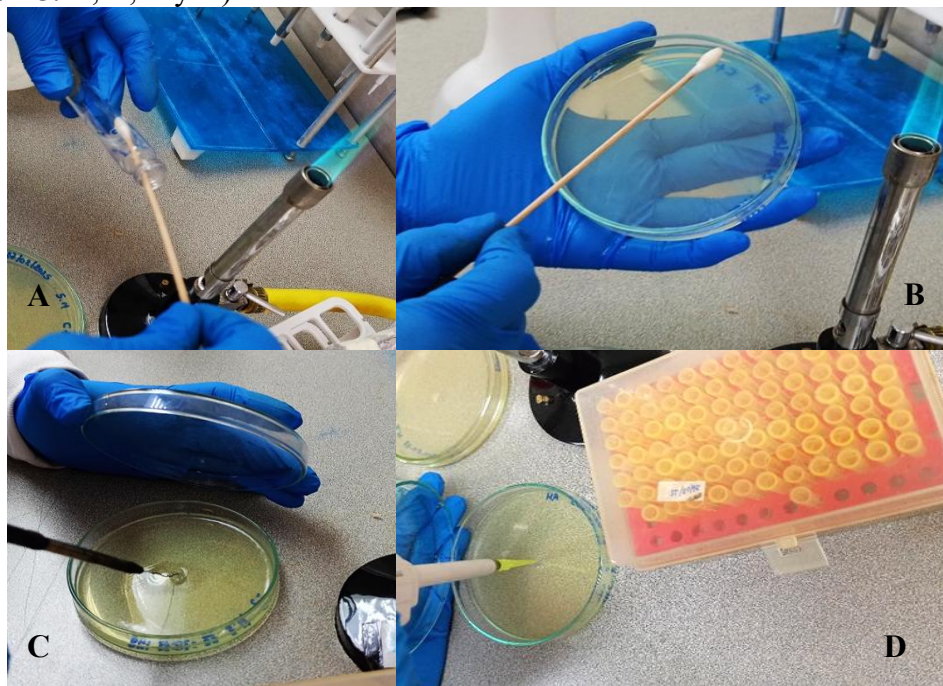
Después de la incubación, se midió el halo inhibitorio alrededor de los pozos, lo que permitió evaluar el efecto inhibitorio de cada concentración de ácido hipocloroso, así como de los controles. El tamaño del halo inhibitorio fue utilizado como un indicador de la efectividad de cada sustancia en la inhibición del crecimiento bacteriano. (Gordon, 2001)

Figura 14. Materiales utilizados para el crecimiento bacteriano



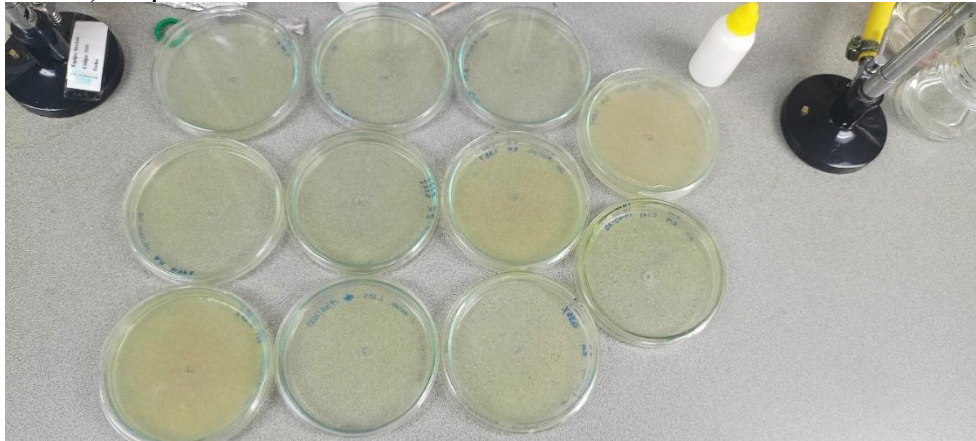
Elaborado por: Janeth Elizabeth Barragan González Fuente: Investigación

Figura 15. A, B, C y D) Procedimiento del crecimiento bacteriano



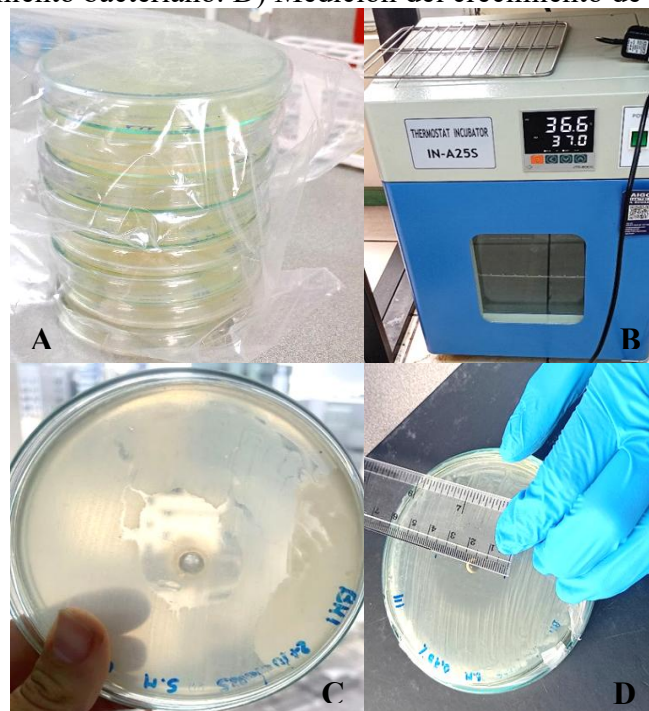
Elaborado por: Janeth Elizabeth Barragan González Fuente: Investigación

Figura 16. A) Preparación del cultivo bacteriano



Elaborado por: Janeth Elizabeth Barragan González Fuente: Investigación

Figura 17. A) Placas Petri con el cultivo bacteriano. B) Incubadora termostática. C) Placa Petri con el crecimiento bacteriano. D) Medición del crecimiento de la bacteria



Elaborado por: Janeth Elizabeth Barragan González Fuente: Investigación

3. Efecto inhibitorio de las diferentes concentraciones del ácido hipocloroso sobre *Streptococcus mutans* en alambres de ortodoncia

El experimento se llevó a cabo utilizando 16 tubos de ensayo, divididos en dos grupos de ocho tubos cada uno siguiendo la metodología realizada por (Madigan, 2015).

Preparación del medio de cultivo

Se preparó el medio de cultivo BHI y se distribuyeron 5 mL en cada tubo de ensayo para crear las condiciones necesarias para el crecimiento bacteriano (Atlas, 2010).

Distribución de los materiales

En el primer grupo (8 tubos), se colocó un segmento de alambre de acero de calibre 0,019 x 0,025 pulgadas y 2 cm de longitud.

En el segundo grupo (8 tubos), se colocó un segmento de alambre de NiTi (níquel-titanio) con las mismas dimensiones (0,019 x 0,025 pulgadas y 2 cm de longitud).

Todos los tubos fueron esterilizados en autoclave para garantizar condiciones asépticas y evitar cualquier contaminación en el cultivo (Forbes, 2007).

Inoculación y cultivo

- a) Se añadió 0,1 mL de *Streptococcus mutans* activado en cada tubo, asegurando que cada tubo contuviera una cantidad adecuada de bacteria.
- b) Los tubos fueron incubados a 37°C durante 24 horas, lo que permitió un crecimiento adecuado del microorganismo (Madigan, 2015).

Comprobación del crecimiento bacteriano

Una vez comprobado el crecimiento bacteriano en los alambres, los segmentos de alambre fueron extraídos de los tubos y expuestos a las diferentes concentraciones de ácido hipocloroso (White, 2010).

Exposición al ácido hipocloroso

Se agitó el tubo de ensayo para asegurar la homogeneización del contenido, el alambre con crecimiento bacteriano se colocó en una caja Petri esterilizada.

Se aplicaron las diferentes concentraciones de ácido hipocloroso (0,25%, 0,75% y 1,25%) sobre el alambre, dejándolas actuar durante 30 segundos. Además, se repitió el mismo procedimiento para el control positivo, usando clorhexidina al 2%, y para el control negativo, usando suero fisiológico (Madigan, 2015) (McDonnell, 1999).

Una vez transcurrido el tiempo de exposición, el alambre se colocó en un tubo de ensayo con 5 mL de BHI esterilizado para asegurar que no quedara contaminado.

Incubación para evaluación del crecimiento bacteriano

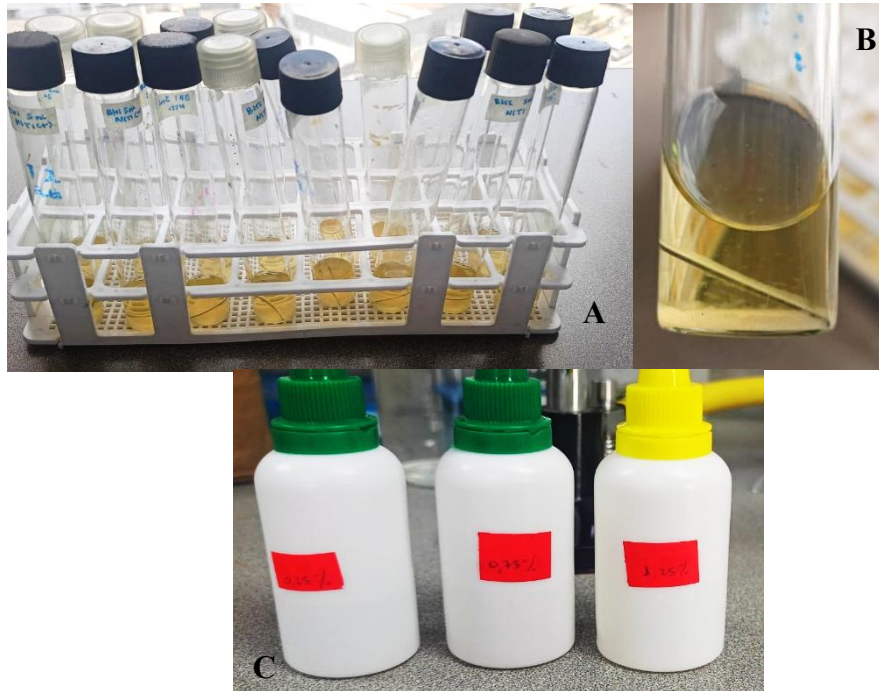
Los tubos con los alambres expuestos a las sustancias fueron incubados a 37°C durante 24 horas para permitir el crecimiento bacteriano y evaluar el efecto inhibitorio de las diferentes concentraciones de ácido hipocloroso, la clorhexidina y el suero fisiológico (Prevention, 2008).

Evaluación del crecimiento bacteriano

Transcurrido el tiempo de incubación, se observó el crecimiento bacteriano en los tubos mediante la observación de la turbidez del medio de cultivo.

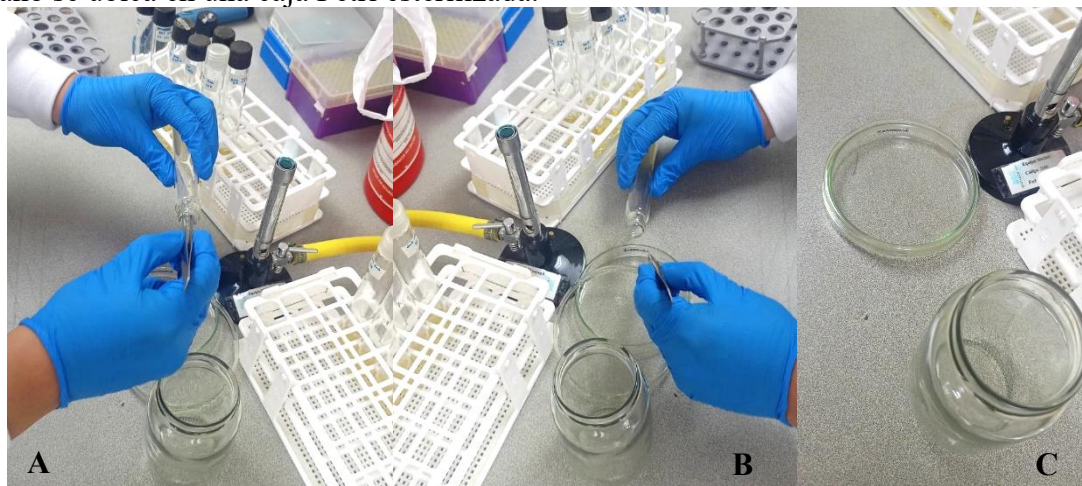
Se evaluó la cantidad de turbidez para determinar el efecto inhibitorio de las diferentes concentraciones de ácido hipocloroso y los controles (clorhexidina y suero fisiológico) (Gordon, 2001).

Figura 18. A y B) Tubos de ensayos con cultivo y alambres. C) Solución de ácido hipocloroso



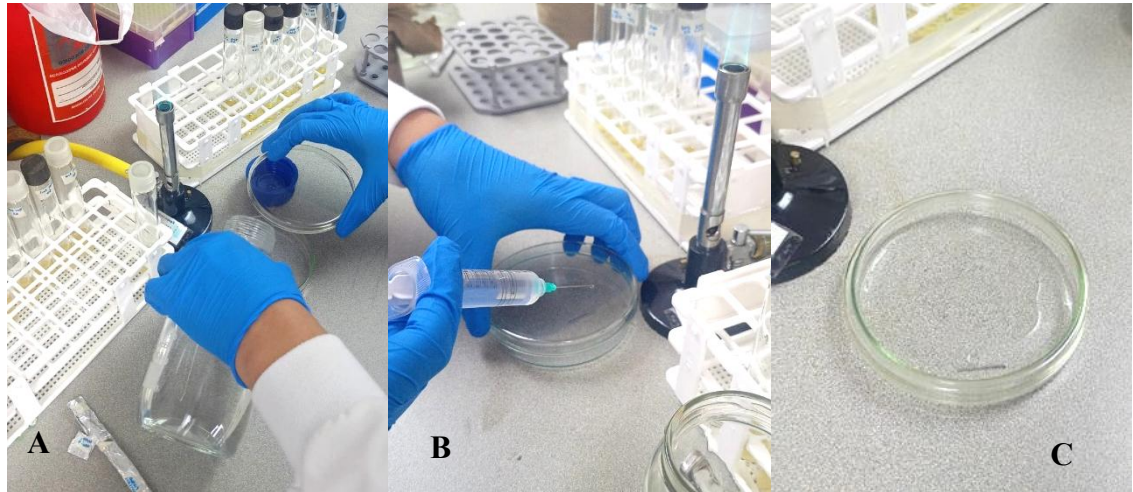
Elaborado por: Janeth Elizabeth Barragan González Fuente: Investigación

Figura 19. A y B) Homogenización del tubo de ensayo con el alambre. C) El crecimiento bacteriano se ubica en una caja Petri esterilizada.



Elaborado por: Janeth Elizabeth Barragan González Fuente: Investigación

Figura 20. A, B y C) Incubación para evaluación del crecimiento bacteriano con el ácido hipocloroso



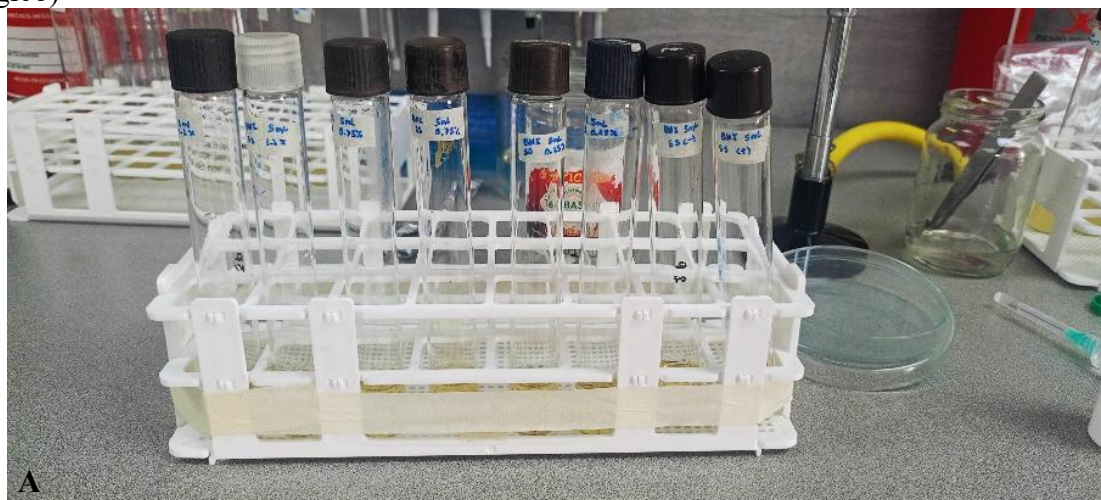
Elaborado por: Janeth Elizabeth Barragan González Fuente: Investigación

Figura 21. A) Incubación del crecimiento bacteriano



Elaborado por: Janeth Elizabeth Barragan González Fuente: Investigación

Figura 22. A) Evaluación de la cantidad de turbidez para determinar el efecto inhibitorio de las diferentes concentraciones de ácido hipocloroso y los controles (clorhexidina y suero fisiológico)



Elaborado por: Janeth Elizabeth Barragan González Fuente: Investigación

Hallazgos

Resultados

Tabla 1. Halos de inhibición (mm) por grupo y réplica

Grupo	Réplica	Halo..mm.
HClO 0.25%	1	33
HClO 0.25%	2	34
HClO 0.25%	3	34
HClO 0.25%	4	30
HClO 0.75%	1	37
HClO 0.75%	2	34
HClO 0.75%	3	34
HClO 0.75%	4	30
HClO 1.25%	1	37
HClO 1.25%	2	38
HClO 1.25%	3	45
HClO 1.25%	4	39
Clorhexidina 2%	1	30
Clorhexidina 2%	2	32
Clorhexidina 2%	3	27
Suero Fisiológico	1	0

Fuente: Investigación

a. Análisis descriptivo

Tabla 2. Estadísticas descriptivas por grupo

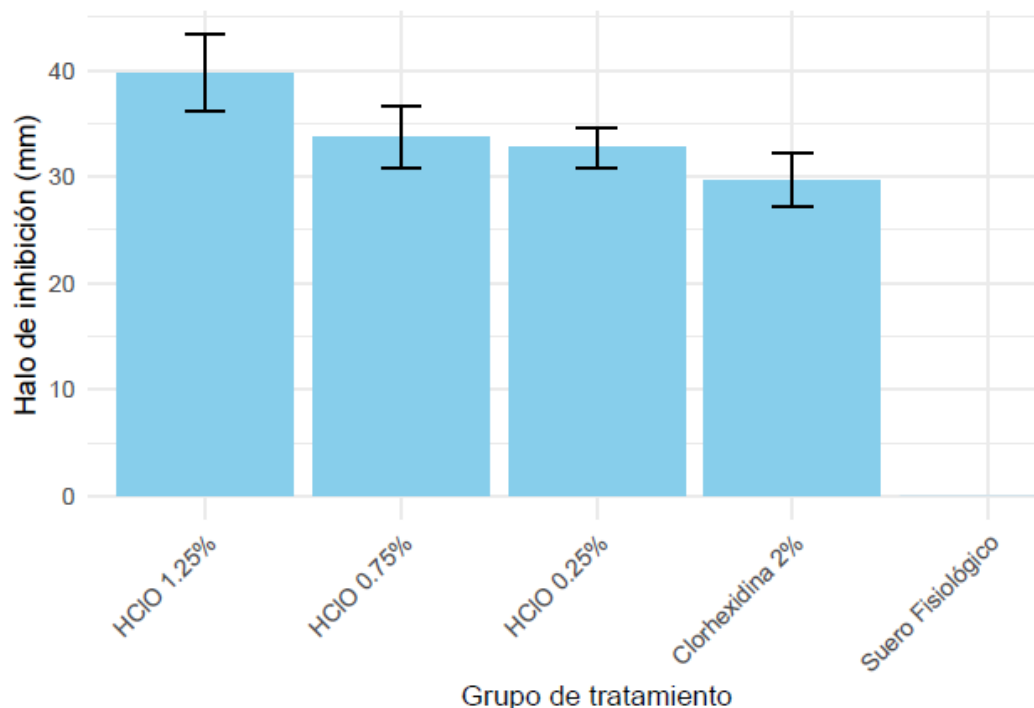
Grupo	n	Promedio	Desviación estándar	Mínimo	Máximo
Clorhexidina 2%	3	29.67	2.52	27	32
HClO 0.25%	4	32.75	1.89	30	34
HClO 0.75%	4	33.75	2.87	30	37
HClO 1.25%	4	39.75	3.59	37	45
Suero Fisiológico	1	0.00	NA	0	0

Fuente: Investigación

En la Tabla 2 se resumen los valores estadísticos de los halos de inhibición generados por cada tratamiento frente a *Streptococcus mutans*. El tratamiento con ácido hipocloroso (HClO) al 1.25% presentó el mayor efecto antimicrobiano, con un halo promedio de 39.75 mm, seguido por HClO al 0.75% (33.75 mm) y HClO al 0.25% (32.75 mm).

Por otro lado, el control negativo, suero fisiológico, no presentó actividad antimicrobiana (0 mm), validando la efectividad comparativa de los demás tratamientos.

En cuanto a la dispersión, el tratamiento con HClO al 1.25% también mostró la mayor variabilidad (DE= 3.59 mm), mientras que HClO al 0.25% tuvo la menor (DE = 1.89 mm), lo que sugiere resultados más consistentes en esa concentración. El control positivo, clorhexidina al 2%, mostró un halo promedio de 29.67 mm, menor que el obtenido por todas las concentraciones de HClO.

Gráfico 1. Promedio de halo de inhibición \pm DE por grupo

Fuente: Investigación

El tratamiento con HClO al 1.25% presentó el mayor halo de inhibición promedio frente a *Streptococcus mutans*, seguido por HClO al 0.75% y 0.25%. Todos los tratamientos con HClO mostraron mayor efecto antimicrobiano que la clorhexidina al 2%. El suero fisiológico no presentó actividad, confirmando su rol como control negativo.

b. Prueba de Normalidad

La prueba de normalidad se realiza para determinar si los datos de cada grupo siguen una distribución normal, es decir, una distribución simétrica y con forma de campana (curva de Gauss). Esta verificación es importante porque muchas pruebas estadísticas tradicionales, llamadas pruebas paramétricas (como ANOVA), asumen que los datos son normales dentro de cada grupo.

Si los datos no son normales, se deben utilizar pruebas no paramétricas, que son más robustas y no requieren ese supuesto (como la prueba de Kruskal-Wallis). Por tanto,

evaluar la normalidad permite elegir correctamente la prueba estadística, asegurando que los resultados sean válidos y confiables.

Tabla 3. Prueba de normalidad (Shapiro-Wilk)

Grupo	p_value
Clorhexidina 2%	0.7804
HClO 0.25%	0.0865
HClO 0.75%	0.6248
HClO 1.25%	0.1627

Fuente: Investigación

Los resultados de la prueba de Shapiro-Wilk muestran que todos los grupos analizados presentan p-valores superiores a 0.05, lo que indica que no hay evidencia significativa para rechazar la normalidad en ninguno de los casos. Por tanto, se puede asumir que los datos siguen una distribución aproximadamente normal dentro de cada grupo.

Esto permite el uso de pruebas paramétricas como el ANOVA de un factor para comparar los tratamientos.

c. Prueba paramétrica ANOVA

El ANOVA de un factor (Análisis de la Varianza) permite comparar más de dos grupos para determinar si existe al menos una diferencia significativa en sus medias. En este caso, se utiliza para evaluar si los diferentes tratamientos generan halos de inhibición significativamente distintos frente a *Streptococcus mutans*.

Si el resultado es significativo ($p < 0.05$), indica que al menos un grupo difiere de los demás, y se debe aplicar una prueba post-hoc para identificar entre qué grupos están esas diferencias.

Tabla 4. Prueba paramétrica ANOVA

```
##           Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
## Grupo      3 194.02   64.67   8.185 0.00382 **
## Residuals  11  86.92    7.90
## ---
## Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

Fuente: Investigación

El análisis de varianza (ANOVA de un factor) mostró diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos evaluados ($F = 8.185$, $p = 0.0038$). Esto indica que al menos uno de los tratamientos genera un halo de inhibición significativamente distinto frente a *Streptococcus mutans* en comparación con los demás.

d. Prueba Post-Hoc de Tukey

La prueba post-hoc de Tukey (también conocida como Tukey HSD, por Honest Significant Difference) se utiliza después de un ANOVA significativo para comparar todos los pares de grupos y determinar cuáles difieren significativamente entre sí.

Esta prueba controla el error tipo I que se genera al hacer múltiples comparaciones, ajustando los valores p de forma adecuada. Es especialmente útil cuando se han comparado 3 o más grupos, como en este estudio.

Tabla 5. Comparaciones múltiples de medias de Tukey

```
## Tukey multiple comparisons of means
## 95% family-wise confidence level
##
## Fit: aov(formula = Halo_mm ~ Grupo, data = datos_anova)
##
## $Grupo
##           diff           lwr           upr           p adj
## HCl0 0.25%-Clorhexidina 2%  3.083333 -3.37789123  9.544558 0.5044011
## HCl0 0.75%-Clorhexidina 2%  4.083333 -2.37789123 10.544558 0.2817655
```

Fuente: Investigación

Tabla 6. Comparaciones múltiples de medias de Tukey (cont)

##	HC10 1.25%-Clorhexidina 2%	10.083333	3.62210877	16.544558	0.0031098
##	HC10 0.75%-HC10 0.25%	1.000000	-4.98193157	6.981932	0.9566538
##	HC10 1.25%-HC10 0.25%	7.000000	1.01806843	12.981932	0.0212367
##	HC10 1.25%-HC10 0.75%	6.000000	0.01806843	11.981932	0.0492499

Fuente: Investigación

La prueba de comparaciones múltiples de Tukey reveló que:

El tratamiento con HC10 al 1.25% mostró diferencias estadísticamente significativas respecto a:

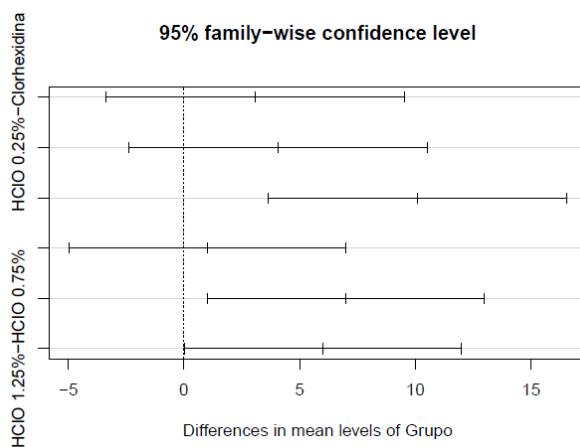
Clorhexidina al 2% ($p = 0.0031$)

- HC10 al 0.25% ($p = 0.0212$)
- HC10 al 0.75% ($p = 0.0492$)

No se observaron diferencias significativas entre:

- HC10 0.25% y Clorhexidina 2% ($p = 0.5044$)
- HC10 0.75% y Clorhexidina 2% ($p = 0.2818$)
- HC10 0.75% y HC10 0.25% ($p = 0.9567$)

Estos resultados confirman que HC10 al 1.25% fue significativamente más efectivo que las otras concentraciones de HC10 y el control positivo, en términos de halo de inhibición frente a *Streptococcus mutans*.

Gráfico 2. Medias con los límites con un nivel de confianza

Fuente: Investigación

Comparaciones múltiples mediante la prueba de Tukey HSD. Las líneas representan los intervalos de confianza del 95% para la diferencia de medias entre pares de grupos. Las comparaciones cuya barra no cruza la línea vertical en cero indican diferencias estadísticamente significativas. En este caso, el tratamiento con HClO al 1.25% mostró diferencias significativas frente a HClO 0.25%, HClO 0.75% y clorhexidina al 2%.

Análisis

El presente análisis demostró que todas las concentraciones evaluadas de ácido hipocloroso (HClO) presentaron actividad antimicrobiana frente a *Streptococcus mutans*, superando en eficacia al control negativo (suero fisiológico). El análisis de varianza (ANOVA) indicó diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ($p = 0.0038$), y el análisis post-hoc de Tukey reveló que la concentración de HClO al 1.25% fue significativamente más efectiva que las concentraciones más bajas (0.25% y 0.75%) y que el control positivo (clorhexidina al 2%).

Estos resultados sugieren que HClO al 1.25% es la concentración más eficaz dentro de las evaluadas y representa una alternativa potencial frente a antisépticos convencionales en la inhibición de *S. mutans*.

Discusión Y Conclusiones

Discusión.

Los alambres de ortodoncia requieren de un tratamiento químico para disminuir la adherencia de los microorganismos orales, como el *Streptococcus mutans*, causante principal de la caries dental y las manchas blancas (Nafarrate-Valdez et al., 2022). Por este motivo, se planteó determinar la capacidad antimicrobiana del ácido hipocloroso al 0,25%, 0,75% y 1,25% sobre cepas de *Streptococcus mutans* en aparatología de ortodoncia a través de pruebas de microbiológicas, en vista de que el ácido hipocloroso posee una

mayor eficiencia en la erradicación de las bacterias que se adhieren al alambre de ortodoncia (Millones-Gómez et al., 2023).

De acuerdo con Oliveira et al. (2021), identificó que la mayor adherencia de *Streptococcus mutans* se reporta en arcos de acero en contraste con NiTi, estos hallazgos concuerdan con lo expuesto en esta investigación, los autores aducen que este comportamiento se debe a diferentes factores como la tipología del material de la aparatología dental, la energía de la superficie y rugosidad, lo que se incide directamente en el grado de adherencia bacteriana.

Abutayyem et al. (2024) valida los resultados de adherencia de *Streptococcus mutans* en arcos dentales, expresa que mientras mayor porosidad en el alambre de acero aumenta la adhesión de la placa bacteriana y ocasiona la gingivitis, además produce mayor posibilidad de desmineralización del esmalte, por la elevada concentración salival del *S. mutans* y *L. acidophilus* (Bozkurt et al., 2020).

Tal como lo indica Nafarrate-Valdez et al. (2022), los aparatos de ortodoncia (alambres, bandas y brackets) al ser colocados en la cavidad oral son modificados por variaciones químicas, debido a los microorganismos y la interacción entre el material del alambre de ortodoncia, lo que produce el aumento de la presencia de bacterias acidogénicas como es el *Streptococcus mutans*.

Se evidenció que la actividad antimicrobiana del ácido hipocloroso al 1,25% sobre cepas de *Streptococcus mutans* en alambres de ortodoncia presenta mayor valor de inhibición de la bacteria, similar comportamiento se detalla en la investigación de Tsai et al. (2024), que demostró que al aumentar la concentración de la solución de HClO es más eficiente la acción contra *Streptococcus mutans*, la cual está influenciada por diferentes factores como la variación porcentual de HClO, el tiempo de exposición al tratamiento, pH, volumen, permitiendo reducir la cantidad de microorganismos orales.

Además, se determinó que existió diferencia significativa entre el ácido hipocloroso al 1,25% y la clorhexidina al 2% ($p < 0,05$), donde se demostró que la clorhexidina tiene el menor efecto inhibitorio sobre *Streptococcus mutans*, hallazgos que concuerdan con Aherne et al. (2022), este comportamiento ocurre por el efecto del HClO de desestabilizar las membranas moleculares del *Streptococcus mutans* y ocasiona erosión de la superficie de la bacteria, debido a que el HClO logra oxidar los grupos sulfhidrilo de las enzimas bacterianas (Kashi et al., 2025).

En cuanto, a la clorhexidina al 2% la eficacia fue menor que el HClO al 1,25% similar situación se presentó en el estudio de Koluman (2023), se demostró que el HClO es la sustancia antimicrobiana que se sintetiza a través de la acidificación del H_2O_2 , donde a mayor niveles de cloración se puede disminuir la actividad de la bacteria, en cambio la clorhexidina es frecuentemente utilizada en la práctica clínica, con una respuesta más lenta en la erradicación del microorganismo (Almhöjd et al., 2023).

Sin embargo, se evidenció que la actividad antimicrobiana en cepas de *Streptococcus mutans* del HClO al 0,25% y 0,75% mostraron igual efecto inhibitorio que la clorhexidina al 2%, sin diferencia significativa ($p < 0,05$). Sobre esto Millones-Gómez et al. (2023) menciona que la actividad inhibitoria del HClO depende de la concentración, por lo que puede existir la semejanza con la clorhexidina y combatir la adhesión de bacteria en alambres de ortodoncia, además eliminar con semejante eficiencia las gram positivas y gram negativas.

En vista de que las concentraciones del ácido hipocloroso de 0,25% y 0,75% presentan el mismo efecto inhibitorio en cepas de *Streptococcus mutans* que la clorhexidina al 2%, en la ortodoncia es recomendable utilizar bajos porcentajes del HClO, para disminuir la corrosión del alambre de acero o NiTi, según Kumrular et al. (2023) la aparatología de ortodoncia fabricadas de acero inoxidable y titanio, son propensas a la

corrosión por iones corrosivos como el Cl⁻, al encontrarse en un ambiente ácido, donde existe la variación del pH que incide negativamente en el material del arco de ortodoncia.

Conclusiones

En función de los resultados se estableció que la mayor adherencia de *Streptococcus mutans* se identificó en arcos de acero en contraste con NiTi, además con el ácido hipocloroso al 1,25% se logró la mayor actividad antimicrobiana sobre cepas de *Streptococcus mutans* en alambres de ortodoncia.

Con respecto al efecto del control positivo (clorhexidina al 2%) se determinó que existió diferencia significativa entre el ácido hipocloroso al 1,25% ($p < 0,05$), donde se demostró que la clorhexidina tiene el menor efecto inhibitorio sobre *Streptococcus mutans*.

En cuanto a la actividad antimicrobiana del HClO al 0,25% y 0,75% presentó igual efecto inhibitorio que la clorhexidina al 2% sobre cepas de *Streptococcus mutans* ($p < 0,05$), además es similar estadísticamente a la acción inhibitoria de la concentración de HClO del 0,75% y 0,25%, en vista de esta situación es recomendable menor porcentaje de esta sustancia química para evitar la corrosión de los arcos de ortodoncia de acero y NiTi.

Recomendaciones

Utilizar el ácido hipocloroso al 0,75% y 0,25% para disminuir la posibilidad de daño por corrosión de los arcos de ortodoncia de acero y NiTi, en vista de que posee una similar actividad antimicrobiana que la clorhexidina al 2%.

Realizar un estudio del ácido hipocloroso a las diferentes concentraciones (0,25%, 0,75% y 1,25%) sobre el efecto corrosivo de los arcos de ortodoncia (acero y NiTi) y brackets.

Efectuar una investigación enfocada en la acción antibacteriana del ácido hipocloroso (0,25%, 0,75% y 1,25%) contra bacterias Gram negativa relacionadas con

patologías periodontales (*Fusobacterium nucleatum*, *Actinobacillus* y *Porphyromonas gingivalis*) y Gram positiva como *Lactobacillus*, de esta forma se comprobaría el efecto sobre la desinfección de los alambres de ortodoncia frente a estos microorganismos.

En el caso de reutilizar el arco de ortodoncia, es necesario colocar en la solución de ácido hipocloroso por 30 segundos y proceder al enjuague con agua, para lograr una eficiente eliminación de los microorganismos.

Referencias

- Abutayyem, H., Abdullatif Alshehhi, M., Alameri, M., & Sohail Zafar, M. (2024).
Microbial adhesion on different types of orthodontic brackets and wires: An in vitro
study. *The Saudi Dental Journal*, 36(11), 1459-1465.
<https://doi.org/10.1016/j.sdentj.2024.09.004>
- Atlas, R. M. (2010). Handbook of microbiological media (4th ed. *CRC Press*.
- Aherne, O., Ortiz, R., Fazli, M. M., & Davies, J. R. (2022). Effects of stabilized
hypochlorous acid on oral biofilm bacteria. *BMC Oral Health*, 22(1), 415.
<https://doi.org/10.1186/s12903-022-02453-2>
- Al-Ali, D. A., & Groosh, D. A. (2022). The influence of fixed orthodontic retainer on oral
microbiota. *International Journal of Health Sciences*, 3603-3612.
<https://doi.org/10.53730/ijhs.v6nS1.5515>
- Al-lehaibi, W. kh, Al-makhzomi, K. A., Mohammed, H. S., Enezei, H. H., & Alam, M. K.
(2021). Physiological and Immunological Changes Associated with Oral
Microbiota When Using a Thermoplastic Retainer. *Molecules*, 26(7), Article 7.
<https://doi.org/10.3390/molecules26071948>
- Almhöjd, U. S., Lehrkinder, A., Roos-Jansåker, A.-M., & Lingström, P. (2023).
Antimicrobial efficacy of chlorine agents against selected oral pathogens. *Clinical
Oral Investigations*, 27(9), 5695-5707. <https://doi.org/10.1007/s00784-023-05190-0>
- Bozkurt, A. P., Ünlü, Ö., & Demirci, M. (2020). Comparison of microbial adhesion and
biofilm formation on orthodontic wax materials; an in vitro study. *Journal of
Dental Sciences*, 15(4), 493-499. <https://doi.org/10.1016/j.jds.2020.04.011>
- Forbes, B. A. ((2007)). Bailey & Scott's diagnostic microbiology (12th ed.). *Mosby
Elsevier*.

- Freitas, A. O. A., Marquezan, M., Nojima, M. da C. G., Alviano, D. S., & Maia, L. C. (2014). The influence of orthodontic fixed appliances on the oral microbiota: A systematic review. *Dental Press Journal of Orthodontics*, *19*(2), 46-55. <https://doi.org/10.1590/2176-9451.19.2.046-055.oar>
- Gessa-Sorroche, M., Relimpio-López, I., García-Delpech, S., & Benítez-del-Castillo, J. M. (2022). Ácido hipocloroso como antiséptico en la atención al paciente con sospecha de infección por COVID-19. *Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología*, *97*(2), 77-80. <https://doi.org/10.1016/j.ofal.2021.01.012>
- Gordon, G. A. (2001). Minimizing chlorate formation in drinking water when hypochlorite is the disinfectant. *American Water Works Association. ist*, *84*(1), 161-170. <https://doi.org/10.2319/012413-75.1>
- Kashi, M., Varseh, M., Hariri, Y., Chegini, Z., & Shariati, A. (2025). Natural compounds: New therapeutic approach for inhibition of *Streptococcus mutans* and dental caries. *Frontiers in Pharmacology*, *16*, 1548117. <https://doi.org/10.3389/fphar.2025.1548117>
- Kiatwarawut, K., Kuvatanasuchati, J., Thaweboon, B., & Sirisoontorn, I. (2022). Comparison of Various Antimicrobial Agents for Thermoplastic Polymeric Retainers. *Polymers*, *14*(18), 3753. <https://doi.org/10.3390/polym14183753>
- Koluman, A., Aktas, A., & Adiloglu, S. (2023). Antimicrobial activities of Ankaferd BloodStopper, hypochlorous acid, and chlorhexidine against specific organisms. *Turkish Journal of Medical Sciences*, *52*(1), 276-278. <https://doi.org/10.3906/sag-2107-24>
- Kumrular, B., Cicek, O., Dağ, İ. E., Avar, B., & Erener, H. (2023). Evaluation of the Corrosion Resistance of Different Types of Orthodontic Fixed Retention

- Appliances: A Preliminary Laboratory Study. *Journal of Functional Biomaterials*, 14(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/jfb14020081>
- Lafaurie, G. I., Calderón, J. L., Zaror, C., Millán, L. V., & Castillo, D. M. (2015). Ácido Hipocloroso: Una Nueva Alternativa como Agente Antimicrobiano y para la Proliferación Celular para Uso en Odontología. *International journal of odontostomatology*, 9(3), 475-481. <https://doi.org/10.4067/S0718-381X2015000300019>
- Lin, Y.-C., Tsai, C.-F., & Huang, H.-L. (2023). Effects of hypochlorous acid mouthwash on salivary bacteria including *Staphylococcus aureus* in patients with periodontal disease: A randomized controlled trial. *BMC Oral Health*, 23(1), 698. <https://doi.org/10.1186/s12903-023-03358-4>
- Lucchese, A., & Bondemark, L. (2021). The Influence of Orthodontic Treatment on Oral Microbiology. En *Biological Mechanisms of Tooth Movement* (pp. 139-158). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781119608912.ch10>
- Millones-Gómez, P. A., Novoa-Herrera, M., Maurtua-Torres, D. J., Bacilio-Amaranto, R. E., Requena-Mendizábal, M. F., Calla-Poma, R., Rosales-Cifuentes, T. V., Malpartida-Quispe, F. M., Minchón-Medina, C. A., Romero-Gamboa, J. C., Pinella-Vega, M., & Ojeda-Gómez, R. C. (2023). Antibacterial Effect of Hypochlorous Acid on Bacteria Associated with the Formation of Periodontal Biofilms: An in vitro Pilot Study. *Pesquisa Brasileira Em Odontopediatria e Clínica Integrada*, 23, e210078. <https://doi.org/10.1590/pboci.2023.074>
- Madigan, M. T. ((2015)). Brock biology of microorganisms. *Pearson*, (14th ed.).
- McDonnell, G. &. ((1999)). Antiseptics and disinfectants: Activity, action, and resistance. *Clinical Microbiology Reviews*,, 147–179.

- Nafarrate-Valdez, R. A., Martínez-Martínez, R. E., Zaragoza-Contreras, E. A., Áyala-Herrera, J. L., Domínguez-Pérez, R. A., Reyes-López, S. Y., Donohue-Cornejo, A., Cuevas-González, J. C., Loyola-Rodríguez, J. P., & Espinosa-Cristóbal, L. F. (2022). Anti-Adherence and Antimicrobial Activities of Silver Nanoparticles against Serotypes C and K of *Streptococcus mutans* on Orthodontic Appliances. *Medicina*, *58*(7), 877. <https://doi.org/10.3390/medicina58070877>
- Oliveira, D. C., Thomson, J. J., Alhabeil, J. A., Toma, J. M., Plecha, S. C., Pacheco, R. R., Cuevas-Suárez, C. E., Piva, E., & Lund, R. G. (2021). In vitro *Streptococcus mutans* adhesion and biofilm formation on different esthetic orthodontic archwires. *The Angle Orthodontist*, *91*(6), 786-793. <https://doi.org/10.2319/121220-998.1>
- Palone, M., Preite, C., & Lombardo, L. (2024). Microbiota changes in the periodontium in response to orthodontic forces. *Seminars in Orthodontics*, *30*(2), 135-140. <https://doi.org/10.1053/j.sodo.2023.10.001>
- Prevention, C. f. (2008). Guidelines for disinfection and sterilization in healthcare facilities. *Centers for Disease Control and Prevention*.
- Shpack, N., Greenstein, R. B.-N., Gazit, D., Sarig, R., & Vardimon, A. D. (2014). Efficacy of three hygienic protocols in reducing biofilm adherence to removable thermoplastic appliance. *The Angle Orthodont* Tsai, C.-F., Chung, J.-J., Ding, S.-J., & Chen, C.-C. (2024). In vitro cytotoxicity and antibacterial activity of hypochlorous acid antimicrobial agent. *Journal of Dental Sciences*, *19*(1), 345-356. <https://doi.org/10.1016/j.jds.2023.07.007>
- Türköz, C., Canigür Bavbek, N., Kale Varlik, S., & Akça, G. (2012). Influence of thermoplastic retainers on *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* adhesion. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics: Official Publication of the American Association of Orthodontists, Its Constituent Societies*,

and the American Board of Orthodontics, 141(5), 598-603.

<https://doi.org/10.1016/j.ajodo.2011.11.021>

White, G. C. ((2010)). *White's handbook of chlorination and alternative disinfectants (5th ed.)*. *John Wiley & Sons*.

Anexos

Tabla De Resultados

Grupo Niti 10⁻⁵

CAJA	DILUCIÓN	NÚMERO DE COLONIAS
1	10 ⁻⁵	338
2	10 ⁻⁵	435
3	10 ⁻⁵	205
4	10 ⁻⁵	407
5	10 ⁻⁵	354
6	10 ⁻⁵	1321
7	10 ⁻⁵	73
8	10 ⁻⁵	457
9	10 ⁻⁵	104

Promedio número de colonias en la dilución 10⁻⁵ = 410.44

UFC = # colonias x Factor de dilución

MI

Vs

$$= \frac{\# c \times 10^5}{0,1ml}$$

$$= \frac{410.44 \times 10^5}{0,1ml} = 4.1044 \times 10^9$$

Grupo Niti 10⁻⁶

CAJA	DILUCIÓN	NÚMERO DE COLONIAS
1	10 ⁻⁶	42
2	10 ⁻⁶	38
3	10 ⁻⁶	42
4	10 ⁻⁶	38
5	10 ⁻⁶	43
6	10 ⁻⁶	12
7	10 ⁻⁶	84
8	10 ⁻⁶	45
9	10 ⁻⁶	38
10	10 ⁻⁶	2
11	10 ⁻⁶	49

Promedio número de colonias en la dilución $10^{-6} = 39.36$

UFC = # colonias x Factor de dilución

MI

Vs

$$= \frac{\# c \times 10^6}{0,1\text{ml}}$$

0,1ml

$$= \frac{39.36 \times 10^6}{0,1\text{ml}} = 3.936 \times 10^9$$

0,1ml

Grupo Acero 10^{-5}

CAJA	DILUCIÓN	NÚMERO DE COLONIAS
1	10^{-5}	830
2	10^{-5}	596
3	10^{-5}	476
4	10^{-5}	500
5	10^{-5}	556
6	10^{-5}	623
7	10^{-5}	116
8	10^{-5}	729

Promedio número de colonias en la dilución $10^{-5} = 553.25$

UFC = # colonias x Factor de dilución

MI

Vs

$$= \frac{\# c \times 10^5}{0,1\text{ml}}$$

0,1ml

$$= \frac{553.25 \times 10^5}{0,1\text{ml}} = 5.5322 \times 10^9$$

0,1ml

Grupo Acero 10^{-6}

CAJA	DILUCIÓN	NÚMERO DE COLONIAS
1	10^{-6}	146
2	10^{-6}	98
3	10^{-6}	118
4	10^{-6}	146
5	10^{-6}	84
6	10^{-6}	81

7	10^{-6}	10
8	10^{-6}	152
9	10^{-6}	199
10	10^{-6}	30

Promedio número de colonias en la dilución $10^{-6} = 106.4$

UFC = # colonias x Factor de dilución

Ml

Vs

$$= \frac{\# c \times 10^6}{0,1\text{ml}}$$

0,1ml

$$= \frac{106.4 \times 10^6}{0,1\text{ml}} = 1,064 \times 10^{10}$$

0,1ml