

Evaluación comparativa de la capacidad antimicrobiana de una solución electrolizada de superoxidación con pH neutro y una solución a base de peróxido de hidrógeno.

Comparative assessment of the antimicrobial capacity of an electrolyzed superoxide solution of neutral pH and a hydrogen peroxide-based solution.

Mónica Elizabeth Rojas Briones,* Daniel Silva-Herzog Flores,**
Ana María González Amaro,*** Ricardo Oliva Rodríguez****

RESUMEN

Objetivo: Evaluar la capacidad antimicrobiana de una solución electrolizada de superoxidación con pH neutro (OxOral® Sterilizing) comparativamente con una solución a base de peróxido de hidrógeno (Sporox II®). **Material y métodos:** Se formó biofilm de *E. faecalis* en 65 raíces; cada una se instrumentó con un juego de limas K-Flexofile, para luego sumergir 12 juegos en cada solución en los tiempos sugeridos por sus fabricantes y conseguir esterilización; se emplearon 15 min para OxOral® y seis horas para Sporox II®, así como un re-uso a las 72 horas para verificar cambios en el pH y pérdida de capacidad antimicrobiana. Posteriormente se incubaron las limas en medio de cultivo específico por 48 horas a 37 °C. Se verificó la presencia de turbidez, se determinó la escala McFarland y se efectuaron las diluciones correspondientes para su siembra en cajas de agar incubadas a 37 °C por 48 horas. Posteriormente se realizó la cuantificación de las unidades formadoras de colonias. **Resultados:** OxOral® Sterilizing no mostró actividad microbica contra *E. faecalis* mientras que Sporox II® mostró una eficaz actividad microbica; ambas soluciones mantuvieron un pH estable de 7 y 1 respectivamente luego de su re-uso a las 72 horas. **Conclusión:** Sporox II® mostró una eficaz actividad microbica en contra de *E. faecalis* mientras que OxOral® Sterilizing denotó una nula capacidad antimicrobiana en los tiempos sugeridos por sus fabricantes.

Palabras clave: Biofilm, *E. faecalis*, esterilización, OxOral, Sporox II.

ABSTRACT

Aim: To assess the antimicrobial capacity of an electrolyzed superoxide solution of neutral pH (OxOral® Sterilizing) compared to a hydrogen peroxide-based solution (Sporox II®). **Material and methods:** An *E. faecalis* biofilm was formed on 65 roots, each of which was treated using sets of K-Flexofile files; subsequently, 12 sets were immersed in each solution for the amount of time suggested by the manufacturers as that required to achieve sterilization: 15 min in the case of OxOral® Sterilizing and six hours for Sporox II®. The solutions were reused at 72 hours in order to check for changes in pH and any loss of antimicrobial capacity. The files were subsequently incubated in a thioglycollate culture medium with hemin and vitamin K for 48 hours at 37 °C. We then checked for the presence or absence of turbidity, determined the McFarland standard, and prepared the corresponding dilutions for inoculation in agar plates, incubated at 37 °C for 48 hours. Finally, the number of colony-forming units was determined. **Results:** OxOral® Sterilizing displayed no antimicrobial effect on *E. faecalis*, whereas Sporox II® was found to have a significant effect. Both solutions maintained a stable pH of 7 and 1 respectively after their reuse at 72 hours. **Conclusion:** When used for the time suggested by their manufacturers, Sporox II® was found to have a significant effect on *E. faecalis*, whereas OxOral® Sterilizing was found to have no antimicrobial capacity.

Key words: Biofilm, *E. faecalis*, sterilizing, OxOral, Sporox II.

INTRODUCCIÓN

En el campo odontológico, la esterilización del equipo e instrumental es de vital importancia para evitar la transmisión de enfermedades infectocontagiosas entre pacientes, odontólogos y personal auxiliar. Dado que no todos los implementos que se utilizan en distintas modalidades de tratamiento pueden ser sometidos a esterilización en calor seco o húmedo, existe en el mercado una gran variedad de productos para la esterilización química de instrumental.¹

* Médico Estomatólogo, Facultad de Estomatología.

** Doctor en Ciencias, Coordinador de la Maestría en Endodoncia.

*** Maestra en Ciencias, Coordinadora del Departamento de Microbiología.

**** Doctor en Ciencias Biológicas, Profesor Investigador, Maestría de Endodoncia.

Facultad de Estomatología, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, SLP, México.

Recibido: Enero 2013. Aceptado para publicación: Mayo 2013.

Las soluciones electrolizadas de superoxidación (SES) tienen efecto antiséptico, desinfectante y esterilizante. Son desarrolladas a partir de agua común y sal a la cual se induce corriente eléctrica generando diversos elementos derivados de O, H y Cl. OxOral® Sterilizing (EsteripHarma S.A. de C.V., México) plantea un espectro microbicida amplio y efectivo contra una gran variedad de bacterias, hongos y virus. Su mecanismo de acción se atribuye al efecto de oxidación de los grupos sulfhidrilo y aminoácidos de la pared bacteriana, lo que afecta el proceso de respiración y nutrición, mediante oxidación de los componentes respiratorios, inhibición de la síntesis de proteínas, mientras que sobre los virus genera represión en la síntesis de RNA y ruptura del material genético.²⁻⁴

El peróxido de hidrógeno estabilizado (H₂O₂), por su parte, tiene una buena actividad microbicida en concentraciones del 6 al 25%. Es un agente oxidante que puede atacar las membranas lipídicas, ácido desoxirribonucleico (DNA, por sus siglas en inglés) y otros componentes esenciales de las bacterias; es activo contra bacterias, hongos, virus y esporas.

Sporox II® (Sultan Healthcare, Hackensack, NJ, USA) contiene: 7.5% de H₂O₂ y 0.8% de ácido fosfórico, lo cual le confiere un pH bajo.⁵

El objetivo de este estudio fue evaluar comparativamente la capacidad antimicrobiana de OxOral® Sterilizing con Sporox II® en los periodos que sus fabricantes aducen como adecuados para esterilizar y valorar si su efecto bactericida y pH se ven mermados por el re-uso luego de 72 horas, mediante un modelo experimental en condiciones cercanas a un entorno clínico real.

MATERIAL Y MÉTODOS

Preparación de las muestras. Se utilizaron 65 raíces de un solo conducto (48 para los grupos experimentales, ocho control positivo, ocho control negativo y uno como control de esterilidad). El tercio coronal se ensanchó con un instrumento rotatorio Protaper SX (Dentsply Maillefer, Suiza) para facilitar su colonización por parte de *E. faecalis*.⁶ Posteriormente, con la finalidad de eliminar todos los restos orgánicos e inorgánicos las raíces se colocaron en ultrasonido con EDTA al 17% y NaOCl al 5.25% por cuatro minutos respectivamente, enjuagando con agua destilada después de cada sustancia y se procedió al secado de las piezas y a su esterilización.

Cultivo de *E. faecalis* e inoculación de las muestras (todos los medios de cultivo se obtuvieron de Becton-Dickinson de México S.A. de C.V.). Colonias puras de *E.*

faecalis, cultivadas en placa de agar sangre de carnero, fueron inoculadas en un tubo con caldo de tioglicolato (Figura 1a), cuya turbidez se ajustó para que coincidiera con la turbidez de 1.5 x 10⁸ unidades formadoras de colonias/mL, equivalente a 0.5 de la escala de McFarland.⁷ Posteriormente se agregaron cinco gotas del inóculo en c/u de 14 tubos con 10 mL de caldo de soya tripticaseína y las raíces a ser contaminadas, excepto la que se usó como control de esterilidad (Figura 1b).

Se incubaron a 35 °C por 15 días recambiando el caldo cada 48 horas. Se verificó la presencia única de *E. faecalis* por inoculación en placa, incubación y tinción de Gram (Figura 1c).

Contaminación de los instrumentos endodónticos.

Una vez formado el biofilm de *E. faecalis* en el interior del conducto radicular luego de 15 días (Figura 1d), se procedió a instrumentar las raíces. Se utilizaron limas K-Flexofile (Dentsply-Maillefer, USA) de 1ª serie. Se instrumentó cada raíz, con un total de cuatro limas a partir de la primera que ajustó la longitud de trabajo permitiendo que se cargaran de dentina contaminada las estrías cortantes. Luego se procedió al protocolo de limpieza mediante cepillado con agua y jabón por un tiempo de cuatro segundos por lima y un enjuague final con agua por cuatro segundos y secado al medio ambiente para ser sometidas al proceso de esterilización con las sustancias de prueba.

Proceso de esterilización. Se verificó el pH de cada solución por medio de tiras reactivas (Whatman®) previo a su uso, registrando un valor de siete para OxOral® y uno para Sporox II® y se procedió a introducir cada juego de limas en un tubo de ensaye con 10 mL de las soluciones mediante el siguiente planteamiento:

- **Grupo A1: (OxOral®, tiempo 1).** 12 juegos de limas, c/u en un tubo de ensaye con 10 mL de Ox-Oral® por 15 minutos; dos juegos de limas en 10 mL de glutaraldehído (Gafidex®) por 10 horas como control negativo y dos juegos en 10 mL de agua destilada estéril por 15 minutos como control positivo.
- **Grupo B1: (Sporox II®, tiempo 1).** 12 juegos de limas en tubos de ensaye con 10 mL de Sporox II® por seis horas; dos juegos de limas en 10 mL de glutaraldehído (Gafidex®) por 10 horas como control negativo y dos juegos de limas en 10 mL de agua destilada estéril por seis horas como control positivo. Pasado el tiempo correspondiente y retiradas las limas cada solución se guardó para su reutilización a las 72 horas.
- **Grupo A2: (OxOral®, tiempo 2).** A las 72 horas del tiempo uno se repitió el planteamiento del grupo A1

en términos de cantidad de juegos de limas y tiempo de exposición tanto de OxOral® como de los controles positivo y negativo.

- **Grupo B2: (Sporox II®, tiempo 2).** A las 72 horas del tiempo uno se repitió el planteamiento del grupo B1 en términos de cantidad de juegos de limas y

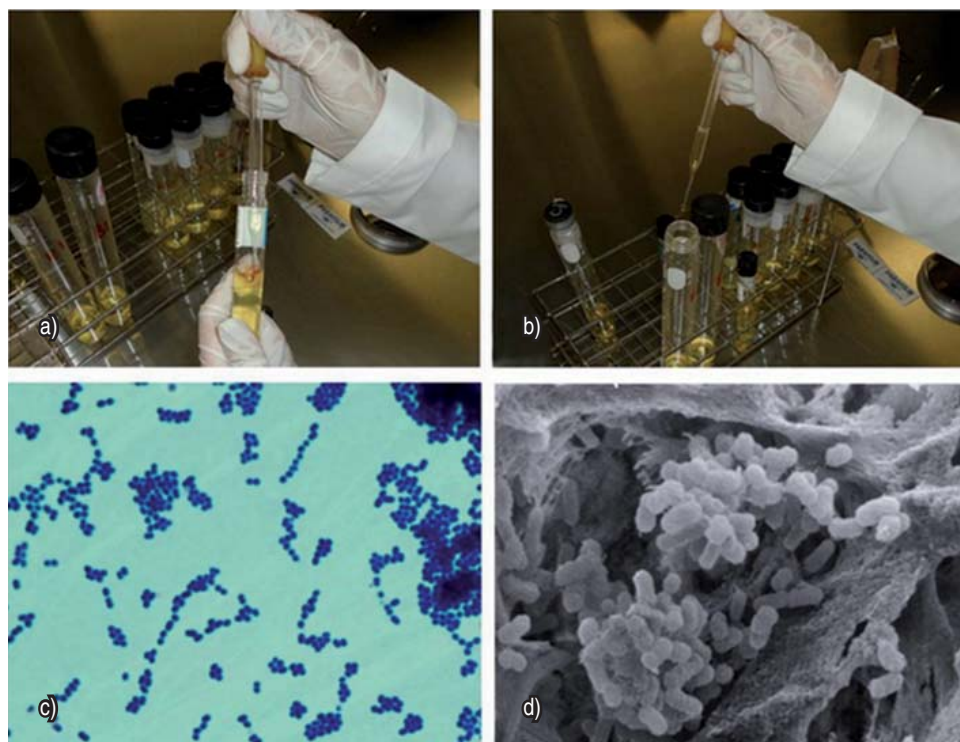


Figura 1.

Cultivo de *E. faecalis*.

- a) Inoculación de *E. faecalis* en tubos con caldo de tioglicolato.
- b) Agregado del inóculo en tubos con caldo de soja tripticaseína y las raíces a ser contaminadas.
- c) Tinción de Gram para verificar la presencia única de *E. faecalis*.
- d) Biofilm de *E. faecalis* en la pared del conducto radicular.

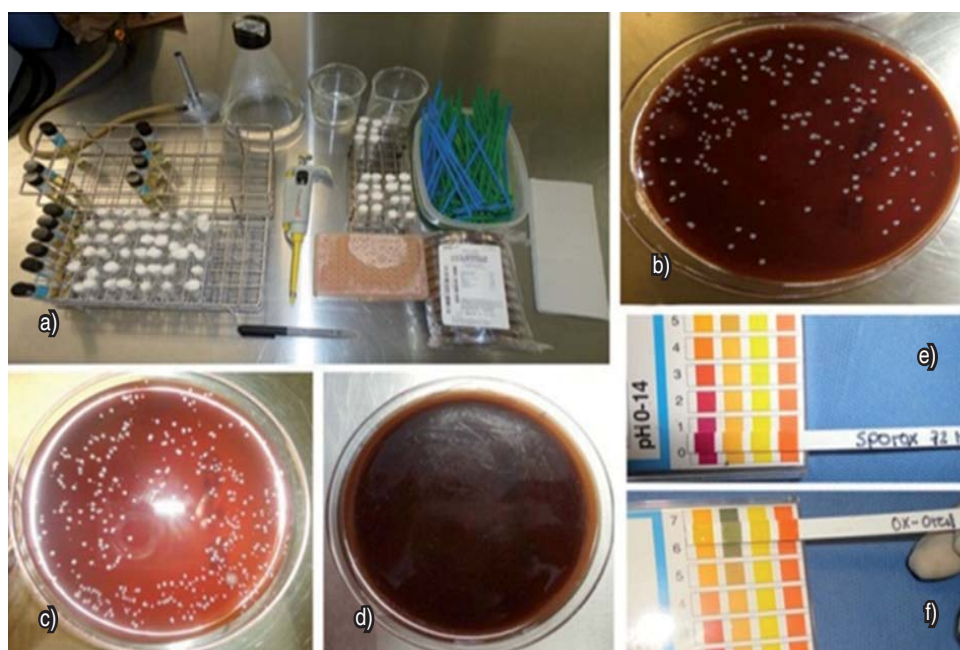


Figura 2.

Verificación cuantitativa del crecimiento bacteriano.

- a) Material utilizado en esta fase.
- b) Placa que muestra crecimiento de UFC (unidades formadoras de colonias) a partir de una dilución de 10^{-5} , OxOral®.
- c) Placa de agar con crecimiento bacteriano tras la descarga de caldo de cultivo incubado con las limas sometidas a la acción de OxOral®.
- d) Placa de agar con nulo crecimiento bacteriano tras la descarga de caldo de cultivo incubado con las limas sometidas a la acción de Sporox II®.
- e y f) Verificación del pH de Sporox II® y OxOral® respectivamente luego del segundo uso tras 72 horas.

tiempo de exposición, tanto de Sporox II® como de los controles positivo y negativo. Al retirar las limas se registró el pH de cada solución.

Verificación de crecimiento bacteriano. Pasado el tiempo para cada solución se procedió a pasar cada juego de limas a un tubo con medio de tioglicolato con hemina y vitamina K para ser incubados por 24 a 48 horas a 37 °C. Luego se verificó la presencia o no de turbidez, se determinó la escala McFarland y se efectuaron las diluciones correspondientes para su siembra en cajas de agar CDC anaeróbico con sangre al 5% e incubación a 37 °C por 24 a 48 horas; la figura 2a muestra el material usado en esta fase. Pasado ese tiempo se realizó la cuantificación de las UFC dentro de un rango de 30-300 (Figura 2b). El crecimiento bacteriano en placa del inóculo, luego del efecto de OxOral®, se muestra en la figura 2c, mientras que la ausencia de crecimiento en placa luego del efecto de Sporox II® queda evidenciada en la figura 2d. La verificación del pH de Sporox II® y OxOral® respectivamente luego del segundo uso tras 72 horas se muestra en las figuras 2e y 2f.

RESULTADOS

En base a los datos obtenidos con respecto a crecimiento bacteriano en términos de turbidez, Sporox II® mostró un eficaz efecto bactericida sobre *E. faecalis*, luego de seis horas, tanto con la solución fresca como luego de transcurridas 72 horas y un uso previo. Mientras que OxOral® mostró un nulo efecto bactericida luego de 15 minutos,

tanto con la solución fresca como luego de 72 horas y un uso previo. Los resultados del tiempo 1 con las soluciones frescas se muestran en la figura 3; se observa presencia de turbidez en todos los tubos de OxOral® (Figura 3a), mientras que los tubos con Sporox II® muestran ausencia total de turbidez (Figura 3b); los controles positivo y negativo se muestran en la figura 3c.

Los resultados del tiempo 2 son mostrados en la figura 4; la turbidez de los tubos de OxOral® resultó evidente luego del reuso (Figura 4a), mientras que Sporox II® denotó ausencia total de turbidez tras el uso luego de 72 horas (Figura 4b); los controles se muestran en la figura 4c.

Los resultados en unidades formadoras de colonias (UFC), escala de McFarland de cada tubo en cada uno de los tiempos para OxOral® se muestran en el cuadro I, mientras que los resultados correspondientes a Sporox II® en términos de UFC, escala McFarland de cada tubo en ambos tiempos se muestran en el cuadro II.

Después de obtener el número de UFC para cada grupo, se transformó a datos exponenciales con la siguiente fórmula: $[(N^{\circ} \text{ de colonias en placa}) (\text{Factor de dilución}) / 0.1 \text{ mL} = N^{\circ} \text{ de colonias por mL}]$. Posteriormente se expresó el número de UFC en log10. Se aplicaron las pruebas estadísticas de ANOVA y de Tukey observándose diferencia significativa ($p < 0.005$) entre OxOral® y Sporox II®, así como entre los dos tiempos de OxOral®.

La figura 5 muestra el crecimiento bacteriano en términos del número de colonias por mL derivado del conteo de UFC para OxOral®, Sporox II® y los controles negativo y positivo en el tiempo 1, mientras que la figura 6 muestra



Figura 3.

Verificación cualitativa del crecimiento bacteriano asociado a las limas endodónticas luego del contacto con las soluciones esterilizantes durante el tiempo 1, y después de la incubación con medio de cultivo específico.

- a) OxOral®, presencia de turbidez en todos los tubos.
- b) Sporox II®, ausencia total de turbidez.
- c) Control positivo y negativo.



Figura 4.

Verificación cualitativa del crecimiento bacteriano asociado a las limas endodónticas luego del contacto con las soluciones esterilizantes durante el tiempo 2, a 72 horas y después de la incubación con medio de cultivo específico.

a) OxOral®, presencia de turbidez en todos los tubos.

b) Sporox II®, ausencia total de turbidez.

c) Control positivo y negativo.

Cuadro I. Se muestra la carga bacteriana en UFC de los tubos con instrumentos expuestos a OxOral® en ambos tiempos y el valor equivalente de la escala de McFarland.

OxOral® Sterilizing carga bacteriana en UFC (rango 30-300)				
Tubo	McFarland	Tiempo 1	McFarland	Tiempo 2
1	3	204×10^{-6}	2	177×10^{-5}
2	3	204×10^{-6}	2	106×10^{-5}
3	6	128×10^{-6}	3	352×10^{-5}
4	5	173×10^{-6}	3	141×10^{-5}
5	6	128×10^{-6}	5	318×10^{-5}
6	3	204×10^{-6}	5	322×10^{-5}
7	5	173×10^{-6}	1	50×10^{-4}
8	2	72×10^{-6}	1	145×10^{-4}
9	2	72×10^{-6}	2	165×10^{-4}
10	2	72×10^{-6}	2	115×10^{-5}
11	2	73×10^{-6}	2	94×10^{-5}
12	5	173×10^{-6}	2	156×10^{-5}

UFC: Unidades formadoras de colonias.

el crecimiento bacteriano luego del uso de las soluciones tras 72 horas del primer uso.

La medición del pH de las dos soluciones al inicio y luego de su uso en dos ocasiones con 72 horas de diferencia permitió verificar que ambas mantienen estable el valor de pH: siete para OxOral® y uno para Sporox II®.

DISCUSIÓN

La *E. faecalis* fue seleccionada para este trabajo por su importancia en infecciones endodónticas persistentes. Además tiene la habilidad de sobrevivir en situaciones desfavorables en el conducto radicular, ya que forma biofilm en diversos sustratos.⁸ Adicionalmente, la metodología descrita en este

Cuadro II. Se muestra el no desarrollo de carga bacteriana en UFC de los tubos con instrumentos expuestos a Sporox II® en ambos tiempos.

Sporox II® carga bacteriana en UFC (30-300)				
Tubo	McFarland	Tiempo 1	McFarland	Tiempo 2
1	0	No desarrollo	0	No desarrollo
2	0	No desarrollo	0	No desarrollo
3	0	No desarrollo	0	No desarrollo
4	0	No desarrollo	0	No desarrollo
5	0	No desarrollo	0	No desarrollo
6	0	No desarrollo	0	No desarrollo
7	0	No desarrollo	0	No desarrollo
8	0	No desarrollo	0	No desarrollo
9	0	No desarrollo	0	No desarrollo
10	0	No desarrollo	0	No desarrollo
11	0	No desarrollo	0	No desarrollo
12	0	No desarrollo	0	No desarrollo

UFC: Unidades formadoras de colonias.

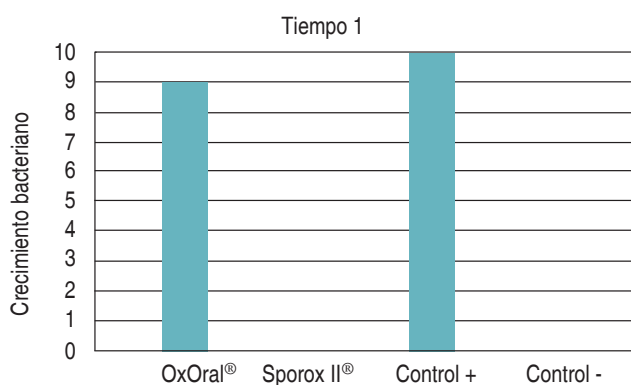


Figura 5. Crecimiento bacteriano en términos del número de colonias por mL derivado del conteo de UFC para OxOral®, Sporox II® y los controles positivo y negativo en el tiempo 1.

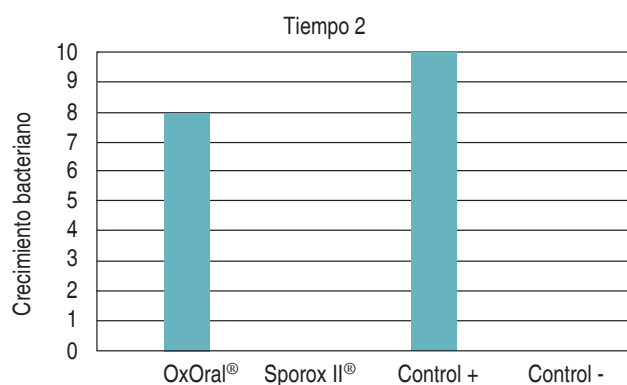


Figura 6. Crecimiento bacteriano en términos del número de colonias por mL derivado del conteo de UFC para OxOral®, Sporox II® y los controles positivo y negativo en el tiempo 2.

www.medigraphic.org.mx

trabajo para conseguir la formación de biofilm ha probado ser un medio óptimo en distintos trabajos que han enfocado la necesidad de conseguir la remoción completa del biofilm mediante distintas estrategias y protocolos de desinfección.⁷

El protocolo de dilución utilizado permitió la observación de las características morfológicas así como

el conteo de las bacterias, lográndose una dispersión adecuada de las UFC.

Por ser un producto de reciente aparición en el mercado, OxOral® cuenta con escasos reportes en la literatura. En el presente trabajo los resultados mostraron que OxOral® no tiene actividad microbica contra *E. faecalis*,

a diferencia de Sporox II®, el cual sí mostró efectividad en la esterilización de los instrumentos endodónticos en el tiempo que marca su fabricante; dicho resultado coincide con el de Zaragoza y colaboradores que compararon el efecto de OxOral® y ACCUA Aseptic Hp®, otra solución electrolizada de superoxidación con pH neutro mediante la técnica de difusión en disco en agar retando a: *S. aureus*, *S. mutans*, *L. acidophilus*, *C. albicans*, *E. coli* y *Pseudomona* sp, observando halos de inhibición bacteriana con un promedio de 12 mm con ACCUA Aseptic Hp® y una nula inhibición del crecimiento bacteriano con OxOral® Sterilizing.⁹

Al analizar la efectividad antibacteriana de OxOral® en términos de reducción de UFC en los dos tiempos de prueba, se observó un crecimiento bacteriano ligeramente mayor en el tiempo 1, lo cual resulta interesante dado que sería de esperar una menor efectividad tras las 72 horas y el uso repetido, aunque posiblemente la carga retirada por el cepillado es un factor difícil de estandarizar. Los valores de pH inicial y final implican una estabilidad que quizá podría afectarse solamente con una cantidad mayor de reutilizaciones o un mayor paso de tiempo.

La acción de Sporox II® en los dos tiempos de prueba mostró una ausencia absoluta de crecimiento bacteriano, lo cual habla muy bien de las características de dicha sustancia como esterilizante para instrumental endodóntico, tal y como ocurre con la esterilización de endoscopios a nivel hospitalario, aplicación en la cual Sporox II® ha mostrado una alta efectividad.¹⁰

CONCLUSIONES

Al evaluar las soluciones en los tiempos sugeridos por sus fabricantes, OxOral® Sterilizing no mostró actividad microbicida sobre *E. faecalis* ni con la solución fresca ni en una reutilización a las 72 horas. En contraste, Sporox II® mostró una eficaz actividad microbicida en los dos tiempos de prueba; ambas soluciones mantu-

vieron un pH estable luego de dos usos con 72 horas de diferencia.

BIBLIOGRAFÍA

1. Flores MMA. Agua súper oxidada-Protocolo de Aplicación Odontológica; Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia Michoacán Noviembre 2003.
2. Información Técnica. Producto OxOral. Esteripharma Línea Odontológica.
3. Durán VHC. Super oxidized solutions and their technological evolution. Rev Dolor, Foro Nacional de Investigación y Clínica Médica. 2010; 7 (3): 3-8.
4. Cabello GC, Rosete ODP, Manjarrez ZME. Efecto de una solución electrolizada de superoxidación con pH neutro sobre la infección del virus de influenza A en células MDCK. Rev Inst Nal Enf Resp. 2009; 22: 280-287.
5. Rutala WA, Weber DJ. Disinfection of endoscopes: review of new chemical sterilants used for high level disinfection. Infection Control Hospital Epidemiology. 1999; 20: 69-76.
6. Savariz A, González RMP, Ferrer LCM. Long-term sealing ability of GuttaFlow versus AH Plus using different obturation techniques. Med Oral Cir Bucal. 2012; 15 (6): e936-941.
7. Paranjpe A, Gregorio C, Gonzalez AM, Gómez A, Silva-Herzog D, Aragón PA. Efficacy of the self-adjusting file system on cleaning and shaping oval canals: a microbiological and microscopic evaluation. J Endod. 2012; 38 (2): 226-231.
8. Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owartz CB. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. J Endod. 2006; 32 (2): 93-98.
9. Zaragoza MMTJ, López BLE, Rodríguez MD. Comparación del efecto antimicrobiano de dos soluciones esterilizantes de Superoxidación con pH neutro. Odontología Actual. 2012; 9 (110): 38-40.
10. Sattar SA, Taylor YE, Paquette M, Rubino J. In-hospital evaluation of 7.5% Hydrogen peroxide as a disinfectant for flexible endoscopes. Can J Infect Control. 1996; 11 (2): 51-54.

Correspondencia:

Ph D. Ricardo Oliva Rodríguez

Facultad de Estomatología
Universidad Autónoma de San Luis Potosí
Av. Manuel Nava Núm. 2.
Zona Universitaria, 78290,
San Luis Potosí, SLP, México.
E-mail: ricardo.oliva@uaslp.mx

www.medigraphic.org.mx