

Evaluación de la actividad antimicrobiana de enjuagues bucales comerciales sobre microorganismos de importancia oral en un modelo de biopelícula en hidroxiapatita

**Estudiante**

Sergio Andres Forero Olarte

**Director**

Fredy Omar Gamboa Jaimes, Bacteriólogo M.Sc.; Ph. D.

Centro de investigación odontológica.

Pontificia Universidad Javeriana

Bogotá-Colombia

**Codirector**

Román Yesid Ramírez Rueda, Bacteriólogo M.Sc.; Ph. D.

Bogotá-Colombia

**TRABAJO DE GRADO**

Pontificia Universidad Javeriana

Facultad de Ciencias

Departamento de Microbiología

Programa de Microbiología Industrial

Bogotá D.C. junio 8 de 2022

**Evaluación de la actividad antimicrobiana de enjuagues bucales comerciales sobre microorganismos de importancia oral en un modelo de biopelícula en hidroxiapatita**

**Sergio Andres Forero Olarte**



---

Fredy Omar Gamboa Jaimes, MSc, PhD

Director



---

Roman Yesid Ramirez Rueda, PhD

Codirector

---

Mayra Alexandra Téllez Corral, MSc

Jurado

## **NOTA DE ADVERTENCIA**

“La universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porqué las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”

Artículo 23 de la Resolución No 13 de Julio de 1996

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a todas las personas que me han acompañado en mi proceso educativo en la universidad, a mis padres que siempre me han apoyado y me han enseñado que siempre hay una solución para todo además de valorar lo que se tiene.

Especialmente agradezco a mi tutor Fredy Gamboa y a mi cotutor Román Ramírez quienes me ayudaron mucho en este trabajo de grado, gracias por la paciencia, tiempo y dedicación que me aportaron.

## **TABLA DE CONTENIDOS**

### **1 INTRODUCCIÓN**

### **2 OBJETIVOS**

2.1 Objetivo general

2.2 Objetivos específicos

### **3 MARCO TEORICO**

3.1 Enfermedades orales

3.2 Factores de virulencia de *Enterococcus faecalis*

3.3 Factores de virulencia de *Streptococcus mutans*

3.4 Factores de virulencia de *Candida albicans*

3.5 Importancia de *Escherichia coli* en boca

3.2 Importancia de las biopelículas

3.3 Enjuagues bucales

3.4 Hidroxiapatita

### **4 METODOLOGIA**

4.1 Selección y reactivación de las cepas microbianas

4.2 Preparación de los inóculos

4.3 Ensayo de la formación de biopelícula y aplicación de los tratamientos con los enjuagues bucales

4.4 Evaluación de la inhibición

### **5 RESULTADOS**

### **6 DISCUSIÓN**

### **7 CONCLUSIONES**

### **8 RECOMENDACIONES**

### **9 REFERENCIAS**

## 1. Introducción

Las enfermedades orales son un problema de salud pública a nivel global con una alta prevalencia e incidencia, que conllevan a una importante participación de los profesionales de la salud en esta área, claramente con el objetivo de que las personas no sufran en gran medida los efectos de estas enfermedades. Entre las consecuencias que traen estas enfermedades está el dolor, la inflamación, las desfiguraciones y en algunos casos pueden provocar la muerte por infecciones graves que desembocan en sepsis. Según un estudio realizado por Global Health Metrics, este tipo de enfermedades para 2017 afectaron alrededor de 3500 millones de personas [1].

Una de estas enfermedades es la caries dental, la cual es producida por una infección microbiana donde se produce ácido a partir del metabolismo y causa desmineralización de la estructura del diente, el principal causante de esta es *Streptococcus mutans*, pero pueden estar implicados otros microorganismos. Acerca de la epidemiología de esta enfermedad se encontró que tiene una prevalencia alta globalmente la cual varía entre 49 y 83% [2]. Otra enfermedad oral es la infección endodóntica, deriva entre otras complicaciones en inflamación, dolor y necrosis en los tejidos. Esta enfermedad ocurre cuando el conducto radicular, el cual carece de una microbiota comensal, se ve infectado por un patógeno [3]. Entre los patógenos implicados en este tipo de infección esta *Enterococcus faecalis* el cual puede sobrevivir en condiciones extremas y puede causar periodontitis crónica [4]. Otra enfermedad con una prevalencia significativa es la estomatitis o candidiasis oral, que se caracteriza por la aparición de úlceras o llagas bucales que producen dolor en quien las porta. Esta patología es causada frecuentemente por el hongo levaduriforme *Candida albicans* [5]. Este hongo es de gran importancia en el ámbito oral, ya que la enfermedad que produce afecta comúnmente a personas inmunocomprometidas, como por ejemplo infectadas con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), debido a que es un patógeno oportunista [6]. Otro de los escenarios donde está implicado *Candida albicans* es la interacción con otros microorganismos, donde ambas partes se ven beneficiadas para su sobrevivencia y patogenicidad [7].

Ante estos hechos es necesario evaluar estrategias de tratamiento y prevención para mitigar la prevalencia e incidencia de las enfermedades orales. Por otro lado, es bien sabido que las consultas odontológicas pueden llegar a ser inaccesibles desde el punto de vista económico para una gran parte de la población, sobre todo en el caso de recurrir a un servicio privado. Acerca del sector público el problema radica en la menor eficacia en la atención comparándola con el primero, en gran parte debido al difícil acceso al servicio causado por la alta demanda y poca oferta disponible, lo cual es común en nuestro país [8,9]. Una estrategia para prevenir la adquisición de enfermedades infecciosas oral causada por bacterias u hongos, es el uso de enjuagues bucales o antisépticos orales, los cuales no solo contribuyen a tener un aliento fresco,

tienen acceso a zonas donde el cepillo dental tiene dificultad, sino que además evitan o reducen la formación de la placa microbiana [10]. Los enjuagues bucales se pueden conseguir fácilmente en establecimientos comerciales y su costo en Colombia está en un promedio de \$ 13000 COP en presentación de 350 ml, lo que lo convierte en un método de prevención accesible para la comunidad. Un estudio realizado en la Universidad de Aberdeen, en el Reino unido, determino que el uso de enjuagues bucales está asociado a factores socioeconómicos, además de que el 38,1% de las personas participantes en el estudio no han hecho uso de este y alrededor del 25% lo usa diariamente [11]. Estos datos nos indican que aún hay un porcentaje considerable en la población que no usa este método de prevención, para cambiar dicha tendencia hay que buscar estrategias de educación donde se fomente su uso.

## **2. Objetivos**

### **2.1.Objetivo general**

Evaluar la actividad antimicrobiana de cuatro enjuagues bucales comerciales sobre *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* y *Candida albicans* en modelo de biopelículas *in vitro* sobre hidroxiapatita.

### **2.2.Objetivos específicos**

- Evaluar la formación de biopelícula por *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* y *Candida albicans* en discos de hidroxiapatita.
- Determinar la reducción microbiana producida por los enjuagues bucales Colgate® Plax soft mint, Oral-B® Complete; Periogard®; y Listerine® sobre los 4 microorganismos montados en modelo de biopelícula sobre hidroxiapatita.

## **3. Marco teórico**

### **3.1.Enfermedades orales**

En el medio oral es de suma importancia hablar de las infecciones endodónticas, ya que corresponden a un problema de salud pública y son causadas comúnmente por la infección del conducto radicular, que carece de microbiota, está situado en el centro del diente y tiene la función de comunicar la cavidad pulpar con los vasos sanguíneos de la mandíbula [12,13]. Este tipo de infecciones pueden causar dolor, pulpitis, necrosis pulpar y caída del diente. Por otro lado, es necesario decir que existen varios tipos de infección endodóntica: 1. infección primaria del conducto radicular, ocurre cuando el tejido pulpar es infectado; 2. infección secundaria del conducto radicular, esta es causada por microorganismos que infectaron el conducto durante un tratamiento para una infección primaria; y 3. infección persistente del conducto radicular, que es cuando el microorganismo resiste al tratamiento. En este

último tipo de infección puede estar implicado *E. faecalis*, ya que es una de las especies más comúnmente encontradas en pacientes con este tipo de complicaciones, razones por las cuales es de suma importancia prevenir la aparición de este microorganismo en el conducto radicular [14].

Los enterococcus según su morfología, son bacterias pertenecientes al grupo de los cocos Gram positivos, es un microorganismo comensal, ya que hace parte de la microbiota normal humanae. Específicamente *E. faecalis* habita en humanos en la cavidad oral, el tracto gastrointestinal y en la mucosa vaginal [15]. Este microorganismo es anaerobio facultativo, lo que indica que puede sobrevivir en condiciones de presencia o ausencia de oxígeno. También se caracteriza por ser resistente a condiciones extremas en el ambiente, como altos niveles de alcalinidad, fuentes nutricionales pobres y su acoplamiento a la dentina del diente ayuda a su supervivencia en el conducto radicular, lo que lo convierte en un potencial patógeno de preocupación. Por otro lado, es resistente a varios antibióticos, por ejemplo, la vancomicina, lo que dificulta su tratamiento [4,16].

Otra enfermedad oral importante es la estomatitis o candidiasis oral, infección fúngica más común en esta área. Esta enfermedad se puede presentar en básicamente de dos modos, la primera como lesiones blancas, conocida como candidiasis pseudomembranosa, que implica la presencia de placa blanca en lengua, en mucosa bucal, en paladar y en faringe oral. La segunda, candidiasis hiperplásica en donde se puede observar la presencia de placa en la mucosa bucal y también en el labio; esta forma en la que se expresa la enfermedad produce sensación de ardor, cambios en el sentido del gusto, sabor agrio y sangrado. Por otra parte, también se puede presentar en forma de eritemas, que se presentan mayormente en pacientes con VIH, y su principal característica es la aparición de lesiones rojas, que producen en quien las tiene una sensación de ardor y dolor [17]. *C. albicans*, el cual es el microorganismo que causa la enfermedad, es un patógeno oportunista que puede afectar a personas inmunocomprometidas, como por ejemplo las ya previamente mencionadas infectadas por VIH; esta situación se ha convertido en una gran preocupación que ha llevado al aumento de la incidencia y se ha demostrado que la severidad de la enfermedad aumenta [18]. Otro escenario en donde la infección por *C. albicans* presenta un aumento del riesgo es cuando se asocia con otros microorganismos. Se ha demostrado que microorganismos como *Streptococcus mutans*, asociado normalmente a caries dental, puede favorecer la adherencia de *C. albicans* a las superficies dentales [19].

La caries dental es una enfermedad con bastante incidencia, es muy común en la población, ya que aproximadamente el 36% de las personas en el mundo la tienen [20]. Esta enfermedad es causada por microorganismos los cuales, usualmente, producen ácido gracias al metabolismo de los azúcares y puede causar la



desmineralización de los dientes y destrucción de los tejidos. La caries se compone por cuatro capas, tres de estas son visibles pero la que nos compete en este estudio es la capa exterior en la cual está localizada la biopelícula microbiana, esta puede ser visualizada en el diente como un tejido suave mineralizado [21].

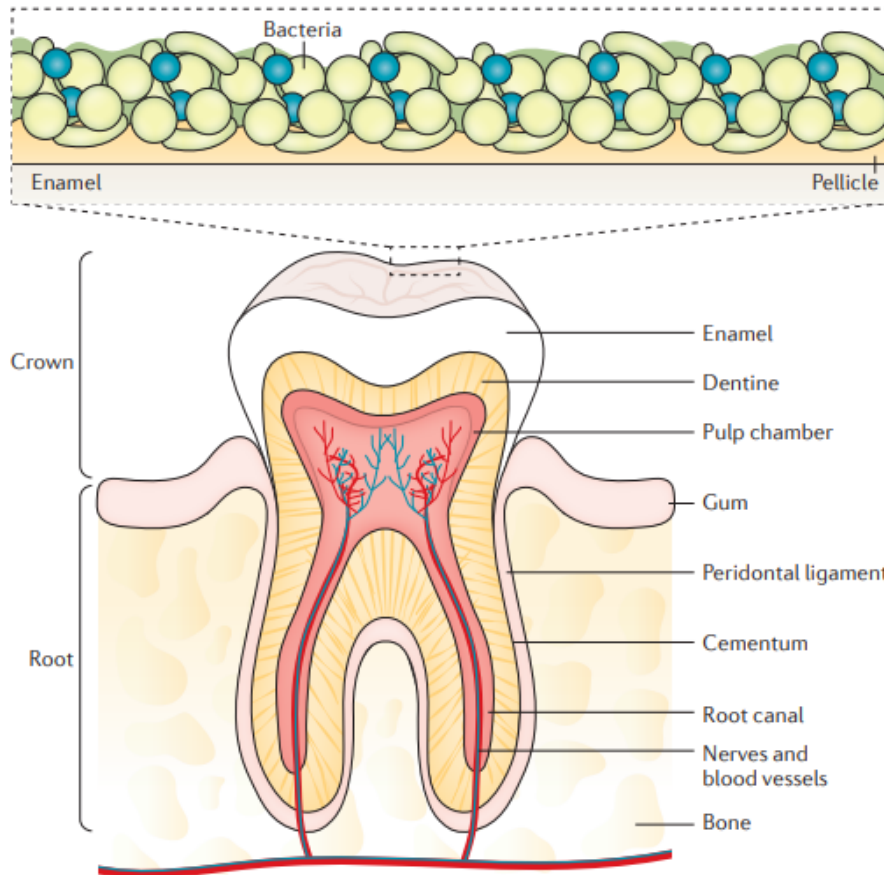


Figura 1. Anatomía dental y desarrollo de la biopelícula bacteriana. (1)

### 3.2. Factores de virulencia de *Enterococcus faecalis*

*Enterococcus faecalis* es un microorganismo de suma importancia en infecciones de cavidad oral, por lo tanto, es de gran relevancia estudiar sus factores de virulencia, es decir, esas estructuras, moléculas o sistemas de regulación que favorecen a este agente patógeno en sus funciones, estas pueden estar asociadas a su resistencia, adherencia, crecimiento y efectividad [13,22]. Específicamente hablando de *E. faecalis* se ha encontrado que estos están ligados a la adherencia sobre el tejido huésped, invasión, formación de abscesos, modulaciones en la respuesta inmunitaria del huésped y en la secreción de productos que potencian la formación de biopelículas. Uno de los factores de virulencia más relevantes en infecciones orales es la proteína de superficie de *Enterococcus* o *esp* por sus siglas en inglés, esta es importante debido a que está implicada en la colonización y persistencia en el huésped, se ha encontrado que

la presencia de esta proteína fomenta la producción de biopelícula, pero esta solo se expresa a partir del gen *esp*, el cual no está en todas las cepas de *E. faecalis*. Otro factor de virulencia de este microorganismo es la gelatinasa, la cual codifica a partir del gen *GelE* e inhibe algunos sustratos que produce el huésped, como el colágeno y el fibrinógeno, además está demostrado que la actividad de esta enzima es necesaria para la producción de la biopelícula por parte del patógeno [23]. La proteína de unión a colágeno (Ace) es de importancia para *E. faecalis* ya gracias a su matriz adhesiva se une a las proteínas extracelulares como el colágeno de tipo I y IV, la laminina, además de la dentina, el cual es uno de los cuatro componentes principales del diente y se encuentra inmediatamente debajo del esmalte [24]. La SprE o serina proteasa es una endopeptidasa de *E. faecalis* de gran relevancia, esta junto con la gelatinasa tienen un rol fundamental en el sistema de quorum sensing lo que puede contribuir a la virulencia en la periodontitis. Una de las principales características de esta proteasa es su resistencia a un amplio rango de niveles de pH, por lo que puede mantenerse activa en el canal radicular, además que en si esta favorece la adherencia a este conducto [13]. La sustancia de agregación (Asa) es una feromona que favorece a *E. faecalis* en la adherencia e invasión ante las células en boca lo que promueve la formación de biopelícula. De este tipo de sustancias *E. faecalis* produce tres tipos: la Asa1, Asc10 y Asp1, pero la primera es la que está más asociada en la agregación de *E. faecalis* en cavidad oral. Finalmente, el antígeno de endocarditis (EfaA) promueve la adhesión de *E. faecalis* a las células de corazón en endocarditis, ya en boca produce condiciones acidas que pueden resultar en la pérdida de los dientes [25].

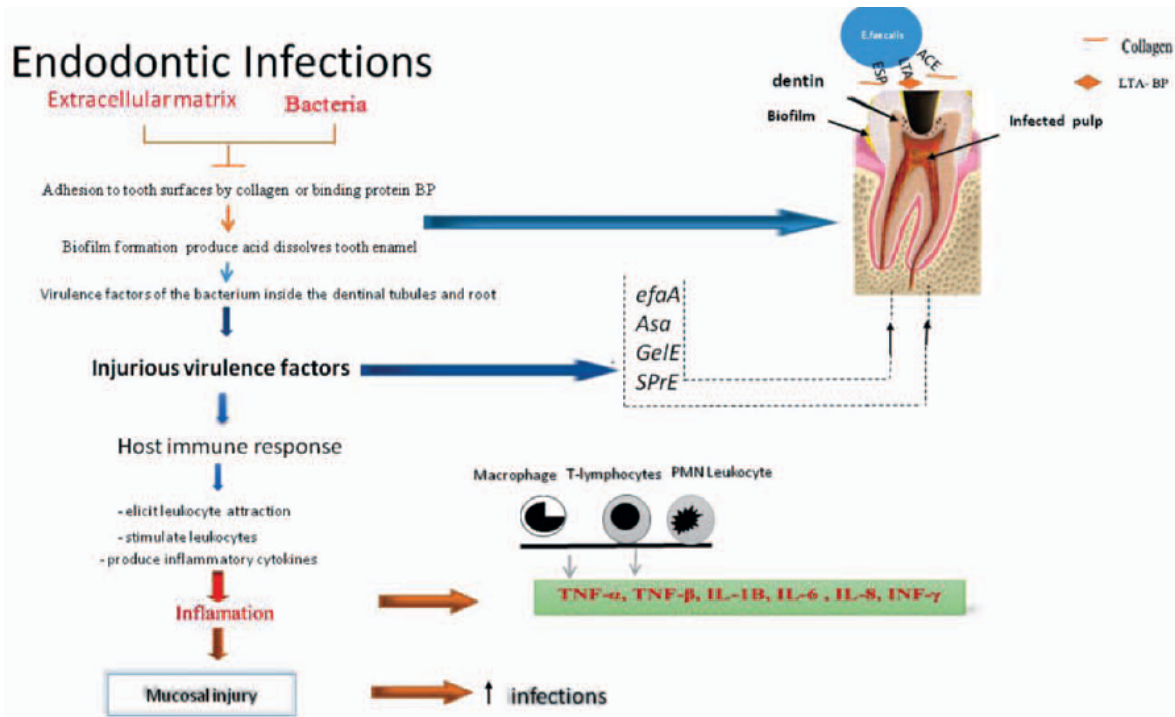


Figura 2. Infecciones endodónticas relacionadas con los factores de virulencia de *Enterococcus faecalis*. (2)

### 3.3. Resistencia a los antibióticos por parte de *Enterococcus faecalis*

*Enterococcus faecalis* es un microorganismo de importancia clínica, esto está directamente relacionado con su resistencia a los tratamientos antibióticos, lo cual aumenta el peligro ante una infección. Se ha encontrado que dicha resistencia por parte de *E. faecalis* ha incrementado ante agentes antimicrobianos como la penicilina, ampicilina y es conocida su alta resistencia a las cefalosporinas y a los glucopéptidos como la vancomicina; en el caso de esta última su función es inhibir el crecimiento bacteriano obstaculizando la biosíntesis de peptidoglucano, usualmente forma complejos con una transpeptidasa, la cual tiene como función de realizar enlaces en la formación de cadenas de peptidoglucano, lo que hace que el microorganismo produzca precursores alterados que previenen la inhibición de la biosíntesis de la pared celular, lo cual se ha descrito que está mediado por nueve diferentes grupos de genes [26].

### 3.4. Factores de virulencia de *Streptococcus mutans*

*Streptococcus mutans* es un microorganismo bien conocido por su cariogenicidad, esto debido a que este posee ciertos factores de virulencia que promueven dicha enfermedad, entre estos está la acidogenicidad, la aciduricidad y la adherencia. La acidogenicidad se fundamenta en la expresión de genes relacionada con la absorción y metabolismo de carbohidratos que ayuda al

microorganismo a adaptarse de manera exitosa a la cavidad oral, además de que potencia su forma patogénica; en esta se fermentan los azúcares y se lleva a cabo la producción de ácidos orgánicos, en especial el ácido láctico, el cual es el producto principal y es el que lidera una posible aparición de la caries dental. Por otra parte, endógenamente hay unas moléculas llamadas polisacáridos intracelulares, las cuales *S. mutans* puede llegar a usar en caso de la ausencia de azúcares fermentables para llevar a cabo la acidificación del medio [27].

La aciduricidad está asociada a la capacidad que tiene un microorganismo para producir ácido y sobrevivir a valores de pH bajos, por ejemplo, *S. mutans* disminuye el pH hasta 4 en una biopelícula dental y es capaz de realizar procesos metabólicos, como la glucólisis, en dichas condiciones; la resistencia a las condiciones ácidas ha sido atribuida a presencia del translocador de protones  $F_0-F_1$ -ATPasa, este expulsa protones de la célula para mantener un pH citoplasmático alcalino con el fin de proteger a las enzimas glucolíticas que son sensibles a condiciones ácidas [28]. Finalmente, la adhesión es de suma importancia para *S. mutans* para su supervivencia en la superficie del diente y puede estar mediada por dos mecanismos diferentes, los dependientes de sacarosa y los independientes a sacarosa; este último usa una proteína de superficie llamada P1, la cual es una adhesina que promueve la adhesión a la hidroxiapatita del esmalte dental. En el caso del mecanismo dependiente de sacarosa, este ocurre como respuesta a la colonización en la superficie dental, en esta actúan enzimas llamadas GTFs las cuales forman glucanos, los cuales son polisacáridos extracelulares que favorecen la agregación celular de los microorganismos [27].

### 3.5. Factores de virulencia de *Candida albicans*

*Candida albicans* es un microorganismo que comúnmente está presente en la microbiota humana, pero puede llegar a producir enfermedad ya que es un patógeno oportunista, esto lo logra gracias a sus factores de virulencia, uno de estos es el polimorfismo que tiene este hongo levaduriforme, el cual le permite pasar a una forma hifal lo que lo hace más invasivo a la hora de entrar a las células del hospedero y se puede decir que cuando sucede esto *C. albicans* hace la transición a su forma patogénica. Para establecer una infección sistémica *C. albicans* produce una toxina llamada candidalísina, la cual es una exotoxina formada en las hifas y es crucial para el daño de las células, esto dañando la membrana epitelial. Los otros factores de virulencia importantes para este microorganismo son los que están asociados a la invasión y adhesión de este en las células hospederas. *C. albicans* tiene la capacidad de formar biopelículas en superficies bióticas y abióticas, esto por medio de la producción de una matriz de exopolisacáridos la cual en este caso está compuesta por  $\beta$ -1,3-glucanos [29].

### **3.6. Importancia de *Escherichia coli* en boca**

*Escherichia coli* es una bacteria que pertenece a la familia Enterobacteriaceae, es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, posee flagelos peritricos y es un microorganismo que está presente en el microbiota gastrointestinal humana. Las comunidades pertenecientes a la familia de las enterobacterias en la grieta gingival pueden crecer como biopelículas y están implicadas en una periodontitis crónica, esto a causa de un tratamiento periodontal fallida; dicha enfermedad oral es una de las principales causas de la pérdida de los dientes en adultos y comúnmente se manifiesta con un dolor intenso en la cavidad oral. La pérdida dental puede ser llevada a cabo en ausencia de inflamación y estudios han descrito que esto es causado por la tolerancia a las endotoxinas [30].

### **3.7. Importancia de las biopelículas**

Todos los microorganismos mencionados previamente tienen la capacidad de formar biopelículas, que son un conglomerado de células que crecen sobre una matriz extracelular que ellas mismas producen, más específicamente las células denominadas sésiles. Dicha matriz está compuesta principalmente de proteínas, ácido desoxirribonucleico extracelular y exopolisacáridos; su principal función es servir como medio de protección y supervivencia a los microorganismos ante condiciones adversas o extremas para estos. También sirven como barrera para protegerse de agentes fagocíticos y contra sustancias antimicrobianas [31].

### **3.4. Enjuagues bucales**

Los enjuagues bucales o antisépticos orales son una herramienta para mantener la higiene y el cuidado oral. Al venir en presentación líquida tienen la ventaja de acceder a lugares que son de difícil acceso para algunos elementos de aseo oral como lo son el cepillo y la seda dental, su principal función es prevenir la placa microbiana y la formación de caries. De esta manera se previenen las enfermedades infecciosas orales evitando la propagación de los microorganismos patógenos [32]. Los principios activos de los enjuagues bucales comúnmente son: Fluoruro, clorhexidina, triclosán, cetilpiridinio, peróxido de hidrógeno, yodopovidona, hexitidina, etanol y algunas sustancias de origen natural [33].

Para este estudio fueron utilizados cuatro diferentes enjuagues que se pueden encontrar comercialmente en el mercado, estos son Colgate® Plax soft mint, Oral-B® Complete; Periogard®; y Listerine®. Colgate® Plax soft mint es un enjuague bucal producido por la casa estadounidense Colgate el cual posee de los siguientes componentes: Cloruro de Cetilpiridinio 0.075%, Fluoruro de Sodio 0.05% (225 ppm fluoruro), Agua, Glicerina, Sorbitol, Propilenglicol, Polaxamer 407, Sorbato de Potasio, Fluoruro de Sodio, Mentol, Sacarina sódica, CI 17200, CI

42051 [34]. El enjuague bucal Listerine® está compuesto por timol, eucaliptol, mentol, salicilato de metilo, agua, alcohol, sorbitol, sucralosa, benzoato de sodio, ácido benzoico, sacarina de sodio y polaxamer 407 [35]. Periogard es un enjuague bucal de la casa Colgate el cual está compuesto por 0,12% de gluconato de clorhexidina, agua, propilenglicol, glicerina, sorbitol, aceite de ricino hidrogenado polioxil 40, cloruro de cetilpiridino y colorante FD&C azul no. 1 [36]. Finalmente, el ultimo enjuague cual evaluado fue el Oral-B® Complete que contiene Alcohol, glicerina, polisorbato 80, sacarina de sodio, benzoato de sodio, cloruro de cetilpiridinio, agua, acido benzoico y CI 42090 [37]

### **3.5. Hidroxiapatita**

La hidroxiapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) es un biomaterial ampliamente usado en la reparación y regeneración de huesos además de ser usado para implantes dentales, esto debido a que los huesos están compuestos de este material. Este fosfato de calcio puede ser extraído de medios naturales como lo son la cascara de huevo, huesos de mamíferos, escamas de pescado, plantas y algas [38].

## **4. Metodología**

### **4.1. Selección y reactivación de las cepas microbianas**

El trabajo de grado se realizó independientemente para cada microorganismo, esto utilizando cuatro cepas, tres correspondientes a bacterias y una a un hongo levaduriforme, provenientes de la colección ATCC y mantenidas en el Laboratorio de Microbiología del Centro de Investigaciones Odontológicas de la Pontificia Universidad Javeriana. Las cepas seleccionadas tipo ATCC fueron: *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Candida albicans* ATCC 14053. Para la reactivación de las cepas (preservadas en congelación a  $-70^\circ\text{C}$  con glicerol al 50%), se dejaron descongelando cada vial a temperatura ambiente, posteriormente con un asa curva previamente esterilizada, se tomó una muestra y se sembró por la técnica de aislamiento en cajas de agar Mueller Hinton. Finalmente, las cajas de agar Mueller Hinton sembradas, se llevaron a incubar a  $37^\circ\text{C}$  durante 48 horas y al concluir dicho periodo de tiempo se realizó la prueba de pureza mediante coloración de Gram.

### **4.2. Preparación de los inóculos**

A partir de las siembras obtenidas en el punto 4.1, se prepararon las suspensiones microbianas en solución salina estéril al 0,85% p/v, estas se homogenizaron haciendo uso de vortex y se ajustaron a 0,5 en la escala de McFarland ( $1,5 \times 10^8$  células/mL) realizando mediciones espectrofotométricas a 625 nm.

#### **4.3. Ensayo de la formación de biopelícula y aplicación de los tratamientos con los enjuagues bucales**

Inicialmente los discos que fueron denominados control de crecimiento (CC), control de inhibición con hipoclorito de Sodio 2,5% (CI) y tratamientos (Col: Colgate® Plax soft mint; OB: Oral-B® Complete; Pe: Periogard®; y Lis: Listerine®), estos fueron dispuestos en una placa de 96 pozos, en la misma placa los discos en los pozos se sumergieron en una solución conformada por 100 uL de caldo nutritivo, 100 uL de saliva comercial y 20 uL de solución microbiana de 0,5 McFarland de cada uno de los 4 microorganismos. Después de una incubación de 24 horas a 37°C se lavaron los discos 3 veces con solución salina fisiológica estéril (SSFE). Los tratamientos se dividen en dos: el primero se denominó directo el cual corresponde a la exposición de los discos con los 4 enjuagues durante 5 minutos y el segundo se denominó indirecto que corresponde a la exposición de los discos con los 4 enjuagues durante 5 min con posterior exposición a saliva durante 55 min. Se denominaron los tratamientos de dicha forma debido a que el primero es un tiempo estimado de exposición en que los usuarios de enjuagues bucales podrían tener el producto y el segundo es por la acción residual que podría llegar a tener este en boca. Una vez concluidos los tiempos respectivos, los discos se lavarán con SSFE, se pasarán a un tubo Eppendorf con 1 mL de SSFE, y serán llevados a vórtex a 3200 rpm por 5 minutos para desprender la biopelícula y hacer el recuento. Con los discos CI se hará el mismo procedimiento y con los de CC en el caso del directo se incubará con SSFE por 5 minutos y en el caso del indirecto se hará lo mismo, pero por 55 minutos.

#### **4.4. Evaluación de la inhibición**

Se prepararon diluciones a partir de la solución madre hasta llegar a  $10^{-3}$ , se sembraron en placa de agar BHI por duplicado y fueron incubadas a 37°C por 24 horas. Finalmente se realizaron recuentos en placa y se calculó el porcentaje de inhibición para determinar el número de unidades formadoras de colonia y el porcentaje en que fue inhibido el crecimiento tomando como base el control, dichos datos serán calculados con la siguientes formulas:

$$\frac{UFC}{mL} = (\text{Numero de colonias}) * \frac{1}{\text{dilución}} * \frac{1}{\text{volumen inoculado}}$$

Figura 1. Ecuación de unidades formadoras de colonia (UFC) por mililitro

$$\%inhibición = \frac{(\text{Recuento inicial} - \text{Recuento final})}{\text{Recuento inicial}} \cdot 100$$

Figura 2. Ecuación del porcentaje de inhibición

## 5. Resultados

Como se observa en la Tabla 1, está el promedio de los valores hallados en los recuentos en placa, ya que se realizaron siembras por triplicado, de los ensayos con cada uno de los tratamientos (enjuagues bucales), además del control de crecimiento y el control de inhibición. Se obtuvo que el menor crecimiento bacteriano se presentó con Oral-B® Complete, donde crecieron 69 UFC/mL. Con el resto de los tratamientos se puede observar una tendencia del crecimiento la cual está entre el rango de 200-300 UFC/mL, esto hablando en un tiempo de acción de 5 minutos. Acerca del ensayo de actividad residual (55 minutos) se pudo determinar que el porcentaje de inhibición disminuye sustancialmente, pero no varía en gran medida comparándolo con los primeros datos.

Tabla 1. Recuentos en UFC/mL para *Streptococcus mutans* con cada uno de los tratamientos evaluados y su porcentaje de inhibición

Tratamientos	Recuentos UFC/mL		%Inhibición	
	5 min	55 min	5 min	55 min
Control de crecimiento	1,2x10 <sup>4</sup>		0	0
Colgate® Plax soft mint	203	567	98,3	95,27
Listerine®	222	470	98,15	96,08
Periogard®	273	517	97,72	95,69
Oral-B® Complete	69	250	99,4	97,92
Control de inhibición	0	0	100	100



%Inhibición

Figura 3. Porcentaje de inhibición para *Streptococcus mutans* con los cuatro tratamientos a los 5 minutos de acción

%Inhibición

Figura 4. Porcentaje de inhibición para *Streptococcus mutans* con los cuatro tratamientos a los 55 minutos de acción

Como se observa en la Tabla 2, está el promedio de los valores hallados en los recuentos en placa, ya que se realizaron siembras por triplicado, de los ensayos con cada uno de los tratamientos (enjuagues bucales), además del control de crecimiento y el control de inhibición. En la medición del efecto antimicrobiano contra *C. albicans* a los 5 minutos se encontró que el enjuague que más eficientemente actuó fue el Colgate® Plax soft mint, esto debido a que crecieron 253 UFC/mL, lo que representa un 4% de la población presente en el control de crecimiento. Acerca del ensayo de actividad residual (55 minutos) se puede observar un incremento en la actividad inhibitoria del Listerine® y del Periogard®.

Tabla 2. Recuentos en UFC/mL para *Candida albicans* con cada uno de los tratamientos evaluados y su porcentaje de inhibición

Tratamientos	Recuentos UFC/mL		%Inhibición	
	5 min	55 min	5 min	55 min
Control de crecimiento	6240		0	0

<b>Colgate® Plax soft mint</b>	253	370	95,94	94,07
<b>Listerine®</b>	3880	560	37,82	91,02
<b>Periogard®</b>	3100	650	50,32	89,58
<b>Oral-B® Complete</b>	347	640	94,44	89,74
<b>Control de inhibición</b>	0	0	100	100

%Inhibición

Figura 5. Porcentaje de inhibición para *Candida albicans* con los cuatro tratamientos a los 5 minutos de acción

%Inhibición

Figura 6. Porcentaje de inhibición para *Candida albicans* con los cuatro tratamientos a los 55 minutos de acción

Como se observa en la Tabla 3, está el promedio de los valores hallados en los recuentos en placa, ya que se realizaron siembras por triplicado, de los ensayos con cada uno de los tratamientos (enjuagues bucales), además del control de crecimiento y el control de inhibición. A los 5 minutos de acción del tratamiento se pudo observar una inhibición completa de *E. faecalis* haciendo uso de Colgate® Plax soft mint y de Oral-B® Complete, lo mismo sucedió a los 55 minutos.

Tabla 3. Recuentos en UFC/mL para *Enterococcus faecalis* con cada uno de los tratamientos evaluados y su porcentaje de inhibición

Tratamientos	Recuentos UFC/mL		%Inhibición	
	5 min	55 min	5 min	55 min
Control de crecimiento	5,7x10 <sup>4</sup>		0	0
Colgate® Plax soft mint	0	0	100	100
Listerine®	256	0	99,55	100
Periogard®	3830	0	93,28	100

<b>Oral-B® Complete</b>	0	0	100	100
<b>Control de inhibición</b>	0	0	100	100

%Inhibición

Figura 7. Porcentaje de inhibición para *Enterococcus faecalis* con los cuatro tratamientos a los 5 minutos de acción

%Inhibición

Figura 8. Porcentaje de inhibición para *Enterococcus faecalis* con los cuatro tratamientos a los 55 minutos de acción

Como se observa en la Tabla 4, está el promedio de los valores hallados en los recuentos en placa, ya que se realizaron siembras por triplicado, de los ensayos con cada uno de los tratamientos (enjuagues bucales), además del control de crecimiento y el control de inhibición. Podemos observar un porcentaje de inhibición significativo en todos los casos y una inhibición completa por la acción residual.

Tabla 4. Recuentos en UFC/mL para *Escherichia coli* con cada uno de los tratamientos evaluados y su porcentaje de inhibición

Tratamientos	Recuentos UFC/mL		%Inhibición	
	5 min	55 min	5 min	55 min
Control de crecimiento	3240		0	0
Colgate® Plax soft mint	10	0	99,69	100
Listerine®	20	0	99,38	100
Periogard®	10	0	99,69	100

<b>Oral-B® Complete</b>	0	0	100	100
<b>Control de inhibición</b>	0	0	100	100

% Inhibición

Figura 9. Porcentaje de inhibición para *Escherichia coli* con los cuatro tratamientos a los 5 minutos de acción

% Inhibición

Figura 10. Porcentaje de inhibición para *Escherichia coli* con los cuatro tratamientos a los 55 minutos de acción

## 6. Discusión

Los resultados obtenidos por medio de los recuentos en placa en el presente trabajo permiten evaluar cual enjuague bucal comercial tiene mayor efecto antimicrobiano frente a patógenos de interés oral, dichos datos permitieron determinar el porcentaje de inhibición. Inicialmente, se hallaron los valores para el control de crecimiento, es decir, el ensayo sin ningún tratamiento, y para el control de inhibición, en el cual el agente inhibitorio fue el hipoclorito de sodio al 2,5% v/v, esto debido a que esa es la concentración usada por los odontólogos para protocolos de antisepsia [39]. Del primer ensayo se pudo observar que hubo una colonización exitosa por parte de todos los microorganismos en los discos de hidroxapatita, idealmente esto es lo que sucedería en modelos *in vivo* esto por la composición dental, el esmalte que es la capa superficial del diente está compuesto de dicho sustrato, el cual es un fosfato de calcio [40]. De este último ensayo se obtuvo un resultado satisfactorio ya que se llevó a cabo de manera oportuna la inhibición de todos los microorganismos, igual que se ha demostrado en otros estudios, que tiene alrededor del 100% de eficacia en realizar dicha labor [41]. El mecanismo de acción del hipoclorito de sodio se basa en la destrucción de los



fosfolípidos de la pared de las células microbianas, además de producir cloraminas que interfieren en el metabolismo celular, también inactivan la actividad enzimática de manera irreversible en algunos microorganismos [42].

Para cada uno de los microorganismos se evaluó la actividad del tratamiento a los 5 minutos de actividad y a los 55 minutos, en el caso de *Streptococcus mutans* a los 5 minutos se pudo observar que el enjuague bucal que tuvo mayor actividad antimicrobiana fue Oral-B® complete, esto puede ser causado por su principio activo, el cloruro de cetilpiridinio, el cual según algunos estudios tiene una efectividad alta ante *S. mutans*, comparado con los enjuagues bucales con compuestos fluoruros, es decir, inhibe de manera contundente al microorganismo, esto gracias a su ion piridinio que neutraliza los fosfolípidos de la membrana celular, el ácido lipoteicoico en las bacterias Gram positivas y los lipopolisacáridos en las Gram negativas; además el cloruro de cetilpiridinio afecta la célula interfiriendo en la osmorregulación y la homeostasis [43]. También se pudo observar que no hay tampoco una diferencia significativa entre el porcentaje de inhibición de los diferentes tratamientos. En el ensayo a los 55 minutos, es decir, el de la actividad residual, se pudo observar un recuerdo mayor comparándolo con el ensayo anterior con todos los tratamientos evaluados, lo que nos indica que ante *Streptococcus mutans* se ve una inhibición significativa a los 5 minutos, pero no a los 55 minutos; esto nos indica que ante dicho microorganismo el contenido residual de los enjuagues que se mantenía en el disco no tuvo un efecto antimicrobiano, pero también se observó un incremento en las unidades formadoras de colonias, lo que puede ser causado por la tasa de crecimiento del microorganismo [44].

Para el hongo levaduriforme *Candida albicans* se pudieron observar resultados variados donde los tratamientos que más tuvieron efecto sobre este microorganismo fueron Colgate® Plax soft mint y Oral-B® complete, ambos tienen en común al cloruro de cetilpiridinio como su principio activo, algunos estudios realizados en Brasil demostraron que dicho compuesto tuvo un 80% de eficacia inhibiendo la adhesión de *C. albicans* a la superficie dental [45]. Por otra parte, de los resultados obtenidos con el enjuague Listerine® se pudo observar una inhibición del 37,82% en el ensayo de exposición por 5 minutos, pero se obtuvo un 91% para el realizado a los 55 min, este enjuague bucal tiene cuatro distintos principios activos los cuales son unos aceites esenciales, el eucaliptol, el mentol, el timol y el salicilato de metilo, estos son compuestos de origen natural obtenidos de plantas. Según un estudio realizado en 2020 se encontró que Listerine® carece de efecto inhibitorio ante *C. albicans*, estas variaciones se pudieron dar debido a la metodología utilizada por los autores, la cual utilizaban un modelo *in vivo* con dicho fin [46]. Evaluando los resultados obtenidos frente a *Enterococcus faecalis* se puede observar que nuevamente los enjuagues bucales que tienen como principio activo al cloruro de cetilpiridinio lograron inhibir completamente al microorganismo, es decir, el Colgate® Plax soft mint y Oral-B® complete; en cuanto al tratamiento Periogard® se pudo observar una inhibición completa después de los 55 minutos, lo que se puede contrastar con un estudio realizado en el 2019 en donde evaluaron diferentes concentraciones de clorhexidina, la cual es el principio activo del Periogard®, contra *E. faecalis*, y se obtuvo que al 0,1% es efectivo reduciendo la viabilidad de la bacteria pero esto lo lograba principalmente después de 30 minutos de incubación [47]. Finalmente, el

ultimo microorganismo en el cual se evaluó el efecto antimicrobiano fue *Escherichia coli*, en este ensayo se obtuvieron resultados con suma similitud, teniendo un porcentaje de inhibición por encima del 99% en todos los casos, esto es debido a que el cloruro de cetilpiridinio, el eucaliptol y la clorhexidina tiene un efecto inhibitorio para este microorganismo [48].

## 7. Conclusión

A partir de los resultados obtenidos a lo largo de este estudio, se puede concluir que el uso de todos los enjuagues bucales comerciales evaluados (Colgate® Plax soft mint, Oral-B® Complete; Periogard®; y Listerine®) es efectivo para disminuir la carga microbiana en el caso de *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis* y *Escherichia coli*. Por otra parte, en el caso de *Candida albicans*, se encontró que los enjuagues más efectivos para disminuir dicha carga son el Colgate® Plax soft mint y el Oral-B® Complete lo que seguramente se atribuye a su principio activo, el cloruro de cetilpiridinio, el cual ambos enjuagues bucales comerciales comparten.

## 8. Recomendaciones

Se recomienda a la comunidad científica, a la comunidad odontológica y a la comunidad en general el uso de todos los enjuagues bucales evaluados en el presente estudio en el caso de las infecciones bacterianas y en el caso de una infección fúngica por *Candida albicans* se recomienda el uso de los enjuagues bucales Colgate® Plax soft mint y Oral-B®, en ambos casos por lo menos con un tiempo de acción de 5 minutos, esto aclarando que no hay ningún conflicto de intereses sobre la marca o el producto en sí.

## 9. Referencias

[1] GBD 2017 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study, Lancet (London, England), 392(10159), 1789–1858, 2017. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32279-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32279-7)

[2] Rathee M, Sapra A. Dental Caries. [Updated 2021 Oct 6]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551699/>

[3] Persoon IF, Özok AR. Definitions and Epidemiology of Endodontic Infections, Current Oral Health Reports;278–85,2017. <https://doi.org/10.1007/s40496-017-0161-z>

[4] Kayaoglu G, Orstavik D. Virulence Factors of *Enterococcus Faecalis*, Critical Reviews in Oral Biology & Medicine;15(5):308–20, 2004.

[5] Moosazadeh, Mahmood; Akbari, Maryam; Tabrizi, Reza; Ghorbani, Anahita; Golkari, Ali; Banakar, Morteza; Sekhavati, Eghbal; Habibollah, Seyed; Bagheri K. Denture Stomatitis and *Candida albicans* in Iranian Population: A Systematic Review and Meta-Analysis, Journal of Dentistry Shiraz University of Medical Sciences, 283–92, 2016.

[6] Fidel PL. Candida-host interactions in HIV disease: implications for oropharyngeal candidiasis. Advances in Dental Research.;23(1):45–9, 2011. Doi 177/0022034511399284

[7] Janus MM, Crielaard W, Volgenant CMC, der Veen MH va., Brandt BW, Krom BP. *Candida albicans* alters the bacterial microbiome of early in vitro oral biofilms. Journal of Oral Microbiology [Internet]; 9(1), 2017. Available from: <https://doi.org/10.1080/20002297.2016.1270613>

[8] Tuominen R, Eriksson AL. A study on moral hazard in dentistry: Costs of care in the private and the public sector. Community Dentistry and Oral Epidemiology ;39(5):458–64, 2011. doi: 10.1111/j.1600-0528.2011.00609.x

[9] Jhorland A. La salud en Colombia: más cobertura pero menos acceso, Banco de la republica. 2014.

[10] American Dental Association (ADA). Mouthrinse (Mouthwash). 2022 Disponible en: <https://www.ada.org/resources/research/science-and-research-institute/oral-health-topics/mouthrinse-mouthwash>

[11] Macfarlane, Tatiana; Kawecki, Michal; Cunningham, Claudia; Bovaurd, Iain; Morgan, Rochelle; Rhodes, Kirstin; Watkins R. Mouthwash Use in General Population: Results from Adult Dental Health Survey in Grampian, Scotland. Journal of Oral & Maxillofacial Research; 2010. Doi:10.5037/jomr.2010.1402

[12] American association of endodontis. (2022). What is a root canal?. Tomado de: <https://www.aae.org/patients/root-canal-treatment/what-is-a-root-canal/>

[13] Najafi K, Ganbarov K, Gholizadeh P, Tanomand A, Rezaee MA, Mahmood SS, et al. Oral cavity infection by *Enterococcus faecalis*: virulence factors and pathogenesis. Reviews in Medical Microbiology.31(2):51–60, 2020. doi: 10.1097/MRM.000000000000168

[14] Gutierrez D, Castillo Y, Ibarra H, López M, Orozco J, Lafaurie G, Castillo D. A new model for the formation of an *Enterococcus faecalis* endodontic biofilm with nutritional restriction. *Journal of Basic Microbiology*. 62(1), 13-21, 2022. <https://doi.org/10.1002/jobm.202100533>

[15] Viera de Almeida, Carolina; Taddei, Antonio; Amadei A. The controversial role of *Enterococcus faecalis* in colorectal cancer. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*. 11:1–11, 2018. [ps://doi.org/10.1177/1756284818783606](https://doi.org/10.1177/1756284818783606)

[16] Jabbari SM, Shiadeh, Pormohammad A, Hashemi A, Lak P. Global prevalence of antibiotic resistance in blood-isolated *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*: A systematic review and meta-analysis. *Infection and Drug Resistance*. 2:2713–25, 2019.

[17] Millsop JW, Fazel N. Oral candidiasis. *Clinics in Dermatology [Internet]*.34(4):487–94, 2016. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clindermatol.2016.02.022>

[18] Salvatori O, Puri S, Tati S, Edgerton M. Innate immunity and saliva in *Candida albicans* -mediated oral diseases. *Journal of Dental Research*. 95(4):365–71, 2021. DOI: 10.1177/0022034515625222

[19] Metwalli KH, Khan SA, Krom BP, Jabra-Rizk MA. *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, and the Human Mouth: A Sticky Situation. *PLoS Pathog*. 9(10), 2013.

[20] Karpinski T, Szkaradkiewicz A. Microbiology of dental caries. *Journal of Biology and Earth Sciences*; 3, 1, 21-24, 2013.

[21] Rathee M, Sapra A. Dental Caries. [Updated 2021 Oct 6]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551699/>

[22] Johnson, D.I. Bacterial Virulence Factors. In: *Bacterial Pathogens and Their Virulence Factors*. Springer; pp 1-38, 2018. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-67651-7\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-67651-7_1)

[23] Zheng JX, Wu Y, Lin ZW, Pu ZY, Yao WM, Chen Z, et al. Characteristics of and virulence factors associated with biofilm formation in clinical *Enterococcus faecalis* isolates in China. *Frontiers in Microbiology*; 8:1–9, 2018. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02338>

[24] Pupo Marrugo S, Díaz Caballero A, Castellanos Berrio P, Simancas Escorcía V. Eliminación de enterococcus faecalis por medio del uso de hipoclorito de sodio, Clorhexidina y mtad en conductos radiculares. *Avances en Odontología*. 30(5):263–70, 2014.

[25] Anderson AC, Jonas D, Huber I, Karygianni L, Wölber J, Hellwig E, et al. *Enterococcus faecalis* from food, clinical specimens, and oral sites: Prevalence of virulence factors in association with biofilm formation. *Frontiers on Microbiology*. 2016;6(JAN).

[26] Kristich CJ, Rice LB, Arias CA. Enterococcal Infection—Treatment and Antibiotic Resistance. In: Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, et al., editors. *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection* [Internet]. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary; 2014-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK190420/>

[27] Bedoya-Correa CM, Rincón Rodríguez RJ, Parada-Sánchez MT. Genomic and phenotypic diversity of *Streptococcus mutans*. *Journal of Oral Biosciences*. 1;61(1):22–31, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.job.2018.11.001>.

[28] Sasaki M, Kodama Y, Shimoyama Y, Ishikawa T, Kimura S. Aciduricity and acid tolerance mechanisms of *Streptococcus anginosus*. *Journal of General and Applied Microbiology*. 64(4):174–9, 2018. <https://doi.org/10.2323/jgam.2017.11.005>

[29] Talapko J, Juzbašić MJ, Matijević T, Pustijanac E, Bekić S, Kotris I, et al. *Candida albicans*-The Virulence Factors and Clinical Manifestations of Infection. 2021; Available from: <https://doi.org/10.3390/jof7020079>

[30] Iroha IR, Mohammed ID, Moses IB, Ngwu NJ, Uzoeto HO, Oladimeji AS, et al. Molecular characterization of Enterobacteriaceae isolated from gingivitis and periodontitis patients and the antimicrobial activity of mouth wash agents. *Scientific African* [Internet]. 15:e01106, 2022. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2022.e01106>

[31] Costerton JW. *The Biofilm Primer*. Springer [Internet]. 199 p, 2007. Available from: <http://books.google.com/books?id=MbtCOHwAiIQc>

[32] Krishnamurthy S, Vijayarathy S. Role of nanomaterials in clinical dentistry [Internet]. Vol. 11, *Nanobiomaterials in Dentistry: Applications of Nanobiomaterials*. Elsevier Inc.; 2016. 211–240 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-323-42867-5.00009-6>

[33] Olejnik E, Szymanska J. Active ingredients of mouthwashes. *Acta Poloniae Pharmaceutica- Drug Research*. 77(6):825–32, 2021. DOI: 10.32383/appdr/128897

[34] Colgate. Enjuague Bucal Colgate® Plax Soft Mint® [Internet]. 2022 <https://www.colgateprofesional.com.pe/products/products-list/enjuague-bucal-colgate-plax-soft-mint>

[35] Listerine. Nuestros ingredientes [Internet]. 2022 <https://es.listerine.com/our-sustainability/ingredients>

[36] Colgate. Colgate® Periogard® (Enjuague bucal con gluconato de clorhexidina UPS, 012%) Enjuague bucal [Internet] ; 2022 [https://www.colgateprofesional.com.pe/products/products-list/colgate-periogard#:~:text=Descripci%C3%B3n,PerioGard%20\(Enjuague%20Bucal%20con%20Gluconato%20de%20Clorhexidina%2C%200.12%25\)%20es,disoestearato%20de%20sorbito%20C3%A1n%20PEG%2D40%2C](https://www.colgateprofesional.com.pe/products/products-list/colgate-periogard#:~:text=Descripci%C3%B3n,PerioGard%20(Enjuague%20Bucal%20con%20Gluconato%20de%20Clorhexidina%2C%200.12%25)%20es,disoestearato%20de%20sorbito%20C3%A1n%20PEG%2D40%2C)

[37] Oral B. WHAT ARE THE INGREDIENTS WE USE IN OUR TOOTHPASTES? [Internet]; 2022. <https://www.oralb.co.uk/en-gb/product-collections/what-is-in-our-toothpaste>

[38] Mohd Pu'ad NAS, Koshy P, Abdullah HZ, Idris MI, Lee TC. Syntheses of hydroxyapatite from natural sources. *Heliyon* [Internet]. 2019;5(5):e01588. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01588>

[39] Cárdenas-Bahena Á, Sánchez-García S, Tinajero-Morales C, González-Rodríguez VM, Baires-Várguez L. Use of sodium hypochlorite in root canal irrigation: Opinion survey and concentration in commercial products. *Revista odontológica Mexicana*. 16(4):252–8, 2012.

[40] Welborn VV. Enamel synthesis explained. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 117(36):21847–8, 2020. <https://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.2014394117>

[41] Hsieh S-C. Materials The Antibacterial E ffi cacy and In Vivo Toxicity of ( EO ) Water-Based Endodontic Irrigating Solutions. *Materials* (Basel, Switzerland). 1–9, 2020. <https://doi.org/10.3390/ma13020260>

[42] Estrela, C., Estrela, C. R., Barbin, E. L., Spanó, J. C., Marchesan, M. A., & Pécora, J. D. Mechanism of action of sodium hypochlorite. *Brazilian dental journal*, 13(2), 113–117, 2002. <https://doi.org/10.1590/s0103-64402002000200007>

[43] Mao X, Aue DL, Buchalla W, Hiller KA, Maisch T, Hellwig E, et al. Cetylpyridinium chloride: Mechanism of action, antimicrobial efficacy in biofilms,

and potential risks of resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 64(8):1–14, 2020. <https://doi.org/10.1128/AAC.00576-20>

[44] Shields RC, Burne RA. Growth of *Streptococcus mutans* in biofilms alters peptide signaling at the sub-population level. *Frontiers in Microbiology*. 7(JUL):1–13, 2016. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01075>

[45] Borsatt MA parecid. Antifungal effect of electrospun nanofibers containing cetylpyridinium chloride against *Candida albicans*. *Brazil Oral Research*. 28(1):1–6, 2014.

[46] Handschuh Briones RA, Silva Arcos EN, Urrutia M, Godoy-Martínez P. Actividad antifúngica de los enjuagues bucales frente a *Candida albicans* y *Rhodotorula mucilaginosa*: un estudio in vitro. *Revista Iberoamericana de Micología*. 37(2):47–52, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2019.10.006>

[47] Dewiyani S, Bachtiar BM, Bachtiar EW, Sumawinata N. Antimicrobial Efficacy of Various Concentrations of Chlorhexidine Against *Enterococcus Faecalis* Bacteria. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 1–4, 2019. DOI: 10.7860/JCDR/2019/38076.13393

[48] Masadeh M. Gharaibeh S. Alzoubi S. Obeidat W. Antimicrobial Activity of Common Mouthwash Solutions on Multidrug-Resistance Bacterial Biofilms. *Journal of Clinical Medicine Research*. 2013. doi: <http://dx.doi.org/10.4021/jocmr1535w>