



**UNIVERSIDAD DE TALCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA**

**ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO Y DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD
ANTIMICROBIANA DE PRODUCTOS QUÍMICOS Y BIOACTIVOS EN
INSTRUMENTAL UTILIZADO EN LAS CLÍNICAS ODONTOLÓGICAS
DE LA UNIVERSIDAD DE TALCA**

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE CIRUJANO- DENTISTA

**ESTUDIANTES: ROSARIO CÁRDENAS CAMUS
DEBBIE FUSTER DEL PINO**

**DOCENTE GUÍA: OLGA LOBOS GILABERT
DOCENTE INFORMANTE: PATRICIA POBLETE TAPIA**

**TALCA-CHILE
2019**

CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



Talca, 2020

ÍNDICE

ÍNDICE.....	2
1. INTRODUCCIÓN.....	7
2. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN	9
3. OBJETIVOS.....	10
3.1. Objetivo General.....	10
3.2. Objetivos Específicos	10
4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	11
4.1. Instrumental odontológico	11
4.1.1. Micromotor.....	11
4.1.2. Contrángulo	12
4.1.3. Turbina	12
4.1.4. Piezas de mano	12
4.2. Normas de desinfección de material odontológico.....	13
4.2.1. Métodos de control de infecciones:	13
4.2.1.1. Limpieza.....	13
4.2.1.2. Desinfección.....	13
4.2.1.3. Esterilización.....	14
4.2.2. Desinfectantes de uso frecuente y su toxicidad.....	14
4.2.2.1. Alcohol	16
4.2.2.2. Clorhexidina	17
4.2.2.3. Glutaraldehído	17
4.2.2.5. Hipoclorito de sodio	18
4.2.2.6. Cavicide ®.....	19

4.2.3. Clasificación del material odontológico	19
4.3. Compuestos bioactivos	20
4.3.1. Definición	20
4.3.1. Ajo	21
4.3.2. Cebolla.....	22
4.3.3. Cardamomo	22
4.3.4. Eucalipto.....	22
4.3.5. Romero	22
4.3.6. Boldo	23
4.3.7. Menta.....	23
4.3.8. Manzanilla	23
4.3.9. Limón	23
4.4 Análisis de microorganismos	24
4.4.1. Taxonomía bacteriana	24
4.4.2. Factores de virulencia:.....	25
4.4.2.1. Lipopolisacárido (LPS)	25
4.4.2.2. Proteínas de membrana.....	26
4.4.2.3. Presencia de enzimas:.....	26
4.5. Pruebas microbiológicas.....	27
4.5.1. Medios de cultivo	27
4.5.1.1. Medios de cultivo fundamentales	27
4.5.1.2. Medios de cultivo mejorados.....	27
4.5.1.3. Medios de cultivo selectivos-diferenciales.....	28
4.5.2. Pruebas microbiológicas primarias.....	29
4.5.2.1. Tinción de Gram	29

4.5.2.2. Prueba de Oxidasa	30
4.5.2.3. Prueba de Catalasa.....	30
4.5.3. Pruebas microbiológicas secundarias	31
4.5.3.1. Prueba de Coagulasa.....	31
4.5.3.2. Prueba de Camp.....	31
5. METODOLOGÍA.....	31
5.1. Obtención de muestras.....	31
5.1.1. Toma de muestras.....	32
5.1.2. Siembra de muestras.....	32
5.2. Recuento de aerobios mesófilos (RAM)	33
5.2.1. Cálculo de superficie	33
5.2.2. Recuento de colonias bacterianas	34
5.3. Aislamiento e identificación bacteriana	34
5.3.1. Aislamiento bacteriano	34
5.3.2. Pruebas microbiológicas primarias y secundarias	35
5.3.2.1. Tinción de Gram.....	35
5.3.2.2. Prueba de catalasa.....	36
5.3.2.3. Prueba de oxidasa	36
5.3.2.4. Presencia de hemolisina.....	37
5.3.2.5. Prueba de Coagulasa.....	37
5.3.2.6. Prueba de Camp.....	38
5.3.3. Identificación bacteriana con medios de cultivo selectivos-diferenciales.....	38
5.3.3.1. Siembra en Agar McConkey	38
5.3.3.2. Siembra en Agar Mitis Salivarius.....	38
5.3.3.3. Siembra en Agar Telurito de Potasio.....	39

5.3.3.4. Siembra en Caldo de cultivo Cloruro de Sodio al 6,5%	39
5.3.3.5. Siembra en Agar Bilis Esculina.....	39
5.3.4. Identificación bacteriana con sistema semi-automatizado	40
5.4. Extracción de productos bioactivos.....	40
5.4.1. Selección de productos	40
5.4.2. Extractos acuosos	41
5.4.3. Extractos etanólicos.....	42
5.5. Pruebas de susceptibilidad en desinfectantes de uso frecuente y compuestos bioactivos	43
5.5.1. Screening de compuestos bioactivos	43
5.5.2. Análisis de la actividad antimicrobiana de productos químicos.....	44
5.5.3. Análisis de la actividad antimicrobiana de productos bioactivos.....	46
5.6. Comparación de actividad antimicrobiana	47
6. RESULTADOS	48
6.1. Recuento de colonias bacterianas por placa	48
6.2. Recuento de aerobios mesófilos (RAM) por superficie	49
6.2. Microorganismos aislados agrupados según Tinción Gram.....	50
6.3. Microorganismos agrupados según pruebas microbiológicas primarias.....	51
6.4. Identificación de microorganismos	52
6.5. Actividad antimicrobiana de productos químicos	53
6.6. Actividad antimicrobiana de compuestos bioactivos	56
6.7. Comparación de Actividad antimicrobiana de productos químicos y bioactivos	58
7. DISCUSIÓN.....	61
7.1. Recuento de microorganismos	61
7.2. Identificación y patogenicidad de microorganismos.....	64

7.3. Actividad antimicrobiana de productos químicos y bioactivos.....	65
8. CONCLUSIÓN	69
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

1. INTRODUCCIÓN

La cavidad oral se encuentra constituida de tejidos blandos y duros, y recubierta por mucosa, en la que existen millones de microorganismos capaces de infectar el material operado por los odontólogos. El micromotor dental es un aparato usado con mucha frecuencia en los procedimientos odontológicos, por lo que se contamina rápidamente con microorganismos que habitan la cavidad oral, debiéndose recurrir a desinfectantes recomendados de uso frecuente para su control.

Lo anterior, conlleva a un alto riesgo de producir infecciones cruzadas entre pacientes atendidos con el mismo instrumental rotatorio, ocurriendo esto tanto en centros de salud públicos como privados. Con las tecnologías actuales, encontramos micromotores y turbinas de alta velocidad que al ser utilizados expulsan aire y agua, generando aerosoles que incrementan aún más este riesgo. Esto ha generado controversia sobre los métodos de desinfección aplicados a este tipo de material rotatorio, ya que, hasta el momento, solo se podría lograr la esterilización de estos mediante autoclave o pupinel, lo que podría requerir un mayor tiempo de esterilización, produciendo un desgaste progresivo del material.

Para llegar a solucionar el problema de la contaminación, es importante lograr identificar los microorganismos que comúnmente se encuentran presentes en este instrumental y que pudiesen producir infecciones o patologías asociadas a la atención en Salud. Teniendo esta información, se pudiese buscar agentes químicos antimicrobianos o compuestos bioactivos con cualidades antimicrobianas que logren el control de microorganismos en el instrumental rotatorio, sin necesidad del uso de autoclave o pupinel, o de agentes químicos sintéticos, ya que estos pueden resultar ser altamente contaminantes o generar resistencias en los microorganismos.

Los compuestos bioactivos son sustancias que se encuentran contenidas en plantas o alimentos de origen natural y que en la actualidad están siendo muy investigadas ya que pudiesen tener propiedades que ayuden a combatir microorganismos y, por lo tanto, algunas enfermedades. Para obtenerlos se debe someter a la planta o alimento a diversos procedimientos que permiten la extracción y uso del compuesto bioactivo.

Considerando la potencial aplicación de estos productos como agentes antimicrobianos, es de gran interés poder determinar la efectividad de compuestos bioactivos que cumplan con la exigencia de realizar un control profundo de los microorganismos contaminantes del instrumental de forma efectiva y amigable con el medio ambiente.

2. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

- 2.1. ¿Los micromotores y contraángulos se encuentran contaminados con microorganismos luego de su utilización en los pacientes?
- 2.2. ¿Los desinfectantes de uso frecuente odontológico y nuevos productos bioactivos, podrán eliminar efectivamente la contaminación?
- 2.3. ¿Se puede lograr esterilización o desinfección de micromotores y contraángulos dentales mediante el uso de desinfectantes de uso frecuente o con compuestos bioactivos?
- 2.4. ¿Los desinfectantes y los nuevos productos bioactivos, son comparables en cuanto a efectividad?

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

Determinar la contaminación microbiológica de micromotores y contraángulos ya dispuestos para ser utilizados y observar la acción antimicrobiana de los productos químicos que comúnmente se emplean en la desinfección de éstos y comparar su actividad con la de nuevos productos bioactivos de origen natural.

3.2. Objetivos Específicos

3.2.1. Evaluar microbiológicamente micromotores y contrángulos utilizados en el Centro de Clínicas Odontológicas (CCO) de la Universidad de Talca.

3.2.2. Determinar la actividad antibacteriana de los productos químicos usualmente utilizados en el Centro de Clínicas Odontológicas de la Universidad de Talca sobre las bacterias aisladas del instrumental.

3.2.3. Determinar la actividad antibacteriana de los productos bioactivos sobre las bacterias aisladas del instrumental.

3.2.4. Comparar la actividad antibacteriana entre los productos químicos de uso frecuente y bioactivos.

4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

4.1. Instrumental odontológico

Para el correcto trabajo del odontólogo, este debe contar con diversos materiales dentales, entre los que encontramos el instrumental rotatorio que se define como instrumentos de forma, tamaño y composición variables accionados por sistemas de impulsión que actúan, mediante otros instrumentos como fresas, piedras y discos, sobre el diente y generan una serie de fenómenos que ocurren de manera simultánea o sucesiva como corte, desgaste, abrasión, entre otros. Dentro del instrumental rotatorio encontramos.¹

4.1.1. Micromotor

Son aparatos de pequeñas dimensiones que en su interior contienen un motor y no pueden operar de forma directa, sino que necesitan de un intermediario que puede ser el contrángulo o pieza de mano.¹

4.1.1.1. Eléctrico: se conectan a la energía mediante un transformador porque se alimentan con corriente continua de bajo voltaje.

4.1.1.2. Neumático: funcionan mediante aire comprimido que corre por mangueras que pasan por una caja de control donde se regula su presión.



Figura 1: Micromotor dental

4.1.2. Contrángulo

Intermediario que se acopla al micromotor y cambia el ángulo de rotación al sentido transversal permitiendo trabajar en zonas bucales poco accesibles.¹



Figura 2: Contrángulo dental

4.1.3. Turbina

Si bien la totalidad del aparato es denominado turbina, esta se encuentra en el cabezal y el cuerpo es un contenedor de los tubos de fluidos que sirve como empuñadura.¹



Figura 3: Turbina dental

4.1.4. Piezas de mano

Se acoplan al micromotor y son rectas, por lo que su uso es, principalmente, extraoral o quirúrgico.¹

4.2. Normas de desinfección de material odontológico

Existen diferentes métodos de control de infecciones dependiendo del riesgo de infección, esto es evaluado según algunos factores como la capacidad de defensa del tejido con el que entra en contacto, la carga microbiana del instrumento, entre otros. El método de clasificación tradicional aún vigente es la clasificación de Spaulding, que consiste en clasificar los artículos en tres categorías según la capacidad de producir infección (críticos, semicríticos, no críticos)². Con respecto a esto, existe la norma general técnica N° 199 sobre esterilización y desinfección en establecimientos de atención en salud creada por el Ministerio de Salud de Chile (MINSAL), según la cual se deben guiar todos los centros de salud al momento de realizar limpieza y desinfección de su instrumental.³

4.2.1. Métodos de control de infecciones:

4.2.1.1. Limpieza

Remoción de la materia orgánica e inorgánica de la superficie de un objeto o superficie a través de métodos mecánicos (arrastre) automatizados o manuales, usualmente con agua y detergentes o productos enzimáticos.³

4.2.1.2. Desinfección

Eliminación de carga microbiana. La efectividad de un desinfectante depende de varios factores: los inherentes al producto, los inherentes a la aplicación y los inherentes al microorganismo. Existen distintos tipos de desinfección:

- Desinfección de alto nivel: Proceso de eliminación de microorganismos (micobacterias, hongos, esporas de hongos, virus, bacterias vegetativas) con excepción de esporas bacterianas. En ciertas ocasiones, algunos de estos procesos pueden eliminar esporas bacterianas, aunque a la fecha no se dispone de métodos de certificación adecuados para usarlos como esterilizantes. Algunos de éstos son glutaraldehído, formaldehído, gluconato de clorhexidina. Se utilizan en materiales semicríticos que no pueden ser sometidos a esterilización.

- Desinfección de nivel intermedio: Proceso de eliminación de microorganismos (micobacterias, hongos, esporas de hongos, virus, bacterias vegetativas) con excepción de esporas bacterianas.

- Desinfección de bajo nivel: Proceso de eliminación a través de productos químicos de formas vegetativas de bacterias, algunos hongos y virus lipídicos, sin tener efecto sobre micobacterias y esporas.³

4.2.1.3. Esterilización

El MINSAL lo define como el proceso capaz de eliminar toda vida microbiana incluyendo esporas bacterianas mediante métodos físicos, químicos, fisicoquímicos o plasma.³

4.2.2. Desinfectantes de uso frecuente y su toxicidad

Dependiendo del recinto de salud, se pueden encontrar diversas sustancias químicas que pueden utilizarse como desinfectantes y además tener otros usos según sea necesario para quien lo manipule. Todos estos productos deben encontrarse etiquetados según el Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos (GHS), cuyo objetivo es estandarizar los peligros que tiene cada sustancia química, considerando riesgos

para la salud y para el medio ambiente.⁴ Este sistema tiene por objetivo mejorar la salud humana, ya que es sencillo y podrá alertar al consumidor sobre los riesgos de utilizar cierto producto; también busca que el uso de las sustancias sea racionalizado, protegiendo de este modo el medio ambiente y además facilita la comercialización, ya que engloba en un solo sistema toda la información necesaria para la venta de productos químicos. El etiquetado según GHS consiste en el uso de palabras de advertencia (peligro y atención), indicaciones de peligro, consejos de prudencia para el uso del producto, identificación del producto y proveedor e información complementaria, además de una hoja de datos de seguridad (HDS); es en esta donde se podrá encontrar la identificación del peligro o peligros de la sustancia y la información toxicológica y ecotoxicológica.⁵ Sumado a lo anterior, se encontrarán pictogramas que indiquen los peligros que el producto pueda tener para la salud o el medioambiente como se observa en la Figura 4.



Figura 4: Pictogramas GHS

Para determinar la toxicidad de los productos químicos, estos se clasificarán en cinco categorías de peligro basadas en la toxicidad aguda de la sustancia, que quiere decir que son los efectos adversos que se manifiestan tras la administración por vía oral o cutánea de una sola dosis de dicha sustancia, de dosis múltiples administradas a lo largo de 24 horas, o como consecuencia de una exposición por inhalación durante 4 horas. Según esta categorización, aquellas pertenecientes al número 5 son las que presentan un menor peligro y a medida que se reduce la categoría, aumenta la toxicidad. También, en la HDS se podrá encontrar

información sobre su ecotoxicidad, es decir, efectos adversos sobre el medio ambiente, principalmente sobre el medio acuático; categorizándose según el peligro al igual que en la toxicidad aguda para humanos.⁶

A continuación, se mencionan algunos desinfectantes de uso común y sus características, mecanismos de acción y datos de relevancia para su estudio:

4.2.2.1. Alcohol

Presenta un amplio rango de concentraciones disponibles, se utiliza para limpieza, se dice que actúan como agente antimicrobiano de amplio espectro que incluye *Mycobacterium tuberculosis*, hongos, virus y bacterias grampositivas y gramnegativas. Sin acción frente a esporas, su mecanismo de acción es a través de la deshidratación y desnaturalización de las proteínas del microorganismo que está atacando, esto a su vez conlleva a una disrupción de la integridad citoplasmática produciendo lisis celular e interferencia con el metabolismo microbiano. Altas concentraciones del vapor pueden causar somnolencia, tos, irritación de los ojos y el tracto respiratorio, dolor de cabeza y síntomas similares a la ingestión, si llegara a haber contacto con la piel puede causar resequedad o en los ojos irritación, enrojecimiento, dolor, sensación de quemadura. Efecto máximo precoz (10 segundos), se considera con efecto instantáneo.⁷ Respecto a su toxicidad, se encuentra clasificado en la categoría toxicológica 5 según el GHS y categoría 2 para la irritación ocular, mientras que su ecotoxicidad no se encuentra establecida, pero se indica que no debiese tener efectos adversos sobre el medio ambiente.⁸

4.2.2.2. Clorhexidina

Es el antiséptico de mayor efecto residual (5-6 horas) por su afinidad por la piel. La clorhexidina es una biguanida catiónica. Su acción microbicida se debe a la alteración de membrana microbiana y precipitación de contenido celular. Mayor espectro sobre grampositivos que sobre gramnegativos, su acción contra *M. tuberculosis* es mínima, su acción contra hongos es regular y muy buena contra la mayoría de los virus. No tiene actividad sobre esporas. A pesar de su buena actividad antibacteriana, el inicio de acción es intermedio con efecto máximo a los 3 minutos. (unidad de prevención y control de infecciones asociadas a la atención de salud, 2013) Según su clasificación GHS, se encuentra en la categoría 2 para irritación de piel y ojos y categoría 3 para su toxicidad en el sistema respiratorio; mientras que para los organismos acuáticos y el medio ambiente se categoriza con el número 1.^{9,10}

4.2.2.3. Glutaraldehído

Desinfectante de alto nivel, presenta buena compatibilidad con diversos materiales, toxicidad sobre vía respiratoria y cutánea, baja actividad sobre bacterias si no se utiliza con otros productos. Bactericida de elevada potencia. Es activo frente a grampositivos, gramnegativos, micobacterias, virus y algunos hongos. El tiempo de acción es rápido 20-45 minutos. Se inactiva con la materia orgánica. Es irritante para la piel, ojos y mucosa del tracto respiratorio. Puede producir sensibilización, ya sea por contacto o inhalación.¹¹ Respecto a su toxicidad, puede generar irritación ocular y dérmica, además de ser levemente tóxico para el medio ambiente.¹²

4.2.2.4. Amonio Cuaternario

A menudo se consideran sustancias sin riesgos tóxicos. Esto ha llevado a su uso generalizado tanto en hogares como en instituciones de salud, a pesar de su espectro de actividades bastante limitado (bacterias grampositivas y gramnegativas). Con respecto a su mecanismo de acción, la porción hidrófoba penetra en las membranas, mientras que el grupo polar catiónico se asocia con los fosfatos de los fosfolípidos, provocando alteraciones en dichas membranas, reflejadas en la pérdida de su semipermeabilidad, con salida de metabolitos de N y P desde el citosol. Es entonces cuando el detergente puede entrar al interior celular, con un efecto secundario de desnaturalización de proteínas. Su actividad se mejora a pH alcalino. Su tiempo de acción es de 30 segundos. Son rápidamente bactericidas a concentraciones muy bajas (del orden de una parte por millón, 1 ppm), siempre que en el material a tratar no exista materia orgánica.¹³ Tienen baja toxicidad, por lo que se pueden emplear como desinfectantes y antisépticos de la piel, ya que según su categorización GHS, no debiese presentar síntomas por inhalación, ingestión ni contacto con la piel y solo se encuentra en la categoría 2 para irritación ocular. Respecto a su ecotoxicidad, es tóxico para organismos acuáticos, pero no se encuentra categorizado.¹⁴

4.2.2.5. Hipoclorito de sodio

Los hipocloritos son los desinfectantes clorados más ampliamente usados. Produce una desinfección de nivel intermedio, es activo frente a bacterias grampositivo, gramnegativo, virus, esporas y bacilo de la tuberculosis. El tiempo mínimo de acción es de 10 minutos. Irritante para la piel y mucosas. Su ingestión provoca graves lesiones en la mucosa esofagástrica. Su mecanismo de acción no está claro; se postula la inhibición de algunas reacciones enzimáticas, desnaturalización de proteínas y activación de ácidos nucleicos. Tiene actividad residual, se inactiva frente a materia orgánica, corroe el material metálico, es inestable y pierde su eficiencia.¹⁵ Tiene categoría de toxicidad 1 al entrar en contacto con la

piel, las mucosas y las vías respiratorias, además de la misma categorización por su peligro para el medio ambiente acuático.¹⁶

4.2.2.6. Cavicide ®

Contiene alcohol al 17% y cloruro de bencetonio al 0,28%. Sus fabricantes aseguran que elimina al menos 3 tipos de bacterias, virus como hepatitis B, C, VIH, virus sin envoltura, micobacterias, esporas, hongos como *Candida* spp. y *Aspergillus* spp. Este compuesto es compatible con materiales sintéticos, además de ser virucida. Su acción virucida se inicia entre los primeros 30 segundos a 2 minutos de ser aplicado, mientras que su actividad bactericida, fungicida y tuberculocida de 1 a 3 minutos después. El bencetonio o benzalconio es un compuesto de amonio cuaternario (CCA) y su mecanismo de acción se ha atribuido a la inactivación de las enzimas productoras de energía, desnaturalización de las proteínas celulares esenciales y la ruptura de la membrana celular.

Diversas bacterias gramnegativo pueden desarrollarse al desinfectar con este producto. En 1978, la Asociación Dental Americana (ADA) eliminó a los CCA, incluso al cloruro de bencetonio, de su programa de aceptación.¹⁷ Respecto a su toxicidad, se encuentra en la categoría 2 solo para irritación ocular y en la categoría 3 para su toxicidad en medio ambiente acuático.¹⁸

4.2.3. Clasificación del material odontológico

Estos materiales son clasificados por la ADA (American Dental Association) como instrumental crítico, semi-crítico y no crítico; siendo estas agrupaciones las que indican el método de desinfección de cada material. Los micromotores, contraángulos y turbinas odontológicas son clasificados como semi-críticos, es decir que entran en contacto con mucosas o piel expuesta y debieran ser esterilizados con calor entre todos los pacientes.⁶ La

norma anterior dice que existen cuatro tipos de esterilizadores de este tipo, siendo el más común el autoclave a vapor, para el cual se requiere utilizar entre 20 y 40 minutos de funcionamiento de la máquina, además un tiempo de secado y enfriamiento que dependerá del material esterilizado.¹⁹ La esterilización mediante autoclave consiste en destruir todos los microorganismos, incluyendo esporas, ingresando el instrumental envuelto en un material determinado al autoclave⁸, los cuales por lo general se utilizan a 121°C con vapor de agua durante 30 o 40 minutos.²⁰

A pesar de las normas anteriores, por motivos de tiempo y recursos, es muy común tratar el instrumental rotatorio odontológico como instrumental no crítico, ya que los fabricantes aseguran que con una adecuada lubricación un micromotor puede resistir 1.500 ciclos de autoclavado, por lo tanto, si se esterilizara 8 veces al día (aproximación por cantidad de pacientes atendidos en consultas y centros de salud) cada micromotor tendría una vida útil de 6 a 8 meses.²¹ Es por esto que generalmente se desinfecta con agentes químicos, siendo el etanol el más común y ha sido demostrado con estudios experimentales que su eficacia no es la adecuada para evitar infecciones cruzadas en los pacientes.²²

4.3. Compuestos bioactivos

4.3.1. Definición

Los compuestos bioactivos son componentes externos que se cree que proporcionan nutrición y salud. Se obtienen beneficios, tales como efectos antiinflamatorios y anticancerígenos. La extracción es el primer procedimiento para obtener los compuestos bioactivos, mezclando con un solvente adecuado.²³

Los compuestos bioactivos son, generalmente, metabolitos secundarios, como los ácidos fenólicos y los flavonoides, que están presentes en estructuras insolubles cerradas, lo que hace que su extracción sea un desafío. Hay muchos métodos de extracción tradicionales diferentes, como Soxhlet, reflujo térmico y maceración. Este proceso de extracción se puede

describir como un fenómeno de transporte de masa donde los componentes presentes en una matriz se transfieren al disolvente.

En general, los compuestos bioactivos, como los compuestos fenólicos, son metabolitos secundarios de las plantas, y están presentes en niveles mucho más bajos que las moléculas constitutivas (lípidos, proteínas, carbohidratos y minerales). Muchos de estos compuestos bioactivos pierden su actividad por degradación térmica cuando son sometidos a calor.

La relación entre el solvente y el compuesto bioactivo varía su rendimiento de extracción dependiendo de las proporciones que se utilicen en cada uno, se puede producir por ejemplo una saturación de solventes y rendimientos de extracción más bajos.²⁴

Existen diversos estudios que prueban la efectividad de compuestos bioactivos contra microorganismos determinados, por lo que se puede tener una idea previa de aquellos elementos naturales con potencial antimicrobiano, ejemplos de estos son:

4.3.1. Ajo

Estudios en Grecia demostraron una significativa actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli*, bacteria que puede presentar resistencia antibiótica,²⁵ si bien el estudio mencionado se realizó con ajo que crecía en ese país, existen otros hallazgos que demuestran también la efectividad del extracto acuoso de ajo contra esta bacteria²⁶. También, se ha demostrado mediante estudios de difusión su eficiencia en extracto acuoso y crudo contra *Pseudomonas aeruginosa*.²⁷ Se han realizado estudios anteriores que también lo proponen como un agente antimicrobiano.

4.3.2. Cebolla

Se ha comprobado que su efecto inhibe en más de un 65% el crecimiento de *Clostridium difficile*.²⁸ Además, con diversas especies de cebollas se ha probado su potencial antimicrobiano en *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y *Salmonella typhimurium*, logrando inhibir el crecimiento de todos estos microorganismos.²⁹

4.3.3. Cardamomo

Si bien no ha sido muy estudiado, existe evidencia de que su aceite esencial actúa inhibiendo el crecimiento de ciertas bacterias que producen gastritis, por lo que está demostrado su efecto antibacteriano.³⁰

4.3.4. Eucalipto

Estudios demuestran que el aceite esencial de esta planta tiene acción bactericida en *Enterococcus faecalis*,³¹ microorganismo patógeno que es común encontrar en la cavidad oral. También se ha probado en *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus*, demostrándose que puede ser un eficiente agente contra estos microorganismos.³²

4.3.5. Romero

Se ha estudiado su efecto antimicrobiano sobre *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mutans* y *Pseudomonas aeruginosa*, patógenos que pueden producir infecciones a nivel de la cavidad oral, y los resultados indican que el extracto de romero funciona para el control de estos microorganismos.³³

4.3.6. Boldo

Se han estudiado sus propiedades y se ha logrado deducir que tiene una alta actividad inhibitoria contra la ureasa de *Helicobacter pylori*, de esto se podría sugerir una posible actividad antibacteriana hacia otros microorganismos.³⁴

4.3.7. Menta

Su aceite esencial presenta una actividad antimicrobiana moderada hacia bacterias grampositivo y débiles en gramnegativo al trabajar con su concentración mínima inhibitoria.³⁵ No hay estudios actuales sobre la efectividad de sus extractos acuosos y etanólicos.

4.3.8. Manzanilla

Si bien no se conoce exactamente su mecanismo de acción, el extracto de manzanilla ayuda a inhibir el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa*,³⁶ siendo un efectivo antibacteriano contra este microorganismo.³⁷

4.3.9. Limón

Se probó un extracto comercial de limón que arrojó resultados de una gran actividad antimicrobiana para *Escherichia coli* y varias cepas de *Salmonella* entérica,³⁸ por lo que sería interesante el estudio de la actividad antibacteriana de limones naturales.

4.4 Análisis de microorganismos

El tamaño y morfología de las bacterias son caracteres determinados genéticamente para cada especie. El tamaño de las células bacterianas se expresa en micrómetros, las bacterias en general miden en promedio 1 o 2 μm de largo por 0.5 de ancho.

Se sugiere que la forma de una bacteria tiene relevancia biológica, un ejemplo muy claro de esto es que, con un universo de formas para elegir, las bacterias individuales adoptan solo aquellas que son adaptables a sus formas de vida. Por otro lado, algunas bacterias pueden modificar su morfología en respuesta a señales ambientales o durante el curso de la patogénesis, lo que sugiere que la forma es lo suficientemente importante para su propia regulación. Las bacterias que no presentan una morfología determinada, se les denomina pleomórficos. Actualmente, existe un amplio rango de morfologías y agrupaciones bacterianas que permite realizar aproximaciones iniciales al proceso de identificación. Podemos encontrar cocos individuales, en tétradas, en cubos, en cadena, en racimo; bacilos individuales, en cadena, en empalizada, etc.

Por otra parte, existen metodologías muy simples fundamentadas en tinciones que permiten realizar una separación muy preliminar de las bacterias. La más común e importante es la tinción Gram que realiza una dicotomía bacteriana entre grampositivo y gramnegativo. Las primeras, una vez finalizada la tinción, se observan de azul o violeta y las segundas de color rojo o rosado.³⁹

4.4.1. Taxonomía bacteriana

Se refiere a la clasificación biológica de los microorganismos, incluye nomenclatura e identificación:

- Organización estructurada de los seres vivos en grupos también llamados taxones o rangos. Esto dependiendo de su semejanza o parentesco evolutivo.
- Identificación: Asignación de un microorganismo a un grupo o taxón, mediante el uso de diferentes metodologías de laboratorio.

Desde sus inicios la taxonomía bacteriana clásica ha utilizado aspectos morfológicos con énfasis en la forma, agrupación de células bacterianas, tamaño y afinidad tintorial al Gram; aspectos nutritivos y fisiológicos remarcando aspectos de conservación de energía, su relación con el oxígeno, tolerancia a la sal, y principalmente su capacidad para tolerar o metabolizar diferentes fuentes de carbono, nitrógeno y azufre. A lo anterior se le ha adicionado otros factores tales como susceptibilidad a los antibacterianos, presencia de pigmentos, capacidad patogénica, entre otros.³⁹

4.4.2. Factores de virulencia:

Corresponden a moléculas que producen los microorganismos para lograr colonizar un nicho y aumentar su patogenicidad; entre estos factores encontramos:

4.4.2.1. Lipopolisacárido (LPS)

Es conocido como endotoxina bacteriana. Es indispensable para la supervivencia de las bacterias gramnegativo dado que juega un rol fundamental en el mantenimiento y organización de la membrana externa. El LPS es una molécula anfipática que contiene tres regiones diferentes: el lípido A, el núcleo o core y el antígeno O.

4.4.2.2. Proteínas de membrana

- Proteínas menores: denominadas así por estar en menor cantidad, cumplen funciones importantes en la vida bacteriana. Actúan como canales específicos que permiten el paso de ciertas moléculas como vitamina B12 quelatos de Fe, nucleósidos, maltosa, maltodextrinas, entre otras. Algunas sirven de receptores de bacteriófagos. Algunas presentan actividad enzimática como fosfolipasa A y fosfatasa ácida, También sirven como receptores de diferentes bacteriocinas.
- Proteínas mayores: son las que se encuentran en mayor cantidad en la membrana externa. Las más importantes son las porinas y la lipoproteína de Braun, esta última es la que se encuentra en mayor cantidad y cumple funciones estructurales y estabilizadoras de la envoltura celular.

4.4.2.3. Presencia de enzimas:

- Catalasa: es una enzima que poseen la mayoría de las bacterias aerobias, la cual descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno gaseoso que se libera en forma de burbujas. La acumulación de peróxido de hidrógeno es tóxica para los microorganismos, por esto la mayoría de ellos tienen esta enzima que les permite degradarlo.
- Oxidasa: es una enzima llamada CitocromoC oxidasa, la cual es esencial en la cadena de transporte de electrones para la respiración celular, es por esto que se encuentra en las bacterias aerobias.
- Hemolisina: Es una enzima presente en algunas bacterias, responsable de realizar la lisis de los glóbulos rojos (hemolisis), característica que aumenta su patogenicidad en algunos huéspedes.³⁹

4.5. Pruebas microbiológicas

Para la evaluación de los métodos de desinfección, es necesario conocer en primer lugar aquellos microorganismos contaminantes que se pueden encontrar en los micromotores, para esto existen diversos medios de cultivo que sirven para identificar diversas características de las bacterias y pruebas bioquímicas primarias que guían la identificación de los microorganismos:

4.5.1. Medios de cultivo

Es todo sustrato estéril líquido o sólido utilizado para el crecimiento, transporte o mantenimiento de microorganismos; en caso de ser utilizado para crecimiento debe contener los medios nutricios necesarios para la multiplicación bacteriana, ajustados a diversas características adecuadas para la sobrevivencia de la especie.⁴⁰

4.5.1.1. Medios de cultivo fundamentales

Mantienen el crecimiento de muchos microorganismos y principalmente se utiliza agar base y caldos peptonados.⁴⁰

4.5.1.2. Medios de cultivo mejorados

Se corresponden con los anteriores, pero se le añaden sustancias enriquecedoras como sangre.⁴¹ Este es el caso del Agar Sangre humana al 5%; al añadir esta sustancia se puede determinar la capacidad que tiene el microorganismo de producir hemólisis, es decir lisis o destrucción de eritrocitos de la sangre, mediante una enzima llamada hemolisina.⁴⁰ Otro ejemplo de este tipo de este tipo de medios es el Caldo Soya Trypticase, el cual es una combinación de dos peptonas, caseína y soya, componentes que mediante el suministro de

nitrógeno orgánico, aminoácidos y péptidos de cadena larga le hacen ser altamente nutricional, permitiendo el crecimiento y la multiplicación de un gran número de microorganismos. En el caso del Agar Soya Trypticase, al mismo Caldo Soya Trypticase se le puede añadir agar-agar al 1.5% para transformarlo en un medio sólido.⁴²

4.5.1.3. Medios de cultivo selectivos-diferenciales

Permiten el crecimiento de microorganismos específicos mediante uso de colorantes o nutrientes específicos para cada uno. Entre los ejemplos de medios selectivos encontramos el Agar MacConkey, en el cual se observa crecimiento de bacilos Gramnegativos.⁴⁰ Esta selección se logra mediante sales biliares y cristal violeta que inhiben a los microorganismos grampositivos, ya que estas precipitan por acción de ácidos. Además, se pueden diferenciar determinados microorganismos entéricos que fermentan o no la lactosa.⁴³

Otro medio de cultivo selectivo es el Agar Mitis Salivarius, que se utiliza para el crecimiento de varios estreptococos, principalmente de *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mitis* y *Enterococcus faecalis*, microorganismos que encontramos principalmente en la cavidad oral. Este medio contiene caseína, la que mediante su digestión enzimática proporciona aminoácidos, nitrógeno, carbono, minerales, vitaminas y otros nutrientes que sirven para el crecimiento de los microorganismos; además se le añade cristal violeta que inhibe el crecimiento de la mayoría de las bacterias grampositivo, excepto los estreptococos.⁴⁴

Entre estos medios también encontramos el Agar Telurito de Potasio; su funcionamiento consiste en que las bacterias con capacidad de tolerar y reducir el telurito de potasio producen colonias de color negro, mientras que la mayoría de los grampositivos no son capaces de crecer debido al efecto tóxico de este aditivo. Los microorganismos que este medio nos permite diferenciar son los del género *Enterococcus* y es en base a la reducción de telurito: si crecen colonias negras corresponde a *Enterococcus faecalis*, si la colonia crece, pero sin pigmento es *Enterococcus faecium* y para *Enterococcus casseliflavus* presenta una reacción

variable. La identificación de bacterias por este medio debe complementarse con otras pruebas.⁴⁵

El caldo cloruro de sodio al 6,5% se utiliza para diferenciar los Enterococos del grupo D, ya que interfiere en la permeabilidad de la membrana y los equilibrios osmóticos y electrocinéticos de los organismos no tolerantes a la sal.⁴⁶

Otra opción para realizar diferenciación e identificación bacteriana es el uso del Agar Bilis Esculina, que sirve para obtener una identificación presuntiva de estreptococos del grupo D, es decir, enterococos. Esto se logra al incorporar en el agar extracto y peptona de carne como compuesto nutritivo, además de esculina y bilis de buey; esta última inhibe el crecimiento de otros microorganismos, mientras que la esculina es hidrolizada por los enterococos, generando un color en el agar que va de verde oliva a negro.⁴⁷

4.5.2. Pruebas microbiológicas primarias

Comprenden reacciones para determinar la presencia de enzimas o de características básicas del microorganismo.⁴⁸ Entre estas encontramos:

4.5.2.1. Tinción de Gram

Facilita la observación de las bacterias y las divide en grampositivo y gramnegativo.⁴⁹ La diferencia principal entre ambas se encuentra en que la pared celular de las bacterias Gramnegativo está constituida por una capa fina de peptidoglicano y una membrana celular externa, mientras que las bacterias grampositivo poseen una pared celular gruesa constituida por peptidoglicano, pero no cuentan con membrana celular externa. La técnica consiste en que, con un asa en argolla estéril, se debe tomar una gota de agua destilada y llevarla a un

portaobjetos de vidrio; luego con la misma asa estéril se debe tomar una colonia y homogeneizar con el agua en el portaobjetos y dejar secar. Una vez que esto ocurra, se debe teñir la muestra durante 1 minuto con cristal violeta, el cual tiene afinidad por el peptidoglicano de la pared celular, después se debe lavar con agua de la llave, luego teñir 1 minuto con lugol, que al tener yodo forma un complejo con el cristal violeta, impidiendo la salida de este último de la pared bacteriana; se debe volver a lavar, después se debe decolorar la muestra con alcohol durante 30 segundos para deshidratar la pared bacteriana y cerrar los poros de la misma, además de destruir la membrana externa de las bacterias Gram negativa. Se realiza el último lavado y finalmente se tiñe durante 10 segundos con safranina que tiñe las bacterias que no pudieron retener el complejo cristal violeta-yodo, se lava y se espera el secado para observar al microscopio con aumento 100x.⁵⁰

4.5.2.2. Prueba de Oxidasa

Se utiliza para determinar la presencia de la enzima que lleva el nombre de la prueba. Esta enzima le sirve a la bacteria para utilizar el oxígeno y producir energía. Para realizarse se utiliza papel filtro impregnado en un reactivo y en Citocromo-C; este último se agrega porque en presencia de oxidasa, cambia la coloración del papel debido a la reducción del citocromo por el oxígeno e indica el resultado de la prueba.⁴⁹

4.5.2.3. Prueba de Catalasa

Sirve para la detección de la presencia enzima catalasa en la estructura de la bacteria; esta sirve como mecanismo de defensa del microorganismo contra las especies reactivas del oxígeno (ROS) y su función consiste en descomponer el peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua; cuando se pone en contacto la colonia bacteriana con una gota de peróxido de hidrógeno, se generan burbujas por la reacción, las cuales indican un resultado positivo de la enzima.⁵¹

4.5.3. Pruebas microbiológicas secundarias

4.5.3.1. Prueba de Coagulasa

Se utiliza principalmente para diferenciar *Staphylococcus aureus* de otros del mismo género bacteriano, ya que a diferencia de los demás, *S. aureus* es coagulasa positiva. Para realizar la prueba se debe depositar plasma sanguíneo en tubos de ensayo e inocular el microorganismo en el plasma; aquellas bacterias coagulasa positiva producen una enzima llamada plasmocoagulasa, la cual genera un coagulo en el plasma al inocular el microorganismo.⁴⁹

4.5.3.2. Prueba de Camp

Se realiza para identificar principalmente estreptococos del grupo B, que se encuentran en el tracto gastrointestinal y también *Listeria monocytogenes*, un bacilo grampositivo que se puede encontrar en la misma zona. Estos microorganismos producen una proteína llamada factor CAMP, la cual activa la beta lisina del *S. aureus*, mejorando su hemólisis. Para realizar la prueba se debe hacer una estría vertical con β lisina en Agar sangre y luego hacer estrías perpendiculares con las bacterias que se quieren evaluar; aquellas que son positivas generan una hemólisis en lazo de pajarita o punta de flecha.⁴⁹

5. METODOLOGÍA

5.1. Obtención de muestras

5.1.1. Toma de muestras

Previo a la obtención de las muestras, se preparó agua peptonada al 0,1%, Agar Plate-Count (para recuento bacteriológico) y Caldo Soya Trypticasa.

En 80 micromotores y contraángulos listos para ser utilizados en pacientes de las Clínicas Odontológicas de la Universidad de Talca y a punto de utilizarse en la atención del siguiente paciente, se determinó la presencia de microorganismos contaminantes. Para ello, una muestra de cada aparato fue obtenida utilizando una tórula estéril previamente humectada con agua peptonada al 0,1% estéril, la que fue frotada enérgicamente sobre la superficie del micromotor y contraángulo; la persona que tomó las muestras lo realizó con guantes de vinilo y cuidadosamente para no tocar la superficie antes de la toma de muestra. Las tóruas se mantuvieron en tubos con 4 ml de agua peptonada y se llevaron en menos de 30 minutos para su análisis. Posteriormente, cada una se utilizó para inocular diferentes medios de cultivos sólidos y líquidos.

5.1.2. Siembra de muestras

De cada tubo con 4 ml de agua peptonada que contenían las tóruas con cada muestra, se tomó 1 ml. para el recuento sin dilución (directo), 1 ml para el recuento con dilución al -1 y 2 ml. para un tubo con caldo soya donde además se dejó la tórula correspondiente.

Para realizar la dilución al -1, se homogeneizó el ml. de la muestra con 9 ml. de agua peptonada estéril y de aquí se obtuvo 1 ml para el recuento y 1 ml para realizar la dilución al -2 con la misma técnica que la anterior.

De la muestra directa y ambas diluciones se llevó 1 ml a la placa de Petri para el recuento bacteriano. Una vez que cada muestra fue depositada en las placas de Petri, estas fueron rellenadas con 20 ml de Agar Plate-Count a 45°C en estado líquido y se homogeneizaron en 4 sentidos; una vez solidificado el medio, se invirtieron las placas y se incubaron a 37°C por 48 horas, al igual que los tubos con caldo soya para evaluar el posible crecimiento del microorganismo en la cavidad oral de los pacientes.

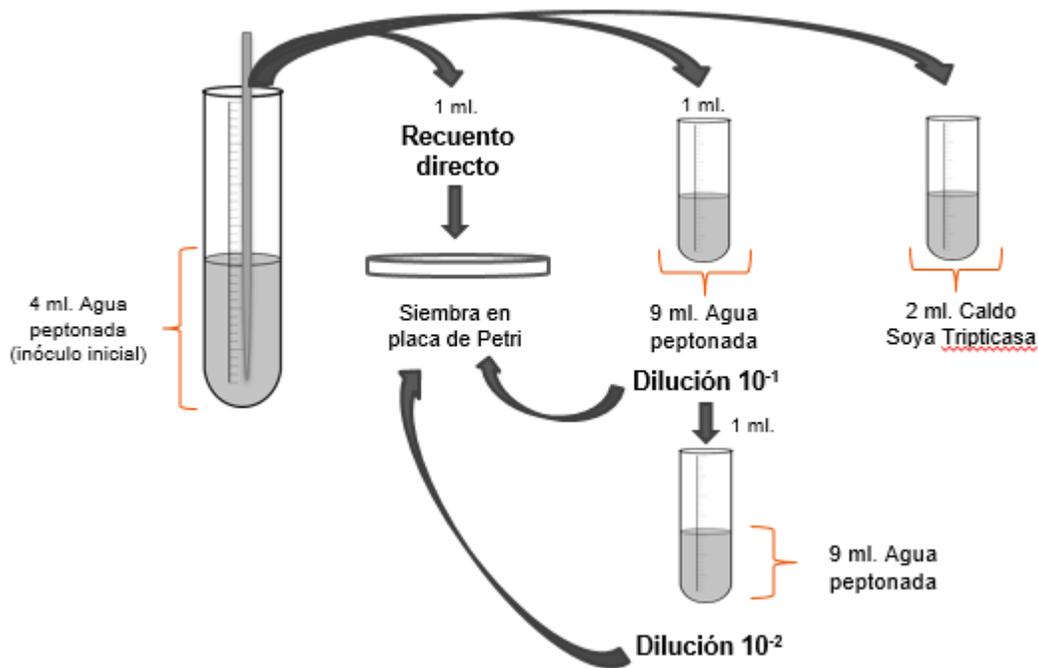


Figura 5: Mecanismo de siembra de muestras

5.2. Recuento de aerobios mesófilos (RAM)

5.2.1. Cálculo de superficie

Se determinó el área total del micromotor y contraángulo acoplados para realizarse posteriormente el cálculo de recuento en unidades formadoras de colonia (UFC) por cm². Para esto se dividieron los aparatos en cilindros y troncos de cono como indica la figura X. y luego se calcularon y sumaron sus áreas según las siguientes fórmulas:

$$\text{Área de cilindro: } 2 \pi r h + 2 \pi r^2$$

$$\text{Área de tronco de cono: } \pi [g (R+r) + R^2 + r^2]$$

5.2.2. Recuento de colonias bacterianas

Luego de las 48 horas, se realizó el recuento de todas las placas y en el caso de las que se contaron en dilución, se multiplicó por el factor de dilución correspondiente, según el siguiente esquema:



Figura 6: Esquema con pasos a seguir para el cálculo de RAM en unidades formadoras de colonia por cm².

5.3. Aislamiento e identificación bacteriana

5.3.1. Aislamiento bacteriano

Los tubos con caldo soya que fueron incubados a 37°C previamente, se sembraron en pentágono en placas de Agar Soya Trypticase y estos se incubaron a la misma temperatura anterior durante 24 horas. Pasado este tiempo se identificaron las distintas colonias bacterianas, se aislaron en otras placas y cada una fue descrita macroscópicamente (según su morfología) y rotulada.

5.3.2. Pruebas microbiológicas primarias y secundarias

Las colonias aisladas fueron sometidas a pruebas microbiológicas primarias y a partir de esto se realizó su identificación presuntiva. Las pruebas utilizadas fueron tinción de Gram, prueba de oxidasa, prueba de catalasa y prueba de hemolisina; además de su caracterización macroscópica.

5.3.2.1. Tinción de Gram

A cada microorganismo obtenido se le realizó esta prueba; una vez teñidas las muestras se observaron en el microscopio fueron con aceite de inmersión y un aumento de 100X para registrar los resultados.

Se consideró como grampositivo aquellas que se observaron de color morado y como Gramnegativo las que se tiñeron de color rosa o rojo; además se observó y describió su morfología microscópica y la distribución y organización.

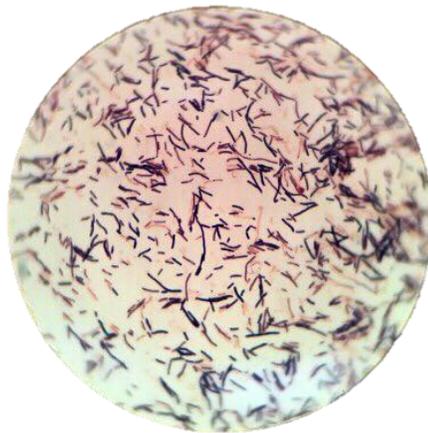


Figura 7: Bacilos grampositivos aislados de instrumental estudiado.

5.3.2.2. Prueba de catalasa

En un tubo de ensayo se preparó peróxido de hidrógeno al 3% (1 ml de peróxido de hidrógeno al 30% por 9 ml de agua destilada) y se depositaron gotas del peróxido de hidrógeno en portaobjetos con una pipeta Pasteur estéril de vidrio y con estos mismos instrumentos se llevó cada colonia aislada a las gotas del compuesto y se observó y registró la reacción. Se consideró como positivo aquella prueba que liberaba burbujas al depositar la colonia y como negativa cuando no liberaba burbujas.

5.3.2.3. Prueba de oxidasa

Los discos preparados para realizar este test se ubicaron sobre portaobjetos y con pipetas Pasteur estériles de vidrio se llevaron las colonias aisladas a los discos y se observó y registró el cambio de coloración de estos. Se consideró como positivo cuando el color del disco cambió de blanco a azul/morado y como negativo cuando no hubo cambio en la coloración.

5.3.2.4. Presencia de hemolisina

Se prepararon placas con Agar Sangre humano al 5% según las especificaciones del fabricante y en cada placa se sembraron las colonias aisladas del Agar Soya y se incubaron a 37°C por 24 horas; luego de este tiempo se observaron y registraron los resultados. Se consideró como hemólisis α aquella en que la colonia generó un halo de color verde en el medio de cultivo; hemólisis β cuando se produjo un halo completo alrededor de la colonia que permitía ver directamente hacia el otro lado de la placa de Petri; y hemólisis γ cuando las colonias bacterianas crecen sin generar ruptura de glóbulos rojos.

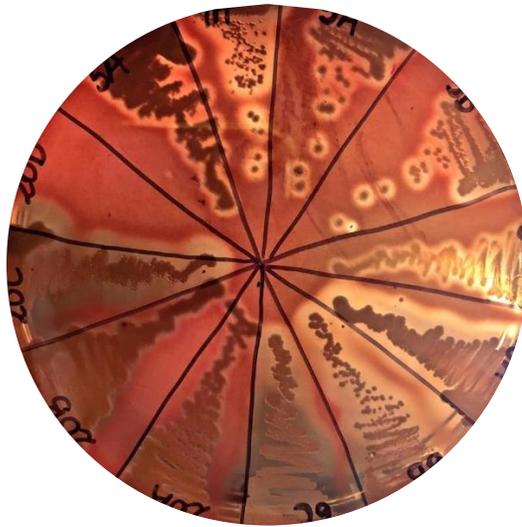


Figura 8: Resultados de prueba de hemolisina en Agar Sangre

5.3.2.5. Prueba de Coagulasa

Se distribuyeron 250 microlitros de plasma humano en tubos de ensayo estériles, luego en cada tubo se inoculó una bacteria cuyo Gram fuera cocáceas grampositivo en racimo, además

de un tubo control con *Staphylococcus aureus* y se dejaron los tubos incubando a 37°C durante 8 horas; aquellos que dieron negativo se dejaron durante 18 horas. Pasado el tiempo se revisaron los tubos y se consideraron positivos los que generaron un coágulo en el plasma.

5.3.2.6. Prueba de Camp

En placas con Agar Sangre de cordero se realizó una estría vertical con *S. aureus* beta lisina positivo y luego estrías perpendiculares a la anterior con bacilos grampositivos en empalizada. Se dejaron las placas incubando por 24 horas a 37°C y se consideraron como Camp positivas aquellas bacterias que produjeron hemólisis en la intersección con la β lisina.

5.3.3. Identificación bacteriana con medios de cultivo selectivos-diferenciales

5.3.3.1. Siembra en Agar McConkey

Se prepararon placas con el medio de cultivo según indicaciones del fabricante y se sembraron solo los bacilos gramnegativo según el test de Gram. Se incubaron a 37°C durante 24 horas y posterior a esto se observó que colonias crecieron.

5.3.3.2. Siembra en Agar Mitis Salivarius

Se prepararon placas con Agar Mitis Salivarius según especificaciones del fabricante y se dividieron las placas en 8 secciones. Las bacterias que se sembraron en este medio de cultivo fueron Cocáceas grampositivo con prueba de oxidasa y catalasa negativas. Una vez que se sembraron todas las placas, se incubaron a 37°C por 24 horas y al pasar ese tiempo se registraron aquellas cepas que si crecieron en el medio.



Figura 9: Resultados de siembra en Agar Mitis Salivarius

5.3.3.3. Siembra en Agar Telurito de Potasio

Se obtuvieron placas comercializadas con este medio de cultivo y se dividieron en secciones para sembrar en cada una de ellas una cepa de las que crecieron en el Agar Mitis Salivarius. Se incubaron durante 24 horas a 37°C y al pasar el tiempo se registró el color de las colonias que crecieron.

5.3.3.4. Siembra en Caldo de cultivo Cloruro de Sodio al 6,5%

El caldo fue preparado según lo indica el fabricante y se distribuyó en tubos de ensayo estériles; se llevaron las colonias bacterianas que crecieron en el Agar Mitis Salivarius con tómulas estériles y se dejaron en el caldo incubando a 37°C durante 24 horas. Una vez transcurrido el tiempo se registraron las colonias que crecieron en el caldo.

5.3.3.5. Siembra en Agar Bilis Esculina

Se siguió con las instrucciones del fabricante para la preparación del Agar, luego este se llevó a tubos de ensayo estériles y en cada uno de ellos se sembró con tómulas estériles un

microorganismo que se encontrara en el Agar Mitis Salivarius. Luego de incubarlos 24 horas a 37°C se observó y registró el crecimiento bacteriano en Bilis Esculina.

5.3.4. Identificación bacteriana con sistema semi-automatizado

Para la identificación de bacilos gramnegativos que crecieron en Agar McConkey, se utilizó el sistema semi-automatizado Microscan autoSCAN-4 de la empresa Valtek.



Figura 10: Placa con resultados de sistema semi-automatizado

5.4. Extracción de productos bioactivos

5.4.1. Selección de productos

Se realizó una revisión bibliográfica que tuvo como objetivo conocer propiedades antimicrobianas de diversos productos de origen natural; a raíz de esta se seleccionaron los siguientes:

- Cebolla (*Allium cepa*): obtenida de la Región del Maule, en la zona rural de Talca.
- Ajo (*Allium sativum*): obtenido de la Región del Maule, en la zona rural de Talca.
- Manzanilla (*Chamaemelum nobile*): comprada en formato seco para infusiones en Talca.
- Menta (*Mentha*): comprada en Supermercado Tottus.
- Limón (*Citrus aurantiifolia*): cultivado en la Región del Maule, en la zona urbana de Talca. Para el estudio de este producto, se obtuvieron sus productos bioactivos de la cáscara y la pulpa por separado.
- Cardamomo (*Elettaria cardamomum*): obtenido de la Región del Libertador General Bernardo O'Higgins, en la zona rural de Rancagua.
- Eucalipto (*Eucalyptus*): se obtuvo de la Región del Maule, específicamente de aquel que crece en los alrededores de Iloca.
- Romero (*Rosmarinus officinalis*): obtenido de la Región del Maule, en la zona urbana de Linares.
- Boldo (*Peumus boldus*): obtenido de la Región del Maule, en la zona urbana de Linares.

5.4.2. Extractos acuosos

Se realizó el lavado de todos los productos seleccionados, se maceraron, pesaron y reservaron en placas de Petri; todos estos procedimientos en condiciones estériles.⁵²

Cada producto, previamente pesado, se llevó a un matraz de Erlenmeyer estéril, donde se mezcló con agua destilada en una proporción que fue de 1:2 a 1:10 dependiendo del producto utilizado. Luego se dejaron los matraces el baño termoregulado con agitación sumergidos en agua a 60°C a 100 rpm durante 1 hora; después se llevaron a una agitadora Tecnigen a 100 rpm a temperatura ambiente durante 24 horas.⁵³



Figura 11: Preparación de compuestos bioactivos en mezcladora

Posteriormente se filtró usando papel absorbente y lo obtenido se dejó secar en placas de Petri a 37°C hasta evaporar todo el líquido.⁵³ Se obtuvieron los extractos secos y de cada uno se pesaron 0,2 mg. que se disolvieron en 9 ml. de agua destilada y 1 ml. de dimetilsulfoxido al 10% (DMSO). Esto se mantuvo refrigerado a 15-°C.⁵⁴



Figura 12: Filtración de extractos con papel

5.4.3. Extractos etanólicos

Se realizó el lavado de todos los productos seleccionados, se maceraron, pesaron y reservaron en placas de Petri; todos estos procedimientos en condiciones estériles.⁵²

Cada producto, previamente pesado, se llevó a un matraz de Erlenmeyer estéril, donde se mezcló con etanol al 96% en la misma proporción que los extractos acuosos según cada producto. Luego se dejó en la mezcladora a 100 rpm durante 24 horas a temperatura ambiente y posteriormente se filtró usando papel absorbente y lo obtenido se dejó secar en placas de Petri a 37°C hasta evaporar todo el líquido. Se obtuvieron los extractos secos y de cada uno se pesaron 0,1 mg. que fueron disueltos en 1 ml. de dimetilsulfoxido (DMSO) al 10% y 9 ml. de agua destilada. Esto se mantuvo refrigerado a -15°C.⁵⁴

5.5. Pruebas de susceptibilidad en desinfectantes de uso frecuente y compuestos bioactivos

5.5.1. Screening de compuestos bioactivos

De un total de 202 colonias bacterianas aisladas, se seleccionó una muestra aleatoria de 20 y se tomaron con una tórula estéril que fue depositada en un tubo con 2 ml de Caldo Soya para preparar el estándar 0,5 McFarland medido en espectrofotómetro (absorbancia entre 0,05 y 0,1). Posteriormente se sembró en césped cada cepa en dos placas de Agar Soya Trypticase con 12 pocillos de 6 mm. de diámetro; estos se requerían para probar 10 compuestos bioactivos acuosos y etanólicos, un control positivo y un control negativo.

Una vez sembrados los microorganismos, en cada pocillo se depositaron 50 microlitros de cada uno de los extractos y de glutaraldehído para el control positivo y agua estéril para el control negativo.

Se dejaron las placas incubando a 37°C durante 24 horas y luego se midieron los halos de inhibición que logró cada compuesto.

Se midieron solo las placas que cumplían con los siguientes criterios de inclusión:

- Crecimiento bacteriano visible.
- Sin presencia de contaminación bacteriana o micótica en los pocillos.
- Control positivo y negativo correctos.
- Halos de inhibición claros y medibles.

De las placas que se midieron, se seleccionaron aquellos que generaron halos de inhibición en alguna de las cepas para continuar trabajando con estos durante el estudio.



Figura 13: Placa con screening de compuestos bioactivos

5.5.2. Análisis de la actividad antimicrobiana de productos químicos

Para las 202 muestras de bacterias se preparó una placa con Agar Soya Tripticasa con 8 pocillos para probar los siguientes productos químicos: Alcohol al 95%, Alcohol al 70%, Amonio cuaternario, Clorhexidina al 2%, Hipoclorito de sodio al 5%, Glutaraldehído, CaviCide, Agua estéril (control negativo). Para cada producto se seleccionó una letra del abecedario y las placas se rotularon con estas para llevar a cabo el experimento.

Producto químico	Código
Clorhexidina 2%	A
Alcohol 70%	B
Hipoclorito de sodio 5%	C
Glutaraldehído	D
Amonio cuaternario	E
Alcohol 95%	F
CaviCide	G
Agua estéril (control negativo)	-

Tabla 1: Codificación de desinfectantes químicos de uso común

Para cada cepa se realizó un inóculo en Caldo Soya con el estándar de McFarland al 0.5 y estas se sembraron en las placas correspondientes con técnica de césped. Luego de esto se depositaron en los pocillos correspondientes 50 microlitros de cada producto con una micropipeta.

Se dejaron incubar las placas durante 24 horas y posterior a este tiempo se midieron y registraron los halos de inhibición, considerando que se cumplieran con los mismos criterios de inclusión descritos en el punto anterior; se repitieron aquellas pruebas que no cumplían con todos estos.

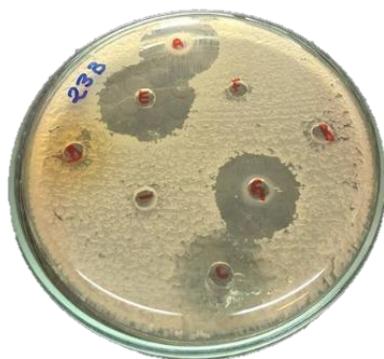


Figura 14: Placa con halos de inhibición generados por productos químicos

5.5.3. Análisis de la actividad antimicrobiana de productos bioactivos

Para cada cepa de bacterias se preparó una placa con Agar Soya Tripticasa con 12 pocillos para los compuestos bioactivos seleccionados previamente y los controles. A cada compuesto se le asignó un número o letra que fue rotulado en las placas para su estudio.

Compuesto bioactivo	Código
Ajo etanólico	I
Cardamomo etanólico	II
Boldo etanólico	III
Romero etanólico	IV
Eucalipto etanólico	VII
Manzanilla etanólico	VIII
Romero acuoso	A
Cardamomo acuoso	B
Eucalipto acuoso	C
Glutaraldehído (control positivo)	+
Agua estéril (control negativo)	-

Tabla 2: Codificación de compuestos bioactivos

Para cada cepa se realizó un inóculo de Caldo Soya con el estándar de McFarland al 0.5 y estas se sembraron en las placas correspondientes con técnica de césped. Luego de esto se depositaron en los pocillos correspondientes 50 microlitros de cada producto con una micropipeta.

Se dejaron incubar las placas durante 24 horas y posterior a este tiempo se midieron y registraron los halos de inhibición, considerando que se cumplieran con los mismos criterios de inclusión descritos anteriormente; se repitieron aquellas pruebas que no cumplían con todos estos.



Figura 15: Placa con halos de inhibición generados por compuestos bioactivos

5.6. Comparación de actividad antimicrobiana

Teniendo todas las medidas de los halos de inhibición, tanto de compuestos bioactivos como de productos químicos, se seleccionaron aquellos compuestos bioactivos con mayor actividad antimicrobiana (halos de mayor diámetro) y se calculó la media aritmética de todos sus halos de inhibición; lo mismo se hizo con los siete productos químicos que se utilizaron en las pruebas.

Posteriormente, se realizó la comparación de las medias aritméticas entre:

- Compuesto bioactivo y producto químico con mayor halo de inhibición.
- Compuesto bioactivo con mayor y producto químico con menor halo de inhibición.
- Compuesto bioactivo con mayor halo de inhibición y producto químico menos tóxico.

Todas estas comparaciones se evaluaron estadísticamente utilizando una prueba de análisis de varianza unidireccional a un nivel de significación de $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1. Recuento de colonias bacterianas por placa

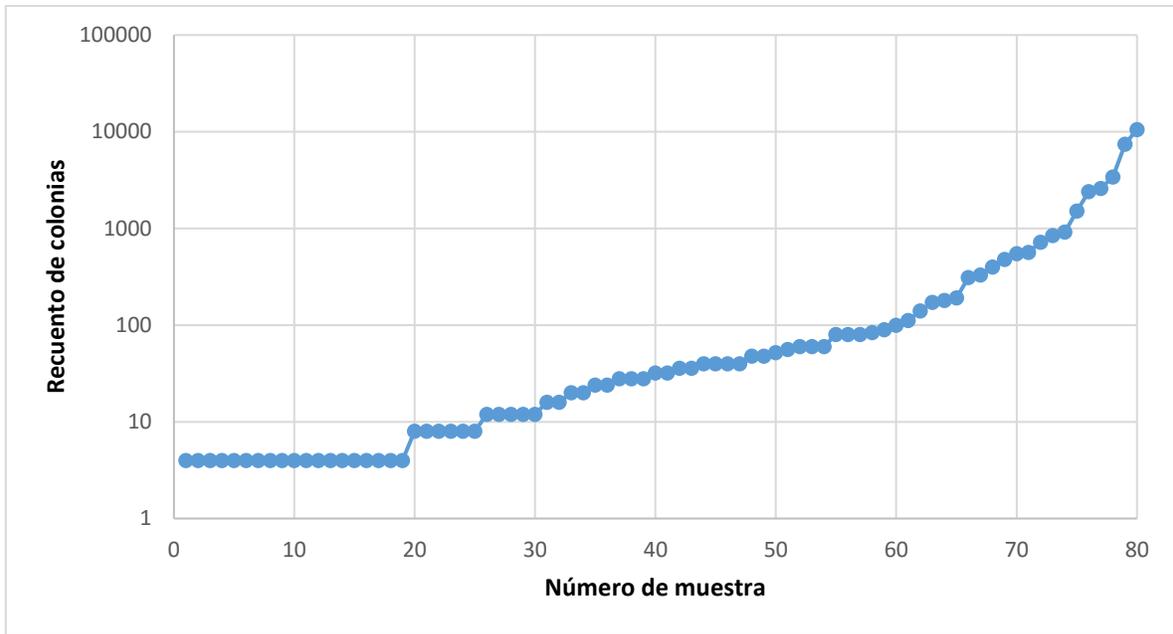


Figura 16: Recuento de colonias por placa

En la figura 16 se observa la cantidad de colonias bacterianas que se obtuvo en cada una de las 80 muestras obtenidas.

6.2. Recuento de aerobios mesófilos (RAM) por superficie

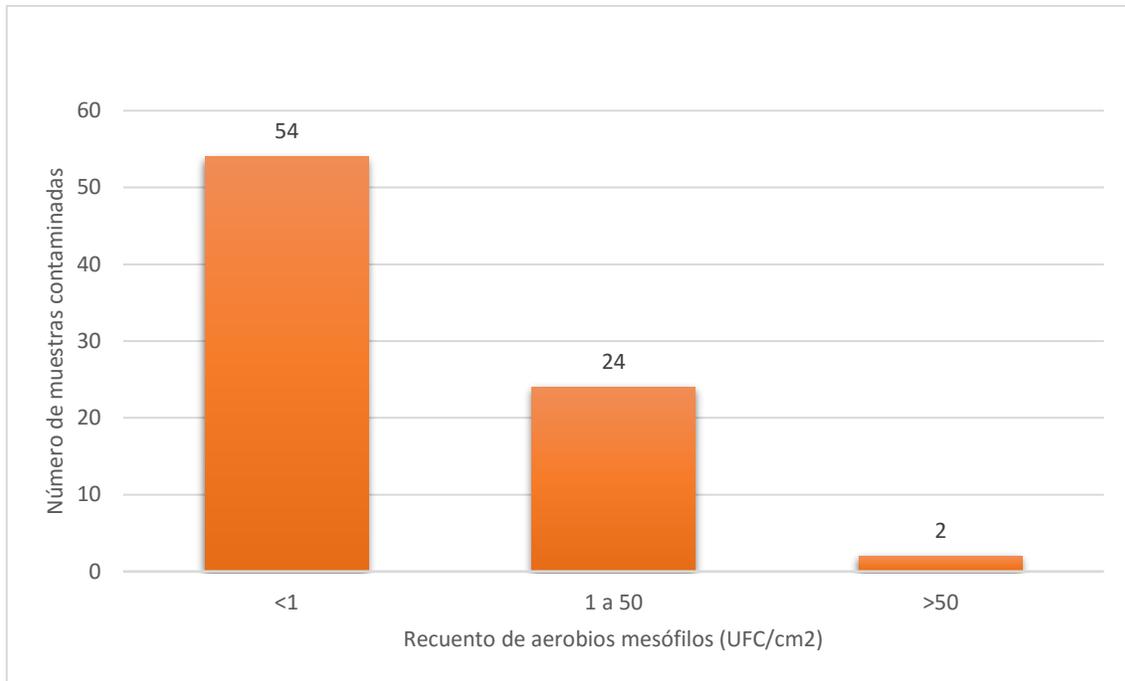


Figura 17: Recuento de aerobios mesófilos

El gráfico muestra el recuento expresado en Unidades formadoras de colonias por centímetro cuadrado en las 80 muestras obtenidas de micromotores y contrángulos recién utilizados en las Clínicas Odontológicas de la Universidad de Talca.

6.2. Microorganismos aislados agrupados según Tinción Gram

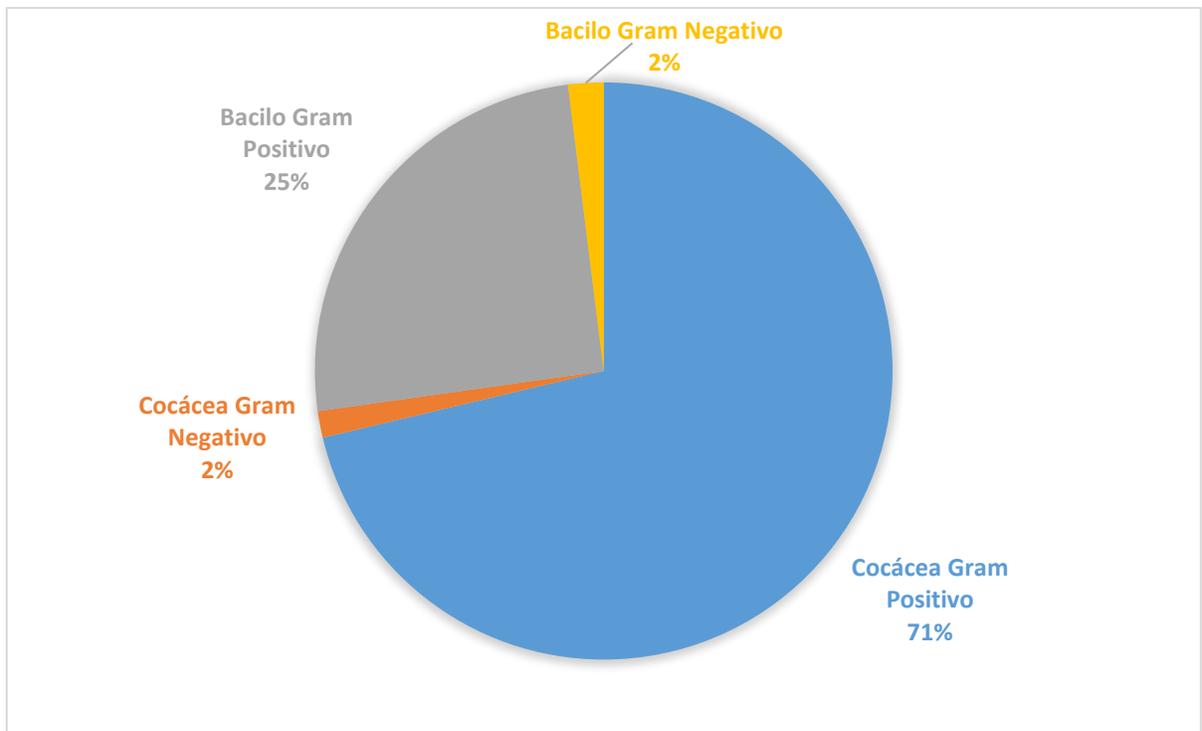


Figura 18: Microorganismos según tinción Gram

De las 80 muestras obtenidas, se aislaron 202 colonias bacterianas distintas. El gráfico muestra la distribución de microorganismos aislados de todas las muestras obtenidas, según su Tinción Gram.

6.3. Microorganismos agrupados según pruebas microbiológicas primarias

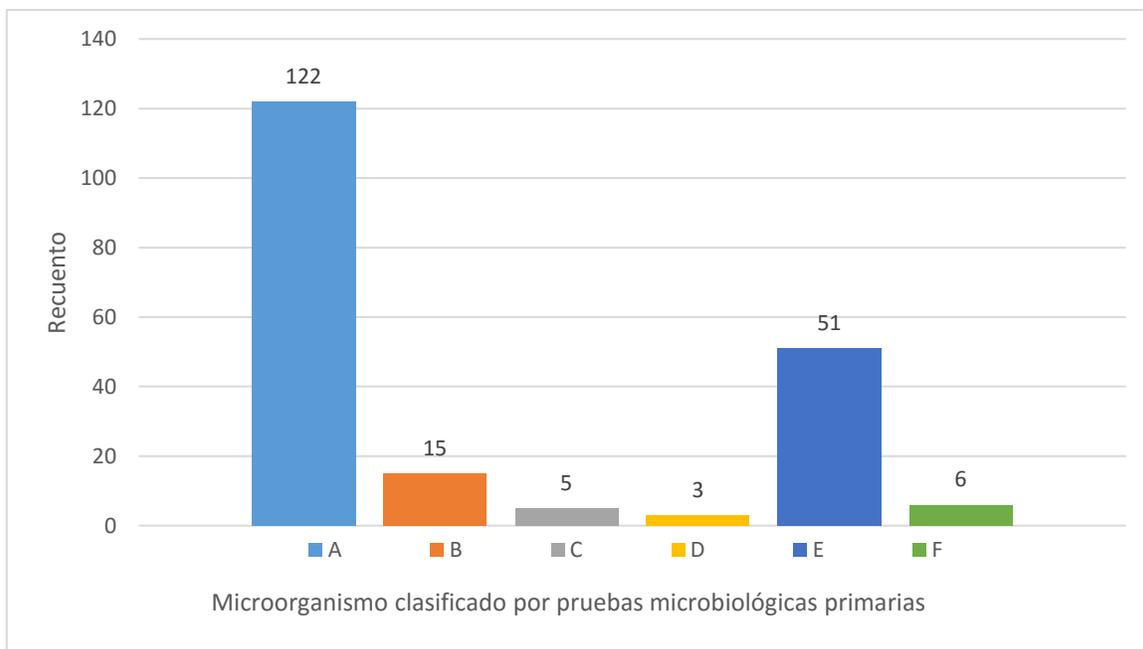


Figura 19: Microorganismos según pruebas microbiológicas primarias

En el gráfico se observa la distribución de los 202 microorganismos aislados según su tinción de Gram, prueba de catalasa y oxidasa; a cada grupo de microorganismos se le asignó un código en base a sus resultados:

- A) Cocácea grampositivo (CGP), Catalasa positiva (C+), Oxidasa negativa (O-)
- B) CGP, C (-), O (-)
- C) CGP, C (+), O (+)
- D) Cocácea gramnegativo (CGN), C (+), O (+)
- E) Bacilo grampositivo (BGP)
- F) Bacilo gramnegativo (BGN)

6.4. Identificación de microorganismos

Tabla 3. Número de cepas de microorganismos aislados según método de identificación.

Mecanismo de identificación	Número de microorganismos	Microorganismo aislado
Sistema semi-automatizado	2	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
	4	<i>Citrobacter freundii</i>
Gram e información macroscópica	2	Levaduras ambientales
Gram (CGP), Catalasa (+) y Oxidasa (-)	122	<i>Staphylococcus</i> spp
Gram (CGP), Catalasa (+), Oxidasa (-) y Coagulasa (+)	2	<i>Staphylococcus aureus</i>
Gram (CGP), Catalasa (-), Oxidasa (-) y medio de cultivo Agar Mitis Salivarius	9	No enterococos
Medios de cultivo: Caldo NaCl 6,5% y Bilis Esculina	6	<i>Enterococcus faecalis</i>

En la tabla se observan los resultados de los microorganismos que se identificaron, según el mecanismo utilizado para ello.

6.5. Actividad antimicrobiana de productos químicos

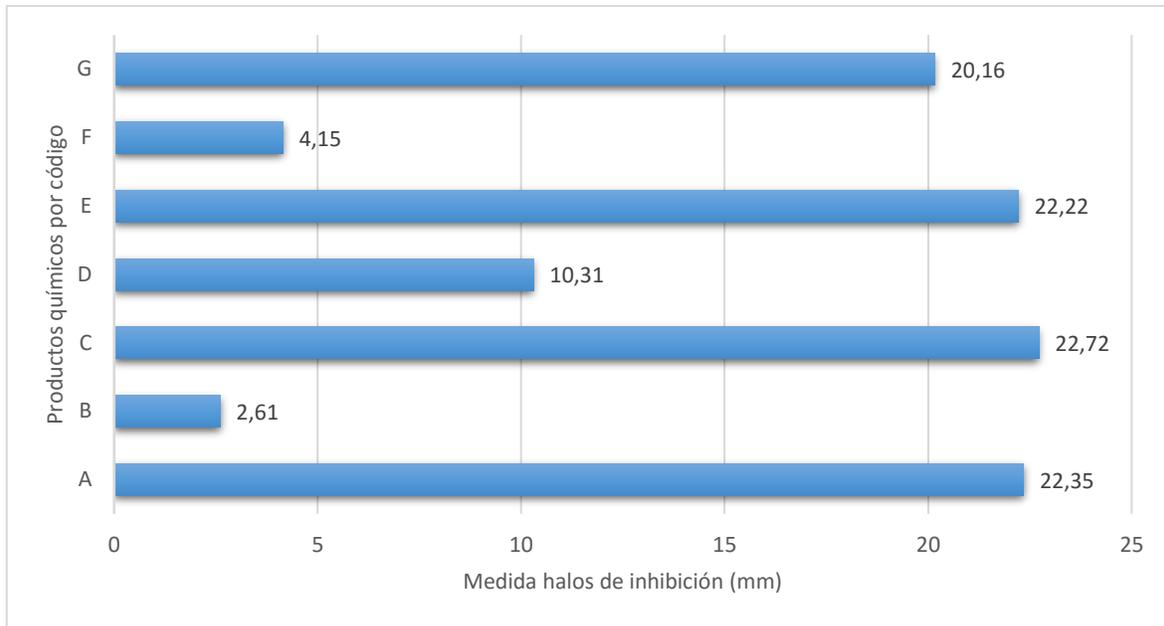


Figura 20: Actividad antimicrobiana de productos químicos

En la figura 20, se observa la actividad antimicrobiana de productos químicos según el promedio de sus halos de inhibición para todos los microorganismos aislados del instrumental odontológico. La codificación de los productos se encuentra en la Tabla 1 (página 45).

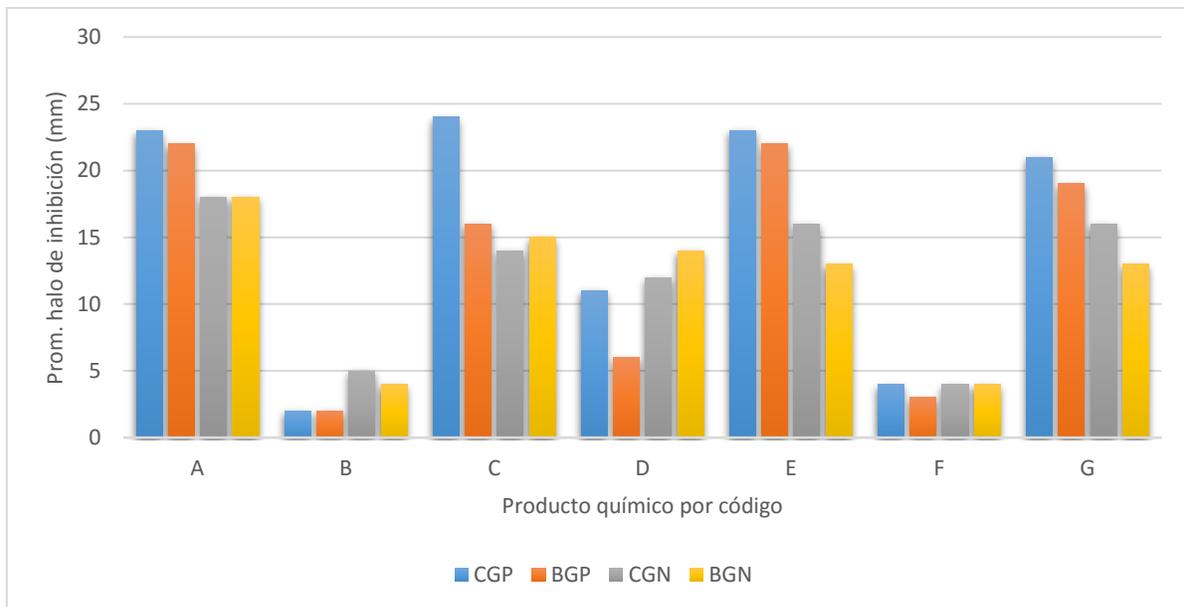


Figura 21: Actividad antimicrobiana de productos químicos en microorganismos agrupados según Tinción Gram.

Se observan los promedios de halos de inhibición generados por productos químicos, distribuidos en sus resultados para:

- *Cocácea Grampositivo (CGP)*
- *Bacilos Grampositivo (BGP)*
- *Cocáceas Gramnegativo (CGN)*
- *Bacilos Gramnegativo (BGN)*

6.6. Actividad antimicrobiana de compuestos bioactivos

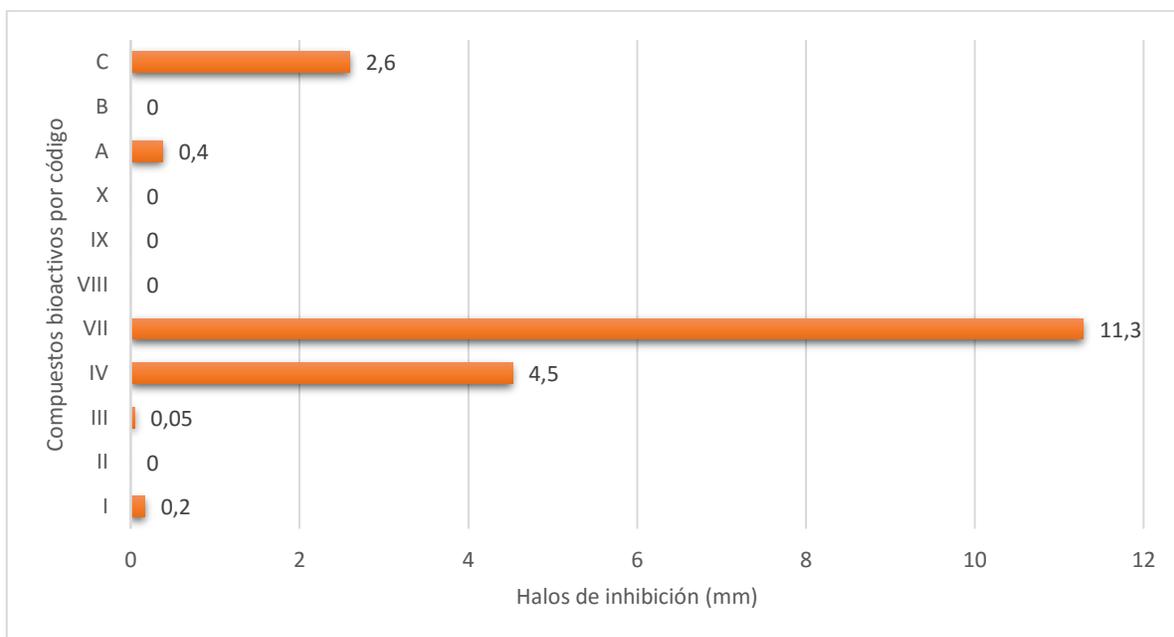


Figura 22: Actividad antimicrobiana de compuestos bioactivos

En la Figura 21, se pueden observar los promedios de halos de inhibición generados por compuestos bioactivos en todas las bacterias aisladas de las muestras de micromotores y contrángulos. La codificación de los compuestos bioactivos se encuentra en la Tabla 2 (página 46).

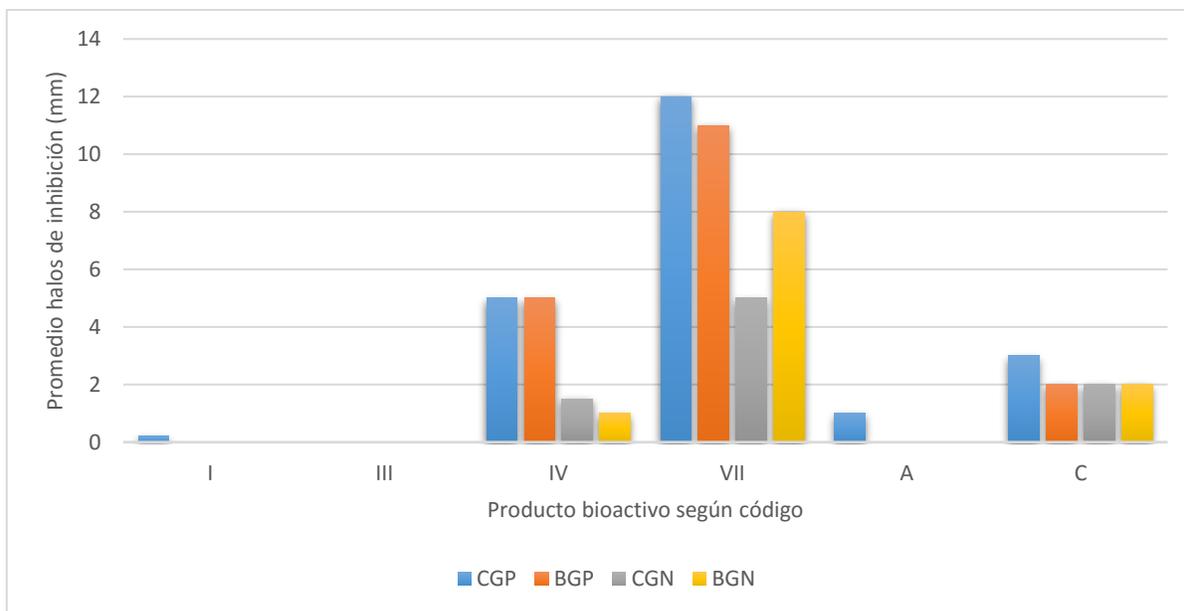


Figura 22: Actividad antimicrobiana de productos bioactivos en microorganismos agrupados según Tinción Gram.

Se descartaron los compuestos bioactivos cuyo promedio de halo de inhibición fue cero y se graficaron aquellos que sí tuvieron actividad, dividiendo además lo microorganismos estudiados según Gram:

- Cocáceas Grampositivo (CGP)
- Bacilos Grampositivo (BGP)
- Cocáceas Gramnegativo (CGN)
- Bacilos Gramnegativo (BGN)

6.7. Comparación de Actividad antimicrobiana de productos químicos y bioactivos

Tabla 4: Comparación entre el producto químico y compuesto bioactivo con mayor halo de inhibición.

Criterio de comparación	Compuesto	Promedio halo inhibición	Valor p
Compuesto bioactivo con mayor halo de inhibición	Extracto de eucalipto etanólico	11,3 mm	1,6157⁻³⁶ p<0,05
Producto químico con mayor halo de inhibición y más toxico	Hipoclorito de sodio al 5%	22,72 mm	

En la tabla 4 se realiza la comparación entre el mejor compuesto bioactivo, que a su vez es el más tóxico de los estudiados, y el mejor producto químico según promedio de sus halos de inhibición y se calcula la significancia de la comparación según valor p, siendo el Hipoclorito de sodio significativamente mejor que el extracto etanólico de eucalipto en los microorganismos aislados.

Tabla 5: Comparación entre el compuesto bioactivo con mayor halo y el producto químico con menor halo de inhibición.

Criterio de comparación	Compuesto	Promedio halo inhibición	Valor p
Compuesto bioactivo con mayor halo de inhibición	Eucalipto etanólico	11,3 mm	1,40859⁻³⁶ p<0,05
Producto químico con menor halo de inhibición	Alcohol al 70%	2,61 mm	

En la tabla 5, se muestra la comparación entre el mejor producto bioactivo y el peor compuesto químico según sus halos de inhibición y se calcula significancia según valor p, teniendo medidas significativamente mayores el extracto etanólico de eucalipto que el alcohol al 70% en las pruebas realizadas en los microorganismos aislados de micromotores y contrángulos.

Tabla 6: Comparación de compuesto bioactivo con mayor halo de inhibición y producto químico con menor toxicidad.

Criterio de comparación	Compuesto	Promedio halo inhibición	Valor p
Compuesto bioactivo con mayor halo de inhibición	Eucalipto etanólico	11,3 mm	2,07757⁻²⁶ p<0,05
Producto químico con menor toxicidad	Alcohol (independiente de la concentración)	4,15 mm (al 95%)	

En la tabla 6 se compara el mejor compuesto bioactivo según su halo de inhibición con el producto químico de menor toxicidad y ecotoxicidad e indica el valor p para evaluar su significancia. Se obtiene como resultado que el extracto de eucalipto etanólico es significativamente mejor que el alcohol al 95% según su actividad antimicrobiana en las bacterias estudiadas.

7. DISCUSIÓN

7.1. Recuento de microorganismos

Luego de la toma de muestras, se pudo observar la presencia de colonias bacterianas en los micromotores y contraángulos estudiados, obteniéndose como resultado que todos ellos tenían microorganismos en su superficie, los cuales pudiesen provenir del ambiente, de la piel o guantes del operador, de la cavidad oral de los pacientes u otro tipo de contaminación que fuese externa al ambiente clínico y que, por lo tanto, no debiese estar presente en este instrumental. Si bien se observó presencia de bacterias en todos los aparatos, para que el recuento de aerobios mesófilos (RAM) se considere positivo, su valor debe ser de 1 o más unidades formadoras de colonias por centímetro cuadrado (UFC/cm²), según se indica en el manual de microbiología de Prescott,⁴⁰ quien no clasifica el tipo de RAM para diferentes ambientes, por lo que esta sería una medida que no necesariamente es compatible con lo que debiese encontrarse en un área clínica, sin embargo, al no existir un estándar del recuento para este tipo de superficies o ambientes, se pudiese utilizar lo indicado por Prescott.

En base a lo anterior, 26 de los 80 aparatos evaluados presentaron un recuento de microorganismos positivo, es decir un 32,5%; cifra que, a pesar de ser inferior a la mitad, es preocupante ya que permite cuestionarse si realmente las medidas de bioseguridad están funcionando o si se requieren nuevos protocolos o productos de desinfección que permitan un uso más seguro y adecuado de este instrumental. Si bien las normas técnicas de esterilización y desinfección para entidades de salud como el MINSAL, no indican que este material deba ser esterilizado, tampoco mencionan como debe manipularse para evitar la presencia y transmisión de microorganismos.³

En cuanto a los aparatos que presentaron recuento positivo (≥ 1 UFC/cm²), todos estos se encontraban preparados para ser utilizados en pacientes del Centro de Clínicas Odontológicas de la Universidad de Talca (CCO), el cual cuenta con su propio manual de control de infecciones; el que indica la “desinfección de todas las superficies con Amonio Cuaternario” al preparar el box y recomienda la “limpieza de restos orgánicos y biomateriales odontológicos notorios con algodón y agua o alcohol”, esto debe realizarse luego del uso entre pacientes, sin embargo, no especifica si los insumos utilizados en conjunto con los desinfectantes deben estar estériles, la técnica que se debe utilizar para realizar la limpieza de los instrumentos, el tiempo que se requiere para su desinfección ni la base teórica para la utilización de esos productos químicos.⁵⁵ Por otra parte, en el Manual del CCO se habla de desinfección de superficies, sin embargo, el MINSAL define desinfección como “eliminación de carga microbiana”, y en el caso de la desinfección de bajo nivel como “proceso de eliminación a través de productos químicos de formas vegetativas de bacterias, algunos hongos y virus lipídicos, sin tener efecto sobre micobacterias y esporas”, lo anterior quiere decir que en una superficie desinfectada no debiesen haber bacterias, pero según se pudo ver en el recuento, todos los aparatos tenían presencia de microorganismos, es decir que no se estaría cumpliendo con lo indicado en la normativa y, según este estudio, se está dando atención a pacientes con instrumental en el cuál no se han logrado los estándares de desinfección esperados.

Por otra parte, realizar la limpieza del micromotor y contrángulo con agua, en cualquier centro que preste atención odontológica, puede ser contraproducente, ya que existen diversos estudios que demuestran la presencia de microorganismos que pudiesen ser patógenos para el paciente en las conexiones por las que llega el agua a la unidad dental, por ejemplo, según lo que en 2016 estudió Lizon⁵⁶, se observaron en las conexiones de agua, recuentos de hasta 300 UFC/ml, además, de presencia de microorganismos patógenos como *Legionella pneumophila* y *Pseudomonas aeruginosa*; esta información, además, se condice con el estudio de Abdouchakour en 2015,⁵⁷ quien también detectó *Pseudomonas aeruginosa* en el agua que llega a sillones dentales, además de otras bacterias oportunistas. En base a lo anterior y a los resultados obtenidos en el presente estudio, sería necesario evaluar la

presencia de bacterias en las conexiones de agua del CCO, las que pudieran resultar contaminantes, además de patógenas, para los pacientes tratados. En este contexto, se debieran utilizar mecanismos para desinfectar las vías que llevan el agua al sillón y a todo el box dental, manteniendo, de esta manera un adecuado control microbiológico.

Considerando los resultados de las pruebas realizadas, en las que se obtuvieron, principalmente, bacterias cocáceas grampositivo en racimo, catalasa positiva y oxidasa negativa, cuya clasificación primaria indicaría que pertenecen al género *Staphylococcus*, lo que se repitió en diversos instrumentales, se podría pensar que se está frente a contaminación producida por manipulación de los instrumentos (transferencia por microbiota de la piel) o por microorganismos del medio ambiente. Este tipo de microorganismos no debiese interferir con la microbiota normal del paciente, sin embargo, según estudios realizados por Marsh,⁵⁸ si la contaminación ambiental supera el umbral que el huésped puede tolerar, lo que dependerá del estado de su sistema inmune. Estas bacterias podrían generar una disbiosis en la cavidad oral por competitividad entre microorganismos. En base a esto, en los resultados obtenidos existen casos preocupantes, ya que el recuento de microorganismos, además de ser positivo, se encuentra más elevado que en la mayoría de las muestras. Según la información planteada y sin siquiera conocer la patogenicidad o factores de virulencia de los microorganismos detectados, se pudiese llegar a producir disbiosis oral lo que podría inducir a patologías dentales o periodontales.

7.2. Identificación y patogenicidad de microorganismos

En esta investigación, a partir de contraángulos y micromotores utilizados en el CCO, se detectaron enterococos que provienen del tracto gastrointestinal de humanos y animales. Estos microorganismos son nocivos para la salud de las personas, al igual que los bacilos gramnegativos fermentadores y no fermentadores como algunos coliformes fecales o *C. freundii*, respectivamente.

Dentro de las especies más patógenas que se encontraron, se encuentra *Enterococcus faecalis*. Esta corresponde al género *Enterococcus* siendo una cocácea grampositivo y fermentativa. Principalmente podemos encontrarla en conductos radiculares con infección persistente por fracasos endodónticos. Como también, ha sido posible aislarla, en menor medida, desde infecciones endodónticas primarias. Se ha visto que está más asociada a patologías asintomáticas que a sintomáticas. Con respecto a si es un patógeno involucrado en la etiología de los fracasos endodónticos o si es simplemente un colonizador que aprovecha las condiciones del ambiente dentro de los conductos radiculares obturados, los estudios no son concluyentes.⁵⁹ Estos enterococos también se pueden encontrar abundantemente en las heces humanas y son responsables del 5 al 20% de endocarditis adquirida en la comunidad.⁶⁰ Una característica de esta especie bacteriana es que es poco resistente a variaciones de pH, por lo que para colonizar debe mantenerse en un pH neutro. También se ha visto que puede resistir los altos niveles de hidróxido de calcio.⁶¹

Los enterococos son microorganismos son capaces de transmitir muy velozmente sus mecanismos de resistencia, por lo tanto, pueden adquirir genes de virulencia, muy rápidamente, a través de plásmidos, intercambio cromosómico, además de poseerlos de forma intrínseca, siendo más difíciles de tratar.⁶²

Otra la de las bacterias más nocivas que se observó fue la *Citrobacter freundii*, la cual está comúnmente involucrada en enfermedades respiratorias, infecciones del tracto urinario,

infecciones intraabdominales, meningitis y bacteriemia adquirida en hospitales. Esta bacteria también proviene del tracto digestivo, y es muy resistente a múltiples antimicrobianos.⁶³

Stenotrophomona maltophilia es un bacilo gramnegativo no fermentador, y al igual que las bacterias mencionadas anteriormente, está asociada a infecciones intrahospitalarias de importancia en pacientes de alto riesgo, pudiendo generar bacteremias, infecciones urinarias y neumonía, siendo esta última la que presenta mayor mortalidad y la segunda causa de hospitalización en la UCI.⁶⁴ Estas bacterias tienen baja sensibilidad a un gran número de antibióticos, por lo que son de difícil manejo, y más aún si el paciente presenta un sistema inmune deprimido. Esta bacteria puede permanecer de forma crónica en los pulmones como un colonizador silencioso o invadir distintos tejidos, pudiendo ocasionar shock séptico y muerte.⁶⁵

Una persona portadora de estos microorganismos puede diseminarlos fácilmente, si no se siguen correctamente las normas de bioseguridad. Además, haberlas encontrado indica riesgo de que existan otras bacterias del mismo tipo. Si se encuentran este tipo de bacterias puede indicar una conducta repetitiva.⁶⁶

Como resultado de este estudio también se detectó *Staphylococcus aureus*, siendo esta una cocácea grampositivo, cuyo hábitat natural es principalmente la cavidad nasal y sus mucosas, por lo cual es más fácil su transmisión de esta hacia el instrumental que se utiliza en la cavidad oral. Esta especie está involucrada en diversas enfermedades desde infecciones cutáneas, hasta celulitis o abscesos profundos. Recientemente, Garbacz, reportó cepas de *Staphylococcus aureus* en estomatitis protésica, cuadro infeccioso cuya etiología es principalmente vinculada a *Candida albicans*.⁶⁷

7.3. Actividad antimicrobiana de productos químicos y bioactivos

Se pudo observar que los productos químicos utilizados en el estudio logran una mejor desinfección que los compuestos bioactivos probados sobre los microorganismos aislados de micromotores y contrángulos. Existe una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre la actividad del hipoclorito de sodio al 5% (NaOCl) (producto químico con mayor actividad antimicrobiana de los estudiados), y el eucalipto etanólico (compuesto bioactivo con mejor actividad antibacteriana). Lo anterior, puede deberse al amplio espectro de microorganismos que logra inhibir el NaOCl, siendo no solo efectivo en microorganismos ambientales, sino también, como demostraron Lineback en 2018⁶⁸ y Eriksson en 2017,⁶⁹ en patógenos como *P. aeruginosa*, que se puede encontrar en la cavidad oral o *S. aureus* que puede presentarse en la piel, vías aéreas u otras zonas anatómicas. La información entregada por estos científicos, sirve para avalar los resultados obtenidos en el presente estudio, ya que el NaOCl, al igual que en investigaciones previas, fue efectivo tanto en microorganismos ambientales, como en aquellos que pertenecen al microbioma oral y en los potencialmente patógenos.

Otras características del hipoclorito de sodio son que es corrosivo, cáustico y de olor aversivo, como lo describió Campagna en 2016⁷⁰; esto sumado a que es altamente tóxico para quien lo manipula y para el medio ambiente. Las anteriores son algunas de las razones que demuestran que su uso como desinfectante de superficies no es lo más indicado, sino que sería adecuado el uso de otro tipo de desinfectantes, idealmente bioactivos, para reducir el factor de toxicidad y peligros para el paciente y operador. Al tener un excelente poder antimicrobiano, el NaOCl es más utilizado en odontología para el trabajo en cavidades estériles, principalmente en endodoncia, donde se debe siempre resguardar que este producto no tenga contacto con las mucosas del paciente, lo anterior es debido a su citotoxicidad, que ha sido testeada en diferentes estudios, como el de Ugur en 2018,⁷¹ donde se comparó con una sustancia bioactiva que fue el propóleo, siendo el NaOCl más tóxico y causando mayor daño oxidativo, sin embargo, el propóleo también presentó actividad antimicrobiana; estos datos, al igual que en el de nuestro estudio, indican que si bien es difícil alcanzar el poder antimicrobiano del NaOCl, existen productos más naturales que podrían reemplazarlo para evitar daño en pacientes y operadores. Se han reportado muchos casos de reacciones a la

exposición de hipoclorito en tratamientos endodónticos, ejemplos de estos casos se encuentran en la revisión sistemática de Guivarc'h, donde se expone que las complicaciones pueden ir desde una inflamación leve o severa hasta necrosis de mucosa y huesos por quemadura química con NaOCl.⁷² En base a esto, quienes trabajan en salud no pueden correr el riesgo de generar daño a ellos mismos o a los pacientes por posible contacto directo con el hipoclorito, sobre todo al tratarse de instrumental que se encuentra en contacto ~~directo~~ tanto con tejidos duros como blandos de la cavidad oral.

Respecto a los resultados expuestos de la actividad antimicrobiana de compuestos bioactivos, se puede inferir que aquel que presenta una mejor actividad es el Eucalipto etanólico, ya que logró generar halos de inhibición en la mayor parte de los microorganismos estudiados, cuyo promedio de diámetros superó a todos los otros compuestos. La actividad antimicrobiana del extracto etanólico de eucalipto ha sido probada por Rasool⁷³ tanto para bacterias gramnegativo como para positivas, siendo estas últimas las que presentan mayor sensibilidad al compuesto; esta información se condice con los resultados del estudio realizado, ya que como se puede observar en la Figura 22, los halos de inhibición fueron de mayor diámetro en grampositivos, tanto cocáceas como bacilos. Cabe destacar, además, que el mayor porcentaje de microorganismos aislados fueron grampositivos y que si bien el extracto etanólico de eucalipto no logra la completa desinfección del instrumental, por su menor acción contra gramnegativos, es un buen agente contra las otras bacterias, lo cual también fue estudiado y demostrado por Silva en su estudio con *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Candida albicans* y *Candida parapsilosis*.⁷⁴

Al realizar la comparación entre la actividad antimicrobiana del extracto de eucalipto etanólico con el producto químico con menor promedio de sus halos de inhibición, es decir el alcohol al 70%, también existe una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) que pone al eucalipto por sobre el alcohol; además podemos agregar a esta información que el alcohol a cualquiera de sus concentraciones es el producto químico, de los que fueron evaluados en el estudio, con menor toxicidad para el ser humano y con menor ecotoxicidad; respecto a esto, no hay estudios que evalúen la citotoxicidad del extracto etanólico de

eucalipto, sin embargo, en la revisión sistemática de Dhakad⁷⁵ sobre la significancia biológica, médica y toxicológica del eucalipto, no se observó toxicidad de la planta ni sus aceites esenciales para el ser humano, pudiéndose deducir que su extracto tampoco debiera ser tóxico para quien este en contacto con este directamente o mediante superficies.

Si se compara el alcohol al 95%, que tuvo mejor actividad que en su concentración más baja, con el eucalipto, de igual forma es este último el que tiene una actividad antimicrobiana significativamente mayor ($p < 0,05$) en los microorganismos estudiados. Si bien se podría considerar que el uso de alcohol como desinfectante es poco riesgoso debido a que no supone ningún peligro para quien lo manipule ni tampoco en las mucosas o tejidos de los pacientes, el estudio de Morais en 2017²² no lo recomienda para la limpieza de instrumental rotatorio, debido a que después de realizar la desinfección por fricción con alcohol se observó persistencia de microorganismos como bacterias, hongos y virus que debiesen ser eliminados para lograr la desinfección, concluyéndose lo mismo en la revisión sistemática realizada por Ribeiro,⁷⁶ donde se concluye que el alcohol logra eliminar en bajo porcentaje los microorganismos presentes si no se realiza una limpieza previa. Al igual que en los resultados obtenidos en estudios previos, durante la presente experimentación el alcohol no presentó una buena actividad antimicrobiana sobre las bacterias aisladas, teniendo promedios de halos de inhibición inferiores a todos los demás productos químicos, tanto para grampositivo como para gramnegativo e incluso obteniendo resultados significativamente menores que compuestos bioactivos.

Es relevante considerar que el alcohol es el principal agente utilizado para la desinfección de instrumental semi-crítico en el recinto donde se realizó el estudio y en diversas clínicas dentales y servicios públicos de salud, sin embargo, no existe una norma a nivel nacional o internacional que sea igual para todos los centros que prestan servicios de salud respecto al uso de alcohol como desinfectante y al modo de empleo de este producto. En un estudio realizado por Pereira⁷⁷ se indica que la forma más eficiente de realizar desinfección con alcohol, es aplicándolo en la superficie vigorosamente durante 90 segundos con 3 repeticiones, esto debido a que se volatiliza rápidamente y que requiere tiempo de secado entre aplicaciones; esta información está basada en protocolos brasileros de desinfección, sin

embargo, ni el Ministerio de Salud de Chile ni en el CCO donde se obtuvieron las muestras, está estandarizado el modo de empleo de este producto, es por esto que se pudiese deducir que la desinfección de material semi-crítico, en este caso micromotores y contrángulos, no se está realizando de manera adecuada y hay microorganismos que persisten en la superficie entre el uso con distintos pacientes, por lo que es fundamental el uso adecuado y estandarizado de los desinfectantes que se decidan utilizar en odontología.

8. CONCLUSIÓN

El estudio realizado revela la importancia del manejo de instrumental odontológico semi-crítico, ya que, si bien no requiere ser esterilizado según las instituciones encargadas de normar estos actos, puede ser un foco de infecciones cruzadas entre pacientes y entre

operador y paciente. Es de gran importancia destacar que las tomas de muestra fueron realizadas en las dependencias de una Universidad, donde los instrumentos son manipulados y manejados por estudiantes que se encuentran bajo constante supervisión de profesionales de la salud, a raíz de lo cual se podría pensar que el control de infecciones debiese ser más estricto y minucioso. Es por esto que sería de gran interés extrapolar este estudio a servicios de salud públicos y privados, donde el número de pacientes que se atiende por día es mayor que en un establecimiento educacional y donde no existen protocolos estandarizados para la desinfección y uso de estos materiales.

Otro tópico importante que fue estudiado, fue la eficiencia que tienen los desinfectantes de uso común sobre los microorganismos que se encuentran, generalmente, en el instrumental odontológico semi-crítico, ya que los manuales de desinfección existentes indican cantidades y tiempos arbitrarios para utilizar este tipo de productos. Es interesante observar que aquellos agentes químicos más comunes, como el alcohol a distintas concentraciones, son los que tienen un peor efecto antimicrobiano sobre los microorganismos de este estudio. Dado esto, es sumamente necesario buscar opciones que ayuden a lograr una mejor desinfección y de este modo brindar una atención más profesional, ética y correcta a todos los pacientes. Mediante la experimentación realizada se pueden sugerir productos que, generalmente, encontramos en las clínicas odontológicas o servicios de salud pública con atención odontológica y que, si bien no logran la esterilidad del instrumental, pueden generar un nivel de desinfección más elevado.

Como elemento final del estudio, se considera la toxicidad de los productos químicos utilizados para desinfección de instrumental, tanto para el medio ambiente como para el ser humano, teniendo todos los desinfectantes de uso común cierto grado de toxicidad que a pesar de ser bajo en algunos casos, será siempre mayor su impacto que aquel que puede tener un compuesto bioactivo. Es por lo anterior, que con este estudio se logra sugerir un nuevo desinfectante, el extracto etanólico de eucalipto, que pudiese tener menor impacto medioambiental y también menores contraindicaciones al contacto con seres humanos, sin embargo, al tener impacto principalmente en bacterias grampositivo, es necesaria la realización de más estudios que validen la información obtenida y también la prueba de otras

sustancias naturales de las que sea posible obtener compuestos bioactivos con una actividad antimicrobiana adecuada para la desinfección de instrumental odontológico semi-crítico.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Barrancos Mooney, J. and Barrancos, P. *Operatoria dental*. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana., 2008.

2. Spaulding eh, lawrence ca, block ss, reddish gf. chemical disinfection of medical and surgi-cal materials. in: lawrence ca, block ss, reddish gf, eds. disinfection, sterilization, and preservation. philadelphia, pa: lea & febiger; 1968:517-531
3. Ministerio de Salud. Norma técnica sobre esterilización y desinfección de alto nivel para establecimientos de atención en salud. Santiago, Chile: MINSAL; 2017.
4. Insituto de Salud Pública . (2014). ¿Que es el GHS?. Septiembre 2019, de Gobierno de Chile sitio web: <http://www.ispch.cl/ghs>
5. Ministerio de Salud. (2014). El sistema globalmente armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos. septiembre 2019, de Gobierno de Chile sitio web: <http://www.ghs-chile.cl/>
6. Naciones Unidas. (2015). Clasificación de sustancias y mezclas peligrosas. en Sistema globalmente armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos (sga) (18-20). Nueva York y Ginebra: st/sg/ac.10/30/rev.6
7. Diomedi, Alexis, Chacón, Eiiiana, Delpiano, Luis, Hervé, Beatrice, Jemenao, M. Irene, Medel, Myriam, Quintanilla, Marcela, Riedel, Gisela, Tinoco, Javier, & Cifuentes, Marcela. (2017). Antisépticos y desinfectantes: apuntando al uso racional. Recomendaciones del Comité Consultivo de Infecciones Asociadas a la Atención de Salud, Sociedad Chilena de Infectología. *Revista chilena de infectología*, 34(2), 156-174.
8. Difem L. S.A. HOJA DE DATOS DE SEGURIDAD (HDS) Alcohol 70°. SGS. Santiago, Chile 2017.
9. Marcela Cifuentes, Andrea Sakurada, Carlo Paonilelli. Norma de uso de antisépticos y desinfectantes. Unidad De Prevención Y Control De Las IAAS. Santiago: Hospital Clínico Universidad de Chile; 2013.
10. Sara Lastra. Hoja de datos de seguridad Clorhexidina. Antioquia: Centro de Información y Estudio de medicamentos y tóxicos; 2016.
11. Best practices for the safe use of glutaraldehyde in health care. Occupational Safety and Health Administration. <http://www.osha.gov/Publications/3258-08N-2006-English.html>. Published 2006. Ac- cessed July 12, 2018
12. Grupo Transmerquim. Hoja de datos de seguridad Glutaraldehído. GTM; 2016.

13. Gebel, j., exner, m., french, g., chartier, y., christiansen, b., gemein, s., goroncy-bermes, p., hartemann, p., heudorf, u., kramer, a., maillard, j. y., oltmanns, p., rotter, m., sonntag, h. g. (2013). the role of surface disinfection in infection prevention. *gms hygiene and infection control*, 8(1).
14. ECOLAB. Hoja de datos de seguridad ASEPTI-HB. Minnesota: Ecolab Inc.; 2019.
15. Diomedi Alexis, Chacón Eiiiana, Delpiano Luis, Hervé Beatrice, Jemenao M. Irene, Medel Myriam et al. Antisépticos y desinfectantes: apuntando al uso racional. Recomendaciones del Comité Consultivo de Infecciones Asociadas a la Atención de Salud, Sociedad Chilena de Infectología. *Rev. chil. infectol.* 2017 Abr; 34(2): 156-174.
16. Grupo Transmerquim. Ficha de datos de seguridad Hipoclorito de Sodio. GTM; 2017.
17. Metrex Research, LLC. All rights reserved. (2019). The fast and effective CaviCide1 is the next generation in surface disinfection. Septiembre 2019, de KaVo Kerr Online.
18. METREX. Hoja de Datos de Seguridad CaviCide. Michigan: METREX RESEARCH; 2016.
19. American Dental Association. Sterilization and Disinfection of Dental Instruments. Chicago: ADA; 2009.
20. Rutala W, Weber D. Sterilization, High-Level Disinfection, and Environmental Cleaning. *Infectious Disease Clinics of North America*. 2011;(25 (1):45-76.
21. Fonseca Alvarenga C, Reis C, Ferreira Veiga Tipple A, Mendonça de Paiva E, Aragão de Almeida Sasamoto S. Efetividade de um protocolo de reprocessamento na esterilização de canetas de alta-rotação em autoclave gravitacional. *Revista Eletronica de Enfermagem*. 2011;(13):560-565.
22. Morais Gomes Pinto F, Quartim de Moraes Bruna C, Carolina Camargo T, Marques M, Barretos Silva C, Sasagawa S et al. The practice of disinfection of high-speed handpieces with 70% w/v alcohol: An evaluation. *American Journal of Infection Control*. 2017;(45):e19-e22.
23. munir, m. t., kheirhah, h., baroutian, s., quek, s. y., & young, b. r. (2018). subcritical water extraction of bioactive compounds from waste onion skin. *journal of cleaner production*, 183, 487–494.doi:10.1016/j.jclepro.2018.02.166

24. moreira, s. a., alexandre, e. m., pintado, m., & saraiva, j. a. (2019). effect of emergent non-thermal extraction technologies on bioactive individual compounds profile from different plant materials. *food research international*, 115, 177-190.
25. Petropoulos S, Fernandes A, Barros L, Ciric A, Sokovic M, Ferreira I. Antimicrobial and antioxidant properties of various Greek garlic genotypes. *Food chemistry*. 2018;245:7-12.
26. Saha S, Saha SK, Hossain MA, Paul SK, Gomes RR, Imtiaz M, et al. Anti-Bacterial effect of Aqueous Garlic Extract (AGE) determined by Disc Diffusion Method against *Escherichia coli*. *Mymensingh medical journal : MMJ*. 2016;25(1):23-6.
27. Saha SK, Saha S, Hossain MA, Paul SK. In vitro assessment of antibacterial effect of garlic (*Allium sativum*) extracts on *Pseudomonas aeruginosa*. *Mymensingh medical journal : MMJ*. 2015;24(2):222-32.
28. Roshan N, Riley TV. Effect of natural products on the production and activity of *Clostridium difficile* toxins in vitro. 2018;8(1):15735.
29. Ma YL, Zhu DY, Thakur K, Wang CH, Wang H, Ren YF, et al. Antioxidant and antibacterial evaluation of polysaccharides sequentially extracted from onion (*Allium cepa* L.). *International journal of biological macromolecules*. 2018;111:92-101.
30. Mutlu-Ingok A, Karbancioglu-Guler F. Cardamom, Cumin, and Dill Weed Essential Oils: Chemical Compositions, Antimicrobial Activities, and Mechanisms of Action against *Campylobacter* spp. *Molecules (Basel, Switzerland)*. 2017;22(7).
31. Ambrosio CMS, de Alencar SM, Moreno AM, Da Gloria EM. Evaluation of the selective antibacterial activity of *Eucalyptus globulus* and *Pimenta pseudocaryophyllus* essential oils individually and in combination on *Enterococcus faecalis* and *Lactobacillus rhamnosus*. *Can J Microbiol*. 2018;64(11):844-55.
32. Elansary HO, Salem MZM, Ashmawy NA, Yessoufou K, El-Settawy AAA. In vitro antibacterial, antifungal and antioxidant activities of *Eucalyptus* spp. leaf extracts related to phenolic composition. *Nat Prod Res*. 2017;31(24):2927-30.
33. de Oliveira JR, de Jesus D, Figueira LW, de Oliveira FE, Pacheco Soares C, Camargo SE, et al. Biological activities of *Rosmarinus officinalis* L. (rosemary) extract as analyzed in microorganisms and cells. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2017;242(6):625-34.

34. Pastene E, Parada V, Avello M, Ruiz A, García A. Catechin-based procyanidins from *Peumus boldus* Mol. aqueous extract inhibit *Helicobacter pylori* urease and adherence to adenocarcinoma gastric cells. *Phytother Res.* 2014;28(11):1637-45.
35. Bardaweel SK, Bakchiche B, ALSalamat HA, Rezzoug M, Gherib A, Flamini G. Chemical composition, antioxidant, antimicrobial and Antiproliferative activities of essential oil of *Mentha spicata* L. (Lamiaceae) from Algerian Saharan atlas. *BMC Complement Altern Med.* 2018;18(1):201.
36. Kazemian H, Ghafourian S, Heidari H, Amiri P, Yamchi JK, Shavalipour A, et al. Antibacterial, anti-swarming and anti-biofilm formation activities of *Chamaemelum nobile* against *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2015;48(4):432-6.
37. Kazemian H, Ghafourian S, Sadeghifard N, Houshmandfar R, Badakhsh B, Taji A, et al. In vivo Antibacterial and Wound Healing Activities of Roman Chamomile (*Chamaemelum nobile*). *Infect Disord Drug Targets.* 2018;18(1):41-5.
38. Álvarez-Ordóñez A, Carvajal A, Arguello H, Martínez-Lobo FJ, Naharro G, Rubio P. Antibacterial activity and mode of action of a commercial citrus fruit extract. *J Appl Microbiol.* 2013;115(1):50-60.
39. Carlos Padilla, Olga Llobos. (2018). *Microbiología fundamental*. Talca, Chile: Universidad de Talca
40. Prescott L, Harley J, Klein D, Gamazo de la Rasilla C, Uzcudum I. *Microbiología*. 5th ed. McGraw-Hill Interamericana; 2004.
41. Brevis Azócar P, Padilla Espinoza C. *Manual de microbiología clínica aplicada*. Talca: Universidad de Talca, Escuela de Tecnología Médica; 2002.
42. KGaA Merck. Technical Data Sheet: GranuCult™ Tryptic Soy Agar acc. EP, USP, JP, ISO and FDA-BAM. In: Millipore M, editor. Darmstadt2016.
43. BD. INSTRUCCIONES DE USO–MEDIOS EN PLACA LISTOS PARA USAR: BD MacConkey II Agar. In: GmbH BD, editor. Heidelberg, Alemania 2014.
44. Liofilchem. TECHNICAL SHEET: Mitis Salivarius Agar. In: S.r.l. L, editor. Italia2016.
45. Diagnostics Valtek. Agar telurito de K. In: S.A. V, editor. Santiago2014.

46. Wiggins, b. a. (1996). discriminant analysis of antibiotic resistance patterns in fecal streptococci, a method to differentiate human and animal sources of fecal pollution in natural waters. *appl. environ. microbiol.*, 62(11), 3997-4002.
47. Laboratorios Britania. Bilis Esculina Agar. Argentina, 2015
48. Brooks G, Mietzner T, Morse S, Butel J, Carroll K. Jawetz, Melnick, & Adelberg's. *Medical Microbiology*. New York: McGraw-Hill Medical; 2010.
49. Prats G. *Microbiología clínica*. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2008.
50. López-Jácome LE, Hernández-Durán M, Colín-Castro CA, Ortega-Peña S, Cerón-González G, Franco-Cendejas R. Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. *Medigraphic*. 2014;10-8.
51. Bucková M, Godocíková J, Zámocký M, Polek B. Screening of bacterial isolates from polluted soils exhibiting catalase and peroxidase activity and diversity of their responses to oxidative stress. *Curr Microbiol*. 2010;61(4):241-7.
52. Nostro A, Guerrini A, Marino A, Tacchini M, Di Giulio M, Grandini A, et al. In vitro activity of plant extracts against biofilm-producing food-related bacteria. *Int J Food Microbiol*. 2016;238:33-9.
53. Bai J, Yang Y, Wang S, Gao L, Chen J, Ren Y, et al. *Syringa oblata* Lindl. Aqueous Extract Is a Potential Biofilm Inhibitor in *S. suis*. *Front Pharmacol*. 2017;8:26.
54. Ramli S, Radu S, Shaari K, Rukayadi Y. Antibacterial Activity of Ethanolic Extract of. *Biomed Res Int*. 2017;2017:9024246.
55. Daniel Bravo C, Rodrigo Giacaman S, Soraya León A. *Manual para el control de infecciones del Centro de Clínicas Odontológicas*. Talca: Universidad de Talca; 2019.
56. Lizon J, Florentin A, Martrette JM, Rivier A, Clement C, Rabaud C. Microbial control of dental unit water: Feedback on different disinfection methods experience. *Am J Infect Control*. 2016;44(2):247-9.
57. Abdouchakour F, Dupont C, Grau D, Aujoulat F, Mournetas P, Marchandin H, et al. *Pseudomonas aeruginosa* and *Achromobacter* sp. clonal selection leads to successive waves of contamination of water in dental care units. *Applied and environmental microbiology*. 2015;81(21):7509-24.
58. Marsh PD, Zaura E. Dental biofilm: ecological interactions in health and disease. *Journal of clinical periodontology*. 2017;44 Suppl 18:S12-s22.

59. Rôças, I. N., Siqueira Jr, J. F., & Santos, K. R. (2004). Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *Journal of endodontics*, 30(5), 315-320.
60. Lynn E. Hancock and Michael S. Gilmore. (2006). Pathogenicity of Enterococci. En *Gram-Positive Pathogens* (299-302). Washington, D.C.: Vincent A. Fischetti et al.
61. Rodríguez-Niklitschek, Cynthia, & Oporto V, Gonzalo H. (2015). Implicancias clínicas de la contaminación microbiana por *Enterococcus faecalis* en canales radiculares de dientes desvitalizados: Revisión de la literatura. *Revista odontológica mexicana*, 19(3), 181-186.
62. Díaz Pérez, Marilyn, Rodríguez Martínez, Claudio, & Zhurbenko, Raisa. (2010). Aspectos fundamentales sobre el género *Enterococcus* como patógeno de elevada importancia en la actualidad. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 48(2), 147-161.
63. Mohan S, Agarwal J, Srivastava R, Singh M. Observations on *Citrobacter* species from a tertiary care health center with special reference to multi-drug resistance and presence of CTX-M gene. *Indian J Pathol Microbiol* 2014;57:439-41.
64. Carolina Chahín. (2008). INFECCIONES INTRAHOSPITALARIAS. septiembre 2019, de Universidad de La Frontera Sitio web: <http://www.bibliotecaminsal.cl/wp/wp-content/uploads/2016/01/iih.pdf>
65. Deliberali Bruno, Myiamoto Kendi Nishino, Winckler Neto Carlos Hugo Del Priore, Pulcinelli Rafael Silvio Remus, Aquino Alzira Resende do Carmo, Vizzotto Bruno Stefanello et al. Prevalência de bacilos Gram-negativos não fermentadores de pacientes internados em Porto Alegre-RS. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* [Internet]. 2011 Oct; 47(5): 529-534.
66. MINSAL. (2017). Informe de Vigilancia de Infecciones Asociadas a la Atención en Salud 2017. Septiembre 2019, de DEPARTAMENTO DE CALIDAD Y SEGURIDAD DE LA ATENCIÓN PROGRAMA CONTROL DE IAAS Sitio web: <https://www.minsal.cl/wp-content/uploads/2015/09/informe-vigilancia-2017.pdf>
67. Garbacz, K., Kwapisz, E., & Wierzbowska, M. (2019). Denture stomatitis associated with small-colony variants of *Staphylococcus aureus*: a case report. *BMC Oral Health*, 19(1).

68. Lineback CB, Nkemngong CA, Wu ST, Li X, Teska PJ, Oliver HF. Hydrogen peroxide and sodium hypochlorite disinfectants are more effective against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms than quaternary ammonium compounds. 2018;7:154.
69. Eriksson S, van der Plas MJA, Morgelin M, Sonesson A. Antibacterial and antibiofilm effects of sodium hypochlorite against *Staphylococcus aureus* isolates derived from patients with atopic dermatitis. 2017;177(2):513-21.
70. Campagna MV, Faure-Kumar E, Treger JA, Cushman JD, Grogan TR, Kasahara N, et al. Factors in the Selection of Surface Disinfectants for Use in a Laboratory Animal Setting. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* : JAALAS. 2016;55(2):175-88.
71. Ugur Aydin Z, Akpınar KE, Hepokur C, Erdonmez D. Assessment of toxicity and oxidative DNA damage of sodium hypochlorite, chitosan and propolis on fibroblast cells. *Brazilian oral research*. 2018;32:e119.
72. Guivarc'h M, Ordioni U, Ahmed HM, Cohen S, Catherine JH, Bukiet F. Sodium Hypochlorite Accident: A Systematic Review. *Journal of endodontics*. 2017;43(1):16-24.
73. Rasool M, Malik A, Alam MZ, Afzal M, Alam R, Arsalan HM, et al. Optimization of antibacterial activity of ethanolic extracts of *Eucalyptus tereticornis* and *Nigella sativa*: Response surface Methodology. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*. 2018;31(4):1259-66.
74. Silva E, Fernandes S, Bacelar E, Sampaio A. Antimicrobial Activity Of Aqueous, Ethanolic And Methanolic Leaf Extracts From *Acacia* Spp. And *Eucalyptus nicholii*. *African journal of traditional, complementary, and alternative medicines* : AJTCAM. 2016;13(6):130-4.
75. Dhakad AK, Pandey VV, Beg S, Rawat JM, Singh A. Biological, medicinal and toxicological significance of *Eucalyptus* leaf essential oil: a review. *Journal of the science of food and agriculture*. 2018;98(3):833-48.
76. Ribeiro MM, Neumann VA, Padoveze MC, Graziano KU. Efficacy and effectiveness of alcohol in the disinfection of semi-critical materials: a systematic review. *Revista latino-americana de enfermagem*. 2015;23(4):741-52.

77. Pereira Rs, Tipple Afv, Reis C, Cavalcante Fo, Carvalho TKÁdM. Análise microbiológica de canetas odontológicas de alta rotação submetidas à descontaminação com álcool etílico a 70%. Revista odontológica de Brasil-Central. 2008;17:124-32.