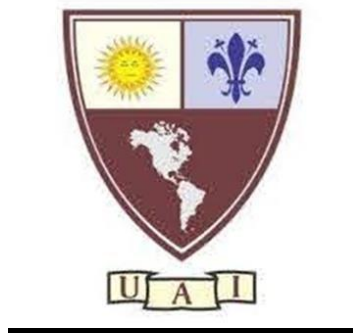


Universidad Abierta Interamericana  
Facultad de Ciencias Médicas  
Carrera de posgrado en Periodoncia



Título: Blanqueamiento dental y adherencia de  
*C.albicans*.

Tesina para obtención de título Especialista en  
Periodoncia.

Directora: Dra María Isabel Brusca

Tutor: Dra Virginia Jewtuchowicz

Autora: Kees Marina Laura

Diciembre 2024

Buenos Aires, Argentina.

## **RESUMEN:**

El blanqueamiento dental es actualmente uno de los procedimientos estéticos más requeridos por los pacientes. El Peróxido de Hidrogeno contiene peróxidos inestables que producen radicales libres de oxígeno, capaces de romper los componentes orgánicos de carbono pigmentados contenidos en la matriz del esmalte, convirtiéndolos en moléculas de cadena más cortas y menos pigmentadas definiéndose como oxidación, la misma continúa por algún tiempo, pudiendo llegar a descomponer los materiales orgánicos en dióxido de carbono y agua, lo que representaría la pérdida de la matriz del esmalte<sup>1</sup>.

Uno de los efectos es la alteración de la rugosidad de la superficie y grietas más profundas, así como aumento de la porosidad del esmalte por lo que podría este efecto aumentar la adhesión de microorganismo. **Objetivo:** determinar si la adherencia de *Candida albicans* es mayor en esmalte sometido a blanqueamiento con peróxido de hidrogeno al 35 %.

**Materiales y métodos:** la muestra estuvo conformada por 20 premolares sanos extraídos con indicación de ortodoncia de pacientes de 13 a 35 años con un tiempo post extracción inferior de 6 meses. Se designó aleatoriamente dos grupos, grupo control (sin blanqueamiento solo agua estéril) y grupo experimental (blanqueamiento profesional con peróxido de hidrogeno 35 %). Los dientes fueron esterilizados para posteriormente ser incubados con *Candida albicans* por 36 hs. Luego se tomó muestra de la cara vestibular de dichas piezas con microbruhs estéril para centrifugarlas, se realizó la siembra en placas con agar sabouraud glucosado a partir del sobrenadante del centrifugado con un volumen de 7 microlitros, estriado con ansa. Se cuantificaron las UFC de ambos grupos tras 36 hs de incubación en estufa a 37°C. **Análisis estadísticos:** Los datos fueron procesados en Excel a través del sistema de complementos real statistics, se aplicó la prueba de Shapiro Wilk que determino la distribución normal de los datos, la prueba F para varianzas de dos muestras la cual resulto en varianzas iguales por lo que se seleccionó la prueba paramétricas de T-Student de muestras independientes para varianzas iguales. El resultado para análisis de una cola fue P valor de 0,04 por lo que podemos pensar que esa diferencia entre grupo control y experimental existe, y que en cuyo caso se dio mayor adherencia de *Candida* en el grupo control en comparación con el grupo experimental. **Conclusión:** podemos concluir que hubo mayor adherencia de *C. alicans* en el grupo control, ya que, al compararlo con el grupo experimental, hubo una diferencia estadísticamente significativa respecto a la adherencia de *C. albicans* ( $p=0,04$  T.Student). Este hallazgo podría explicarse por acción antimicrobiana del agente blanqueador.

Palabras Claves: peróxido de hidrogeno, blanqueamiento dental externo, *Candida albicans*, adherencia *Candida*.

## CONTENIDO

|                                 |    |
|---------------------------------|----|
| Resumen.....                    | 1  |
| 1. Introducción.....            | 3  |
| 2. Hipótesis.....               | 6  |
| 3. Objetivos.....               | 6  |
| 3.a Objetivo general.....       | 6  |
| 3. b objetivos específicos..... | 6  |
| 4. Materiales y métodos.....    | 6  |
| 5. Análisis y Resultados.....   | 10 |
| 6. Discusión.....               | 12 |
| 7. Conclusión.....              | 15 |
| 8. Bibliografía.....            | 16 |
| 9. Anexos.....                  | 20 |

## INTRODUCCIÓN

El blanqueamiento dental es actualmente uno de los procedimientos estéticos más requeridos por los pacientes. La Academia Americana de Odontología Cosmética (American Academy of Cosmetic Dentistry) ha reportado que los procedimientos de blanqueamiento dental han incrementado en un poco más del 300% entre el 2002 y el 2007 y que los números siguen creciendo alrededor de un 25% anual<sup>2,3</sup>. El blanqueamiento dental fue descrito por primera vez en 1864 por Truman, quien usó, en dientes no vitales, varios compuestos tales como el hipoclorito de sodio, perborato de sodio y peróxido de hidrógeno<sup>2</sup>.

El blanqueamiento se define como un procedimiento clínico por medio del cual se pueden aclarar uno o varios dientes, con agentes químicos como peróxidos o cloruros en diversas concentraciones; por medio de este método se eliminan sustancias colorantes, también llamadas cromógenos<sup>1,2</sup>. Dentro de las modalidades de blanqueamiento existe la profesional aplicada en el consultorio y la domiciliaria con control profesional. Dentro de las sustancias aplicadas el peróxido de hidrógeno en sus diferentes concentraciones es uno de los más empleados<sup>10</sup>. El peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) es un agente oxidante altamente reactivo de presentación líquido claro, sin color ni olor, altamente soluble en agua, inestable y cáustico<sup>9</sup>. Su peso molecular es bajo, lo que facilita su elevado poder de difusión a través de los tejidos. Al entrar en contacto con la saliva el peróxido de hidrógeno se disocia en oxígeno y radical hidroxilo (HO), siendo el oxígeno el responsable del efecto blanqueador, actuando como agente oxidante formando radicales libres, aniones de peróxido de hidrógeno y moléculas de oxígeno reactivo, los cuales son los encargados de romper los dobles enlaces de las cadenas presentes en los cromóforos para hacerlos partículas pequeñas, mediante un proceso de óxido – reducción<sup>2</sup>.

En fases posteriores de la oxidación por el blanqueamiento, se llega a un punto donde solo existe la estructura hidrofílica incolora o punto de saturación del material, en donde la característica principal es la no modificación del color de los dientes, se interrumpe el proceso y la cantidad de blanqueamiento logrado. Si se sobrepasa esta fase, se empiezan a degradar las cadenas de carbono de las proteínas de otros materiales que contengan carbón para posteriormente convertirse en dióxido de carbono y agua. Se produce una oxidación completa de la matriz del esmalte, lo torna poroso y frágil. Vargas-Koudriavtsev<sup>3</sup> y col concluyen que el blanqueamiento dental con peróxido de hidrógeno al 14% produjo una pérdida de fosfato dental continua a lo largo de las cuatro semanas de tratamiento y representó una pérdida mineral de aproximadamente 22%. Baiping F. y col, observaron que los blanqueamientos dentales causan alteraciones micro y nanomorfológicas en la superficie del esmalte, reducen significativamente el grosor del barro adamantino en esmalte desgastado, y además, postulan que la matriz orgánica del esmalte es fácilmente movilizada por el ataque de los radicales libres, causando micro cráteres<sup>5</sup>. Tezel H. y Özata F, concluyeron que el uso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 35% activado con luz y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 38% aplicado en las superficies del esmalte por 15 minutos 3 veces al día, durante 3 días causa desmineralización por pérdida de iones de calcio<sup>6</sup>. Un estudio realizado por Hegedüs C. y col en 1999, observaron con microscopía de fuerza atómica que dientes tratados con peróxido de hidrógeno al 35%, presentan en la superficie del esmalte ranuras de mayor profundidad en comparación con especímenes control, por lo que concluyó que el peróxido de hidrógeno es capaz de penetrar en el esmalte, y su capacidad oxidativa tiene un mayor efecto en la subsuperficie del esmalte donde se encuentra una mayor concentración de material orgánico, produciendo alteraciones sobre ésta.<sup>8</sup> Mancera C y col concluyen que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 38 % modifica la microestructura del esmalte in-vitro, con una

perdida mineral del 50% de calcio y 39 % de fosfato<sup>1</sup>. El fosfato ejerce una acción cariostática, es decir, reduce la solubilidad del esmalte y actúa como un búfer en la neutralización de los valores de pH de la saliva, la placa bacteriana y los alimentos. También, interfiere con los procesos enzimáticos en la superficie del esmalte para aumentar la resistencia del huésped, disminuir la adhesión bacteriana e interferir en la síntesis de formación de polisacáridos extracelulares. La disminución estructural de la microdureza del diente puede ser atribuida a la degradación de la superficie como resultado del proceso oxidativo de los radicales libres. La microdureza está directamente relacionada con el contenido de minerales del esmalte, por tanto una pérdida del grupo de fosfato puede alterar esta propiedad en el esmalte. Se produce una alteración de la rugosidad de la superficie y grietas más profundas, así como aumento de la porosidad de la superficie. Según Zeczkowski en 2015 menciona, "las alteraciones del esmalte después de un blanqueamiento dental son proporcionales al tiempo de tratamiento y la concentración de peróxido de hidrógeno empleada". Este efecto no deseado puede beneficiar la adherencia de microorganismos<sup>7</sup>.

También se estudió que el uso continuo de los peróxidos puede alterar la flora y favorecer el crecimiento de *Candida albicans* e hipertrofia de las papilas<sup>9</sup>. La *Candida albicans* es un miembro frecuente de la microflora bucal, aislándose entre el 30 al 50 % de la población. Su taxonomía es la siguiente.

**Reino:** Hongos

**División :** *Deuteromycota*

**Clase:** *Blastomycetes*

**Familia:** *Cryptococcaceae*

**Género:** *Candida*

**Especies:** *albicans*

*C. albicans* suele presentarse como una célula oval levaduriforme de 2 a 4 micras, con paredes finas; sin embargo, en tejidos infectados también se han identificado formas filamentosas de longitud variable, con extremos redondos de 3 a 5 micras de diámetro y pseudohifas<sup>10</sup>. Entonces puede crecer en al menos tres morfologías diferentes: levadura, pseudohifas e hifas. Existen otras formas morfológicas durante el cambio de colonias; por ejemplo, las células de la fase opaca son oblongas, en lugar de la forma ovalada de las células de levadura. Las pseudohifas y las hifas son alargadas y, a veces, no se puede distinguirlas, ya que ambas son "formas filamentosas" del hongo. Las levaduras o blastosporas son microorganismos eucarióticos, las cuales se reproducen asexualmente por un proceso específico de división celular conocido como gemación. Este proceso de división implica la producción de nuevo material celular proveniente de la superficie de la blastospora .

La cavidad bucal posee muchos nichos para la colonización por parte de esta especie, incluyendo entre otras células epiteliales, prótesis dental y células bacterianas de la flora bucal residente<sup>5</sup>. Para colonizar, los hongos primero debe adherirse ya sea a la células, tejidos o la superficies de biomateriales que son cubiertas con una película acondicionante de glicoproteínas, que en el caso de la cavidad bucal proviene de la saliva primordialmente o de los diferentes tipos de bacterias .En este sentido, se ha sugerido que en los mecanismos de adherencia están involucradas interacciones entre los ligandos de *Candida* y los receptores de las células hospederas. Su pared celular es una estructura dinámica y fluida que cambia constantemente su composición. Se compone principalmente de polisacáridos (mananos fosforilados, glucanos y quitinas), polipéptidos y proteínas. Los residuos de manano se unen a la pared celular a través de O- y N-glicosilación y la estructura de estos puede variar si las

condiciones cambian de pH y temperatura. Los  $\beta$ -glucanos están en la pared pero más internamente que los mananos. Las paredes celulares de los lípidos están representadas principalmente por fosfolípidos y esteroides, y por ergosterol<sup>11,12</sup>. Estos lípidos proporcionan el sitio de acción para la síntesis de enzimas involucradas en el desarrollo de la estructura/forma de la pared celular (morfogénesis) y son el objetivo de muchos antifúngicos. Los polipéptidos y las proteínas, al unirse a los polisacáridos de la pared celular, crean muchas diferencias interespecies e intraespecies con respecto a las propiedades hidrofóbicas, la capacidad de adhesión (a las células huésped u otras superficies) y la estructura antigénica. Por lo tanto, la expresión de los componentes macromoleculares de la pared celular también varía dentro de la misma célula para darles diferentes funciones en diferentes partes. La adhesión a la célula huésped se produce entonces principalmente con adhesinas (ALS1, ALS5, HWP1 e INT1 son las más importantes), proteínas de membrana que se unen con fibrinógeno o lamininas de la matriz extracelular de la membrana celular. La adhesión a la superficie celular ocurre con cargas electrostáticas y fuerzas de Van der Waals<sup>11</sup>. La hidrofobicidad de la membrana celular fúngica contribuye de manera importante a la adhesión a sustratos inertes y esta característica podría ser conferida por la glicosilación de las manoproteínas de superficie. Los mananos presentes en la superficie contribuyen a la virulencia al otorgar hidrofobicidad, cambiar la capacidad de adherencia a la célula huésped y suprimir la respuesta inmunitaria. La pared celular tiene tres tipos de moléculas para la adhesión: (a) una glicoproteína que pertenece a la familia de las 2 integrinas, (b) una porción de proteína de una glicoproteína y (c) una porción de polisacárido de una manoproteína<sup>13</sup>.

Se destaca como factor de virulencia, la formación de biopelículas que se desarrollan en la superficie de los objetos (catéteres, etc.). La formación de biopelículas puede ocurrir en una primera fase en la que las células se adhieren a la superficie del cuerpo extraño y forman una capa de células y aumentan la síntesis y producción de proteínas de la pared hifa; luego se produce un crecimiento celular activo, se produce una matriz extracelular y se forman hifas que estabilizan el biofilm<sup>13</sup>. La hifa es la etapa final, ya que en algunas condiciones permanecerá como una forma de levadura debido a la presencia de moléculas de detección de quórum, como el farnesol, para permitir la diseminación de *Candida albicans*. La biopelícula brinda protección a las células de levadura contra el sistema inmunológico del huésped y resistencia a los medicamentos. Estudios sobre interacciones entre *S. mutans* y *C. albicans* explica que las exoenzimas conocidas como glucosiltransferasas (GtfB) de la bacteria también pueden unirse directamente a la superficie de *C. albicans*, lo que le permite adherirse a las superficies dentales y dar lugar a la formación de biopelículas mixtas; además, se ha demostrado que GtfB aumenta la expresión de los genes *HWP1*, *ALS1* y *ALS3* que codifican importantes adhesinas en *C. albicans*<sup>12,13</sup>.

Las colonias de *Candida* crecen "in vitro" en condiciones de aerobiosis en medios de cultivo a pH con rango entre 2,5 y 7,5 y temperatura que oscila entre 20°C y 38°C.<sup>14</sup> Las especies de *Candida* crecen bien en medios de cultivo con agar, peptona, dextrosa, maltosa o sacarosa. Las colonias muy pequeñas aparecen en un lapso de 24 a 36 horas en Agar Sabouraud y miden de 1,5 a 2 mm de diámetro después de 5 a 7 días, son lisas, suaves, húmedas y de color y aspecto cremoso, con aspecto de levadura, de consistencia blanda y rápidamente proyectan filamentos hasta la profundidad del agar. Las colonias son típicamente blancas por completo, pero adquieren un color crema o requemado al continuar envejeciendo. Para aislarlas de las muestras clínicas que siempre llevan bacterias se agregan antimicrobianos como el Cloranfenicol al medio simple. Después de 4-5 días se percibe un olor característico de

levadura. Otros medios de cultivo en los cuales puede crecer *C. albicans* son: Pagano-Levin, en el cual las colonias se observan de color crema, Albicans ID (Biomérieux), donde las colonias se observan de color azul y CHROMagar® Candida (CHROMagar), observándose las colonias de esta especie de color verde.

Como se expuso anteriormente *C. albicans* posee elementos necesarios para adherirse y comenzar la colonización, pero hay poco conocimiento sobre como el blanqueamiento dental interviene en la colonización de *Candida*. Es por ello que este estudio tiene como objetivo determinar si el blanqueamiento dental con peróxido de hidrogeno al 35% aumenta la adherencia de *C. albicans* a la superficie del esmalte.

## HIPÓTESIS

Hipótesis de trabajo: El esmalte sometido a blanqueamiento con peróxido de hidrógeno al 35 % de uso profesional tendrá mayor adherencia a *Candida albicans*.

Hipótesis nula: El esmalte sometido a blanqueamiento con peróxido de hidrógeno 35 % de uso profesional tendrá menor adherencia de *Candida albicans*.

## OBJETIVOS

General: determinar si el blanqueamiento dental con peróxido de hidrogeno al 35% aumenta la adherencia de *C. albicans* a la superficie del esmalte.

Específicos:

1. Cuantificar adherencia de *C. albicans* a esmalte, mediante el método de conteo manual de unidades formadoras de colonias.
2. Conocer composición detallada de agentes blanqueadores en estudio.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Diseño de estudio:** Experimental, Analítico y Longitudinal (el análisis se realizó en un periodo de 72 hs).

**Población:** Premolares extraídos sanos de pacientes entre 13 y 35 años, con un tiempo post-extracción menor a 6 meses con indicación de ortodoncia.

### Criterios de inclusión:

- Premolar de individuo hombre o mujer entre 13 y 35 años.
- Premolar sano extraído por indicación diagnóstica ortodóntica, con menos de 6 meses post extracción.

### Criterios de exclusión

- Premolar con dentina expuesta.

- Premolar con pigmentaciones o manchas blancas.
- Premolar con malformaciones en su estructura.

**Muestra:** la muestra consta de 20 premolares superiores o inferiores sanos extraídos por indicación de ortodoncia, de pacientes entre 13 a 35 años, con un tiempo de post-extracción de 6 meses. Los cuales fueron divididos en dos grupos: control (P1) y los expuestos (P2).

**Ensayo Piloto:** se realizó un ensayo piloto con 10 premolares (5 control- 5 experimental) para experimentar la forma de recolección y siembra de los dientes a la capsulas de Petri, la recolección debía hacerse únicamente de la cara vestibular de la pd tratadas, a diferencia de tomar la muestra de una disolución. Los pasos de estudio piloto fueron:

- 1) Profilaxis de pd con brocha y agua
- 2) Blanqueamiento siguiendo la indicaciones del fabricante con Clarident-X, posterior lavado
- 3) Esterilización de ambos grupos, en autoclave 100° por una hora.
- 4) Se preparó tubos de ensayo con 15 ml agua destilada estéril a la cual se inoculo *Candida albicans* con inculo de grado 0,5 con respecto a la escala de McFarland. Se introdujo una pd por tubo. Tiempo de incubación de 48 hs.
- 5) Posteriormente se retiraron los pd y se tomó de la cara vestibular con hisopos, para siembra en capsulas de Petri con agar sabouraud glucosado, cada hisopo fue descartado. Tiempo de incubación 48 hs
- 6) Recuento de colonias. Se observó múltiples colonias las cuales no pudieron ser cuantificadas.

Resumen Errores de Estudio Piloto:

- Ausencia de centrifugado: en la boca hay movimiento de labios, lengua, alimentos y cepillado el cual puede ser correcto o no. Al centrifugar podría desprenderse cepas, lo cual simularía en tentativa los movimientos fisiológicos de la cavidad oral.
- Recolección de muestra: la toma fue tan excesiva que la misma no pudo cuantificarse.
- Tiempo de incubación: en un lapso de 36 horas, ya se podían visualizar colonias.

### **PROTOCOLO FINAL para Estudio Preliminar**

**Obtención y conservación de la muestra:** conforme lo detallado en los criterio de inclusión, las piezas dentarias luego de ser extraídas se lavan con agua y jabón neutro con cepillo de cerdas medias eliminando saliva y sangre sin afectar estructuras orgánicas e inorgánicas; ya que los jabones neutros, tienen PH similar a la saliva (7.2 a 7.4) que difícilmente afectan el diente<sup>16</sup>. Posteriormente se curetea su raíz con curetas de Gracey Hu Friedy nº 7-8, para retirar restos orgánico del ligamento periodontal y sarro. Se practica profilaxis con brocha y agua en toda su superficie, se secan con papel absorbente y se almacenan en seco, en un recipiente hermético estéril bajo refrigeración 4 ° para reducir el crecimiento bacteriano. El almacenamiento de los dientes es uno de los procesos más importantes para conservar sus propiedades físicas, químicas y mecánicas para no alterar los resultados de investigaciones. Al momento de iniciar el método experimental se rehidratan en solución fisiológica estéril debido a que cuando pasan mucho tiempo fuera de boca, se resecan y se vuelven quebradizos, pierden su textura y dureza<sup>17</sup>.

**Profilaxis y Acondicionamiento:** la formación de los grupos es al azar, el grupo control queda inmerso en agua destilada estéril dentro de recipientes estériles colocados dentro de una estufa a 37°C hasta su posterior evaluación (ANEXO N° 1). Mientras que al grupo experimental se le aplica el agente blanqueador de la siguiente forma:

- 1) Lavaje con brocha, pasa profiláctica Dent-brill Pre Fluor marca Dickinson y agua.
- 2) Exposición de peróxido de Hidrogeno al 37 % como indica el fabricante, tres aplicaciones en capas de espesor uniforme de 1 mm.( ANEXO N° 2)
- 3) Retiro de agente y lavado con agua destilada, secado con papel absorbente.(ANEXO N° 3)
- 4) Se colocan las pd en recipientes de vidrio de cierre hermético estériles con agua destilada estéril para ser esterilizados.

Ambos grupos serán esterilizados en autoclave a 100°C por un periodo de 60 minutos, ya que el uso de autoclave a 115 °C por 40 minutos, no es recomendado dado que en pruebas mecánicas, genera pérdida de minerales<sup>16</sup>. Por arriba de los 100 ° el esmalte se ve afectado en su estructura. Dado que el esmalte presenta un alto contenido inorgánico representado en fosfato octacálcico en forma de cristales de hidroxiapatita de calcio y un escaso contenido orgánico y de agua que sufre combustión y evaporación respectivamente, el aumento de temperatura altera la organización de dichos cristales aumentando su cohesión (contracción térmica), lo que genera la aparición inicial de fisuras y grietas que le proporcionan un aspecto cuarteado y que finalmente ocasionan su fractura<sup>18</sup>.

#### **Exposición de la cepa:**

- Obtención de la cepa: del laboratorio se obtiene una capsula de Petri con la colonia de microorganismo, se aplicaran repiques para mejorar las condiciones de la cepa. Los repiques o trasplantes, consisten en colocar al microorganismo ya aislado o en vías de aislación en un nuevo medio de cultivo a fin de conservarlo a través del tiempo, lo que permitirá realizar diferentes estudios.
- Preparación y estandarización del inóculo: Transcurrido el tiempo de incubación, con la ayuda de un asa bacteriológica se toma una muestra del cultivo inicial y se diluye dentro de un tubo de ensayo con 15 ml de solución fisiológica estéril, el cual luego se agita durante 30 segundos hasta obtener una turbidez semejante al tubo número 0,5 del Nefelómetro de Mc Farland, cuya concentración bacteriana es de  $1,5 \times 10^8$  UFC/ml . Esta comparación se lleva a cabo visualmente utilizando un fondo blanco con líneas negras contrastantes y fuentes de luz adecuada. El inóculo preparado se utiliza inmediatamente después de su preparación.
- Exposición: Se inocular 0.1 ml de la cepa diluida en dos frascos estériles con 15 ml de solución fisiológica estéril uno del grupo control y otro del grupo experimental. Luego, se incuban en una estufa a 37°C por 36 horas. (ANEXO N° 4 y 5)

**Siembra:** Transcurrido este tiempo de incubación, se sacan las piezas dentarias de dichos frascos y se lavan con solución fisiológica estéril. Luego se toma cada pieza dentaria con una pinza de algodón y se extrae con un microbrush estéril de la cara vestibular en forma de zigzag sobre la superficie del esmalte (ANEXO N°6). Se corta la punta de microbrush colocándola en un tubo de solución fisiológica estéril, se centrifuga a 3000 rpm, se toma con micropipeta de 7 microlitros del sobrenadante y se siembra estriando con asa de anillo calibrada. Se

plaquetera en placas Petri conteniendo Agar Sabouraud, estriando la muestra sobre toda la superficie del agar (ANEXO N° 7 Y 8) .Se dejan reposar por unos minutos para que la muestra se seque y luego se voltean de posición para ser incubadas en una estufa por 36 horas a 37 ° (ANEXO N° 9 y 10)

**Recuento de Unidades Formadoras de Colonias (UFC):** después del tiempo transcurrido, se procede a la evaluación de la adherencia de cada premolar por grupo mediante el recuento de Unidades Formadoras de Colonias de la placa Petri a través de la observación macroscópica y con la ayuda de una lupa (ANEXO N° 11 y 12). Se emplea la técnica de conteo manual para obtener el número de Unidades Formadoras de Colonias, para lo cual la placa Petri se dividió en cuatro cuadrantes, de los cuales se seleccionó un área de 1 cm representativo por cuadrante. La suma del número de colonias obtenido de cada área de los cuatro cuadrantes se dividió entre el número de cuadrantes, y el resultado se multiplica por el inverso de la dilución y por el volumen de siembra usado. Por medio de cálculos matemáticos se obtiene el número de Unidades Formadoras de Colonias por 1 ml (UFC/ml).

#### Resumen del Protocolo

|                                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|----------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Obtención y almacenamiento</b>                  | <b>Luego de ser extraídas se lavan con agua y jabón neutro con cepillo de cerdas medias. Se almacenan en seco, en un recipiente hermético estéril bajo refrigeración 4 °.</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| <b>Profilaxis, blanqueamiento y esterilización</b> | <b>Lavaje con brocha, pasa profiláctica Dent-brill Pre Fluor marca Dickinson y agua.<br/>Exposición del grupo experimental de peróxido de Hidrogeno al 37 % como indica el fabricante, tres aplicaciones en capas de espesor uniforme de 1 mm. Esterilización en autoclave 100 C°.</b>                                                                                                                                                                                                      |
| <b>Exposición a la cepa</b>                        | <b>Se toma una muestra del cultivo inicial y se diluye dentro de un tubo de ensayo con 15 ml de solución fisiológica estéril, el cual luego se agita durante 30 segundos hasta obtener una turbidez semejante al tubo número 0,5 del Nefelómetro de Mc Farland. Se inoculara 0.1 ml de la cepa diluida en dos frascos estériles con con 15 ml de solución fisiológica estéril uno del grupo control y otro del grupo experimental. Luego, se incuban en una estufa a 37°C por 36 horas.</b> |
| <b>Siembra</b>                                     | <b>Con la punta de microbrush colocándola en un tubo de solución fisiológica estéril, se centrifuga a 3000 rpm, se toma con micropipeta de 7 microlitros del sobrenadante y se siembra estriando con asa de anillo calibrada.</b>                                                                                                                                                                                                                                                           |
| <b>Recuento de UFC</b>                             | <b>Técnica de conteo manual con lupa.</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |

#### ANÁLISIS DE DATOS Y RESULTADOS

Los resultados fueron almacenados en Excel y procesados por medio de sistema de complementos real statistics de Excel (ANEXO N° 13). Se aplicó la prueba Shapiro-Wilk para evaluar la normalidad de la distribución de la variable UFC en cada grupo. El resultado arrojó

que la distribución es normal en ambos casos. Grupo control ( $W= 0,951$ ;  $p= 0,675$ ); Grupo experimental ( $W= 0,979$ ;  $p= 0,958$ )-. (ANEXO N° 14 y 15).

Como los datos corresponden a una distribución normal se aplicó una prueba de varianzas para determinar si las mismas eran iguales o no. Prueba de F se utiliza para comparar directamente las varianzas de dos muestras. Si el valor p de la prueba es mayor que el nivel de significancia (generalmente 0.05), no se rechaza la hipótesis nula de que las varianzas son iguales. El resultado mostró que las variables son similares  $F= 0,342$ ;  $p= 0,063$ . (ANEXO N° 16)

| Prueba F para varianzas de dos muestras |                          |                               |
|-----------------------------------------|--------------------------|-------------------------------|
|                                         | <i>GRUPO control UFC</i> | <i>grupo experimental UFC</i> |
| Media                                   | 70,2                     | 58,5                          |
| Varianza                                | 110,1777778              | 322,5                         |
| Observaciones                           | 10                       | 10                            |
| Grados de libertad                      | 9                        | 9                             |
| F                                       | 0,34163652               |                               |
| P( $F \leq f$ ) una cola                | 0,062687547              |                               |
| Valor crítico para F (una cola)         | 0,314574906              |                               |

Debido a que se comprobó la normalidad de las distribuciones y la homogeneidad de varianzas fue posible aplicar la prueba t de Student para muestras independientes.

El resultado mostró que la diferencia en la cantidad promedio de UFC en ambos grupos es estadísticamente significativa  $t= 1,779$ ;  $p= 0,046$ . (ANEXO N° 17)

| Cantidad de UFC |                          |                               |
|-----------------|--------------------------|-------------------------------|
|                 | <i>GRUPO control UFC</i> | <i>grupo experimental UFC</i> |
| Media           | 70,2                     | 58,5                          |
| Varianza        | 110,1777778              | 322,5                         |
| Observaciones   | 10                       | 10                            |
|                 |                          |                               |

El resultado de la prueba de T- student, pone en evidencia que el *p valor* de 0,04 es significativamente estadístico, por lo que podemos pensar que esa diferencia entre grupo control y experimental existe, y que en cuyo caso se dio mayor adherencia de *Candida albicans* en el grupo control en comparación con el grupo experimental.

## DISCUSIÓN

El blanqueamiento dental es un procedimiento estético con alta demanda que se ha investigado desde sus inicios. Los agentes oxidantes más utilizados en odontología, para lograr el efecto blanqueador, son peróxido de hidrógeno y peróxido de carbamida en distintas concentraciones y forma de presentación<sup>19</sup>. El uso de estos agentes oxidantes, ha demostrado utilidad para mejorar clínicamente las condiciones estéticas de piezas dentarias con pigmentaciones endógenas y exógenas, sin embargo, los fundamentos bioquímicos del blanqueamiento de estas pigmentaciones no se han dilucidado con precisión, así como tampoco el efecto de estas moléculas oxidantes sobre la organización estructural y molecular de las piezas dentarias. Estudios realizados sobre el efecto del peróxido de hidrógeno, respecto a los cambios morfológicos producidos sobre los tejidos dentarios son contradictorios, sin embargo por lo general concuerdan en que el peróxido de hidrógeno puede alterar el contenido mineral de la pieza dentaria. El uso de peróxido de hidrógeno para blanqueamiento, produce una liberación de iones de calcio y fosfato, los cuales aumentan a medida que aumenta la concentración del peróxido.

Los estudios que refieren su efecto en correlación a adhesión de microorganismos, datan desde su origen en 1989 por Haywood y Heymann<sup>19</sup>. Los resultados obtenidos por Hosoya<sup>20</sup> y Anggakusuma<sup>21</sup>, concluyen que la adhesión bacteriana aumenta tras el uso del peróxido de hidrógeno al 35% y peróxido de carbamida al 35%, respectivamente. Comparando el peróxido de hidrógeno al 35% con sus otras concentraciones, los resultados son similares a los obtenidos por Al-Jubori<sup>22</sup> y Romero<sup>23</sup>, quienes encontraron que el peróxido de hidrógeno al 7.5% aumenta significativamente los índices de adherencia bacteriana. Suttinee<sup>31</sup> comprueban que formación de biopelículas de *S. sanguis* fue significativamente mayor en las muestras de esmalte blanqueadas con peróxido de hidrógeno al 35% que en otros tratamientos, pero fue menor en las blanqueadas con peróxido de hidrógeno al 25%.

Podemos atribuir estos resultados a la serie de alteraciones que se presentan en el esmalte sometido a agentes de blanqueamiento dental<sup>23,2,15,18</sup>. Estos pueden modificar sus características superficiales<sup>9</sup>, dejándolo más susceptible a la adherencia bacteriana. Asimismo, al alterar químicamente los sitios de unión a la membrana de esta superficie incrementarían la adherencia bacteriana en el esmalte<sup>24</sup>. Uno de los efectos desfavorables del blanqueamiento dental es la erosión del esmalte debido a su desmineralización, lo que causa una mayor rugosidad en la estructura dental<sup>24</sup>. La rugosidad superficial se considera como un factor predisponente para la adherencia bacteriana por su importante rol en el desarrollo del biofilm de las bacterias orales. Según la literatura una superficie rugosa puede actuar como amortiguador en contra de las fuerzas de corte e incrementar el área disponible para la formación de biofilm, promoviendo así la adherencia bacteriana<sup>25</sup>.

Este estudio tuvo como objetivo comprar la adhesión de *C. albicans* entre dos grupos. Los resultados de este estudio arrojaron que el grupo control tiene mayor adhesión de dicho microorganismo. Esta discrepancia se debería a la continua liberación de peróxido por parte de los productos blanqueadores, lo que ocasionaría un cambio en el balance biológico existente dentro la cavidad oral. Asimismo, se ha reportado que la liberación de oxígeno por parte del peróxido de hidrógeno tiene un efecto antibacteriano y una acción mecánica sobre la

placa dental<sup>27</sup>. Esto fue similar para Zheng<sup>26</sup>, que observó crecimiento de biofilm a partir de la tercera semana, antes de ello lo encontró disminuido. Por otro lado, Ittatirrut<sup>27</sup>, no encontró un aumento en la formación de biofilm tras este método de blanqueamiento dental con peróxido de hidrógeno al 35%. Michelle<sup>35</sup> en ensayo controlado doble ciego sobre la acción de tres agentes blanqueadores en la microbiota oral, concluyo que esta se mantuvo estable a los largo del tratamiento. Al igual Alkmin<sup>36</sup> evaluó los efectos in vivo de los agentes blanqueadores que contienen peróxido de carbamida al 10% y peróxido de hidrógeno al 7,5% sobre *Streptococcus mutans* durante el blanqueamiento dental, concluye que no hubo cambios en los recuentos del microorganismo. Esto podría explicarse por la acción de la lactoperoxidasa salival, una enzima oral, que cataliza la reacción entre el tiocianato y el peróxido de hidrógeno, produciendo hipotiocianato, que es mucho menos tóxico que el peróxido de hidrógeno para las bacterias, protegiendo a los estreptococos contra el peróxido de hidrógeno. Philippe<sup>35</sup> en el estudio in vitro comparativo de la acción de la lactoperoxidasa en la formación de productos finales para prevenir la formación de biopelículas de *Candida*, concluye que en presencia de peróxido de hidrogeno esta enzima con sus productos finales son activas contra la formación de biopelículas. Tabata V.<sup>29</sup> reportaron que la aplicación de peróxido de hidrogeno puede alterar la organización de la matriz extracelular, además de la desarticulación de la matriz con células fúngicas dispersas posterior aplicación de peróxido de hidrogeno en biopelículas de *C. albicans* en comparación con su grupo control. Otros estudiaron su uso como antimicrobiano en prótesis removibles<sup>38,40,41</sup>, como desinfectante<sup>39</sup> cuya concentración del agente era directamente proporcional a su efecto citotóxico sobre *Candida*, que puede ser en combinación con otros químicos o su empleo adyuvante a la terapia fotodinámica para el tratamiento antimicrobiano periodontal<sup>41,43</sup>. Ferguson<sup>44</sup> determino en un estudio in-vitro que la concentración inhibitoria mínima (CIM) de peróxido de hidrogeno para *Candida* fue de <0,63 µg/ml. Mc Donnell<sup>37</sup> concluye que H2O2 en forma acuosa con agua como vehículo se emplea como buen conservante, como antimicrobiano en la piel, incluidas las heridas, y en superficies inanimadas. Se han realizado avances tecnológicos recientes en la formulación de peróxido con otros productos químicos para mejorar la actividad antimicrobiana a concentraciones más bajas del agente activo para desinfección y esterilización. Nipomoga<sup>32</sup> concuerda con la mayor sensibilidad de *C. Albicans* a la acción antimicrobiana de los agentes blanqueadores. Por lo contrario Oliveira<sup>44</sup> en otro estudio sobre la actividad antimicrobiana de 4 agentes blanqueadores sobre 6 patógenos orales, *C. albicans* resulto ser uno de los más resistentes. La literatura relacionada con el efecto antimicrobiano del H2O2 es controvertida. Para explicar por qué el grupo control (sin blanqueamiento) tuvo más adhesión de *Candida* que el grupo experimental (con H2O2) hace falta más estudios.

Para estudios futuros podemos sugerir aumentar el tamaño de la muestra. El resultado de este estudio está limitado por el uso de dientes humanos extraídos, lo cual inherentemente diferirá de los dientes vitales en el ambiente oral. Para este ensayo se tomó como muestras premolares sanos extraídos por indicación ortodoncia de pacientes entre 15 y 35 años. Otros estudio emplearon terceros molares<sup>20,24,26</sup>, otros diente bovinos<sup>21,27</sup>. Los protocolos de obtención y almacenamiento fueron muy variados en la literatura. Por la falta de estudios previos elaboramos un protocolo para determinar cómo obtener y almacenar las muestras de dientes, ya que carecemos de un biobanco para estudios en la Argentina. El protocolo de obtención y almacenamiento se redactó a partir de la búsqueda bibliográfica, pero no podemos determinar que ejecutamos el más correcto, asumiendo que puede atribuirse un error de sesgo a esta instancia del estudio. A partir del protocolo inicial desarrollamos un

ensayo piloto. Pasando en limpio los datos obtenidos ajustamos el protocolo para el estudio final. Asimismo, no se contó con estudios actualizados sobre el efecto del blanqueamiento aplicado profesionalmente con peróxido de hidrógeno al 35% en la adherencia de *C. albicans* a la superficie dental. La valoración por medio el recuento de UFC, es un método semi cuantitativo que se emplea regularmente para determinar el número de microorganismos viables que hay en una muestra. Hosoya<sup>20</sup> emplea la microscopia electrónica de barrido para cuantificar el número de colonias de *S. mutans*, este método ofrece ventajas. En cuanto a la elección de la cara vestibular de la piezas dentarias seleccionas se decidió a partir de que Brosh<sup>30</sup> et al. descubrieron en su examen con microscopio electrónico de barrido (SEM) de dientes no tratados mostró que las crestas horizontales pronunciadas o periquimas recorren continuamente la superficie bucal del diente, mientras que en la superficie lingual aparecían en menor grado o no en absoluto. Además, su examen con SEM después del procedimiento de grabado ácido mostró que la superficie lingual tenía un patrón macro más liso, microporos más pequeños y una apariencia ondulada menos pronunciada después del acondicionamiento, por lo que se pudo desarrollar un menor entrelazamiento mecánico entre la resina y el esmalte. Los autores plantearon la hipótesis de que la apariencia más lisa de la superficie lingual estaba influenciada por el contacto continuo de la lengua o la presencia de glándulas salivales . Por lo tanto, la estimación del blanqueamiento dental y adherencia de *C. albicans* debía tomarse solo la cara vestibular. Sumado a lo anterior en la práctica profesional se aplica el agente en la cara vestibular de las piezas por lo que solo consideramos de interés la cara vestibular de las piezas dentarias seleccionadas tanto del grupo control como experimental.

## CONCLUSIÓN

Según los resultados obtenidos, podemos concluir que hubo mayor adherencia de *C. alicans* en el grupo control, ya que, al compararlo con el grupo experimental, hubo una diferencia estadísticamente significativa respecto a la adherencia de *C. albicans* ( $p=0,04$  T.Student). Este hallazgo podría explicarse por acción antimicrobiana del agente blanqueador.

Cabe destacar la originalidad del procedimiento empleado en el ensayo, ya que el protocolo utilizado en el este estudio no fue puesto a prueba por ningún otro investigador, su optimización se basó en literatura y otros ensayos cuyos objetivos eran similares al de este estudio.

Sugerimos para estudios posteriores aumentar el tamaño de la muestra para la comparación de grupos con diferentes concentraciones del agente blanqueador como así también disponer de Microscopio Electrónico de Barrido (1000X y 1500X) para el análisis de superficie post blanqueamiento, lo que sería de mucho interés.

Este trabajo fue un ensayo preliminar, podemos concluir que hace falta más estudios que comparen adherencia de *C. albicans* posterior al blanqueamiento profesional utilizando peróxido de hidrogeno al 35 % en esmalte dental.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Mancera CAG, Cornejo PMA, Méndez MR, et al. Efecto del blanqueamiento con peróxido de hidrógeno al 38% sobre la microestructura del esmalte dental. *Oral*. 2011;12(36):687-690..
2. Dahl J, Pallesen U. Tooth bleaching- A critical review of the biological aspects. *Crit Rev Oral Biol Med* 2003;14(4):292-304
3. Vargas-Koudriavtsev T, Durán-Sedó R, Sáenz-Bonilla P, et al. Efecto de agentes de blanqueamiento dental sobre la concentración de fosfato en el esmalte dental por medio de espectroscopia Raman. *Rev Odont Mex*. 2015;19(4):232-239.
4. Baiping Fu, Wiebke Hot-Hanning, Matthias Hanning. Effects of dental Bleaching on micro- and nano-morphological alterations of the enamel surface. *Am J Dent* 2007 Feb; 20 (1) : 35-40.
5. Zanolla, J., Marques, A., da Costa, D. C., de Souza, A. S., & Coutinho, M. Influence of tooth bleaching on dental enamel microhardness: a systematic review and meta-analysis. *Australian dental journal*, (2017). 62(3), 276–282.
6. Wasserman Milhen I, Cardona Silva AM, Fernandez Correa DM, Mejia Ayala JA. Efectividad y estabilidad del blanqueamiento dental, una revisión sistemática. *Rev. salud. bosque*. 8 de agosto de 2015;4 (2):7-18.
7. Tezel H, Özata F. Effect of bleaching agents on calcium loss from the enamel surface. *Quintessence* 2007 April; 38 (4): 339-347.
8. Zeczkowski, M. Effect of different storage conditions on the physical properties of bleached enamel: An in vitro. Elsevier, (2015). 1154-1161.
9. Hegedüs C, Bistey T, Flóra-Nagy, Keszthelyi G, Jenei A. An atomic force microscopy study on the effect of bleaching agents on enamel surface. *J Dent* 1999; 27:509-515.
10. Sudbery, P., Gow, N., & Berman, J. (2004). The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends in microbiology*, 12(7), 317–324.
11. Barrancos PJ. *Operatoria Dental. Avances clínicos, restauraciones y estética*. 5th ed. PANAMERICANA EM, Panamericana; 2015. Capítulo 34. Pág. 975
12. Mata de Henning M, Perrone M. La Prótesis Odontológica en la Ecología de *Candida Albicans* en Cavidad Bucal. *Acta odontol. venez* [Internet]. 2001 Dic ; 39( 3 ): 18-24.
13. Di Cosola M, Cazzolla AP, Charitos IA, Ballini A, Inchingolo F, Santacroce L. *Candida albicans* and Oral Carcinogenesis. Una breve reseña. *Journal of Fungi* . 2021;7(6):476.

14. Hwang G, Marsh G, Gao L, Waugh R, Koo H. Binding Force Dynamics of Streptococcus mutans–glucosyltransferase B to Candida albicans. Journal of Dental Research. 2015;94(9):310-317.
15. Montelongo-Jauregui D, Lopez-Ribot J. Candida Interactions with the Oral Bacterial Microbiota. Journal of Fungi .2018;4(4):122.
16. Elba Inés Cardozo-Germán Pardi. Algunas consideraciones sobre Candida Albicans como agente etiológico de candidiasis bucal. Acta odontol. venez . 2002 ; 40( 1 ): 9-17.
17. Petkova Gueorguieva de Rodríguez M. Efectos clínicos y estructurales del blanqueamiento dental. Odon. Sanmarquina. 2005.;8(2):34-6.
18. Shamel, M., Al-Ankily, M. M., & Bakr, M. M. Influence of different types of whitening tooth pastes on the tooth color, enamel surface roughness and enamel morphology of human teeth. (2019). *F1000Research*, 8, 1764.
19. Monterubbianesi, R., Tosco, V., Bellezze, T., Giuliani, G., Özcan, M., Putignano, A., & Orsini, G. A Comparative Evaluation of Nanohydroxyapatite-Enriched Hydrogen Peroxide Home Bleaching System on Color, Hardness and Microstructure of Dental Enamel. Materials Basel, Switzerland. 2021, 14, 3072.
20. Goldstein RE, Lancaster J. Survey of patient attitudes toward current esthetic procedures. J Prosthet Dent. 1984; 2:775. Colon P. Improving the appearance for severely fluosed teeth. JADA 1993; 89:1329-1331.
21. Alkahtani, R., Stone, S., German, M., & Waterhouse, P. A review on dental whitening. Journal of dentistry, (2020). 100, 103423.
22. Pardi Germán. "Determinantes de Patogenicidad de Candida Albicans". Acta odontol. venez . 2002 ; 40( 2 ): 185-192.
23. Panizo M. M, Reviákina V. Candida albicans y su efecto patógeno sobre las mucosas. Rev. Soc. Ven. Microbiol. 2001; 21( 2 ): 38-45.
24. Joiner A. The bleaching of teeth: a review of the literature. Journal of Dent 2006; 34:412-419
25. Siciliano, Ana & Santos, Stefany & Quezada, Ruth & Escobar, Wendy & Aguirre, Guillermo & Aguirre, Katleen & Rivas Cartagena, Francisco & Turcios, Jenniffer. (2022). Bio-Banco de Órganos Dentales de la Facultad de Odontología, Universidad de El Salvador. Revista Minerva. 5. 91-103. 10.5377/revminerva.v5i3.15823.
26. Gonzáles Pita LC, Úsuga Vacca MV, Torres Rodríguez C, Delgado Mejía E. Biobanco de dientes humanos para investigación en odontología. Acta Odontol. Colomb. 2014; 4 :9-21.

27. Medina, S., Mejía, C., & Moreno, F. Comportamiento in vitro del colágeno de la unión amelodentinaria en premolares humanos sometidos a altas temperaturas. *Salutem Scientia*. 2015, 15: 44-48.
28. Rubio Leticia, Sioli José Manuel, Santos Ignacio, Fonseca Gabriel M, Martin-de-las-Heras Stella. Alteraciones Morfológicas en Dientes Sometidos a Altas Temperaturas con Interés Forense. *Int. J. Morphol.* 2016 ; 34: 719-728.
29. Hosoya N, Honda K, Iino F, Arai T. Changes in enamel surface roughness and adhesion of *Streptococcus mutans* to enamel after vital bleaching. *J Dent.* 2003; 31: 543-548.
30. Anggausuma k, Ptatiwi D, Widayrman A. The effect of carbamide peroxide on surface enamel structural changes and *Streptococcus mutans* attachment. *Sci Dent J.* 2020; 4: 6-10.
31. Al-Jubori SH, Al-Sabawi, Taha MY. Study of the Adherence of *St. mutans* on Bleached and Fluoridated Tooth Surfaces (An In Vitro Study). *Al-Rafidain Dent J.* 2013; 13: 116-121.
32. Romero AJM, Romero AC. Adherencia del *Streptococcus mutans* en Dientes Permanentes Humanos Sometidos a Dos Agentes Blanqueadores. *Kiru.* 2009; 6: 39-45.
33. Briso A, Silva U, Souza M, Rahal V, Júnioe E, Cintra L. A clinical randomized study on the influence of dental whitening on *Streptococcus mutans* population. *Aust Dent J.* 2017;0:1-5.
34. Attia R, Kamel M. Changes in Surface roughness of bleached enamel by using different remineralizing agents. *Tanta Dent J.* 2016; 13:179-186.
35. Zheng C, Pan J, Wang Z, Wang Y. Effects of hydrogen peroxide-containing bleaching on the growth of *Streptococcus mutans* biofilm on enamel disc surface. *Journal of Peking University (Health Sciences)*. 2014; 46: 30-34.
36. Ittaturut S, Matangkasombut O, Thanyasrisung P. In-Office Bleaching Gel with 35% Hydrogen Peroxide Enhanced Biofilm Formation of Early Colonizing Streptococci on Human Enamel. *J Dent.* 2014; 42: 1480-1486.
37. Briso A, Silva U, Souza M, Rahal V, Júnioe E, Cintra L. A clinical randomized study on the influence of dental whitening on *Streptococcus mutans* population. *Aust Dent J.* 2017;0:1-5.
38. Viana de Sousa, T., Carolina Jordão, C., Augusto Abreu-Pereira, C., Gorayb Pereira, AL, Barbugli, PA, Klein, MI y Pavarina, AC. El peróxido de hidrógeno mejora la eficacia de la terapia fotodinámica contra las biopelículas de *Candida albicans*. *Bioincrustación* (2023). 39: 94-109.
39. Brosh, T., Strouthou, S. y Sarne, O. Efectos de las superficies bucales y linguales, procedimientos de acondicionamiento del esmalte y duración del almacenamiento

- en las características de desprendimiento de los brackets. *J Dent* .2004. 33, 99–105.
40. Suttinee Ittaturut, Oranart Matangkasombut, Panida Thanyasrisung, In-office bleaching gel with 35% hydrogen peroxide enhanced biofilm formation of early colonizing streptococci on human enamel, *Journal of Dentistry*, Volume 42, Issue 11, 2014, Pages 1480-1486.
  41. Napimoga, M. H., de Oliveira, R., Reis, A. F., Gonçalves, R. B., & Giannini, M. In vitro antimicrobial activity of peroxide-based bleaching agents. *Quintessence international* 2007, 38: 329-333.
  42. Oliveira, D. P., Gomes, B. P., Zaia, A. A., Souza-Filho, F. J., & Ferraz, C. C.. In vitro assessment of a gel base containing 2% chlorhexidine as a sodium perborate's vehicle for intracoronary bleaching of discolored teeth. *Journal of endodontics*, (2006) 32, 672–674.
  43. Franz-Montan, M., Ramacciato, J. C., Rodrigues, J. A., Marchi, G. M., Rosalen, P. L., & Groppo, F. C. The effect of combined bleaching techniques on oral microbiota. *Indian journal of dental research: official publication of Indian Society for Dental Research*, (2009). 20, 304–307.
  44. Philippe Ahariz, M., & Courtois, P.. *Candida albicans* susceptibility to lactoperoxidase-generated hypiodite. *Clinical, cosmetic and investigational dentistry*, (2010) 2, 69–78.
  45. Alkmin, Y. T., Sartorelli, R., Flório, F. M., & Basting, R. T. (2005). Comparative study of the effects of two bleaching agents on oral microbiota. *Operative dentistry*, 30: 417–423.
  46. Li, Y., Du, J., Huang, S., Wang, S., Wang, Y., Cai, Z., Lei, L., & Huang, X. Hydrogen peroxide potentiates antimicrobial photodynamic therapy in eliminating *Candida albicans* and *Streptococcus mutans* dual-species biofilm from denture base. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, . (2022). 37: 10-26.
  47. Abdelshafy, A. M., Neetoo, H., & Al-Asmari, F. Antimicrobial Activity of Hydrogen Peroxide for Application in Food Safety and COVID-19 Mitigation: An Updated Review. *Journal of food protection*, (2024). 87-89.
  48. Ferguson, J.W. et al. Effectiveness of Intracanal Irrigants and Medications against the Yeast *Candida albicans* .*Journal of Endodontics*, Volume 28, Issue 2, 68 - 71
  49. Soto, A. F., Mendes, E. M., Arthur, R. A., Negrini, T. C., Lamers, M. L., & Mengatto, C. M. Antimicrobial effect and cytotoxic activity of vinegar-hydrogen peroxide mixture: A possible alternative for denture disinfection. *The Journal of prosthetic dentistry*, (2019). 121.
  50. Teixeira, É. F., Girundi, A. L. G., Alexandrino, L. D., Morel, L. L., de Almeida, M. V. R., Dos Santos, V. R., Fraga, S., da Silva, W. J., & Mengatto, C. M.. Effects of disinfection with a vinegar-hydrogen peroxide mixture on the surface characteristics of denture acrylic resins. *Clinical oral investigations*, (2023) 28: 45.

51. Kunz, D., Wirth, J., Sculean, A., & Eick, S. In- vitro-activity of additive application of hydrogen peroxide in antimicrobial photodynamic therapy using LED in the blue spectrum against bacteria and biofilm associated with periodontal disease. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, (2019). 26, 306–312.
52. Huahua, T., Rudy, J., & Kunin, C. M.. Effect of hydrogen peroxide on growth of Candida, Cryptococcus, and other yeasts in simulated blood culture bottles. *Journal of clinical microbiology*, (1991) 29(2), 328–332.
53. Jaña PD, Yévenes LI, Rivera AS. Estudio clínico comparativo entre colutorio de p-clorofenol y peróxido de hidrógeno con colutorio de clorhexidina al 0.12% en el crecimiento de placa microbiana y gingivitis. *Rev. Clin. Periodoncia Implantol. Rehabil. Oral* . 2010 ; 3( 2 ): 65-68.
54. Oliveira D.P, Gomez BP, Zaia AA. Actividad antimicrobiana ex vivo de varios agentes blanqueadores. *Revista endodoncia*,(2008)41 :1054-1058.

## ANEXOS

- ANEXO N° 1 piezas dentarias seleccionadas.



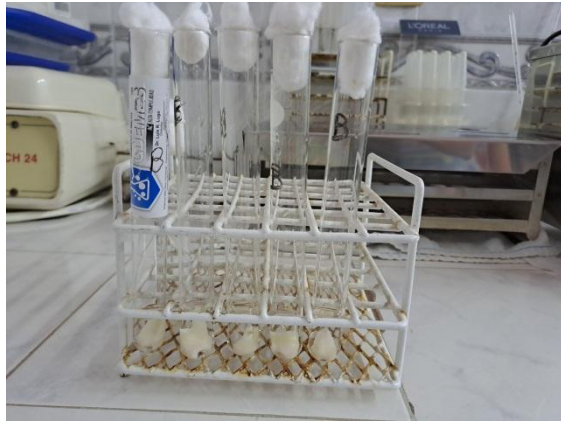
- ANEXO N° 2 aplicación del agente blanqueador.



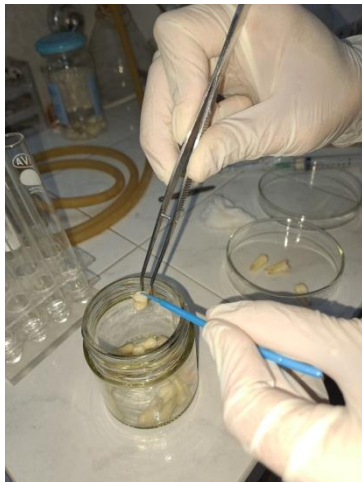
- ANEXO N° 3 comparación macroscópica de grupos.



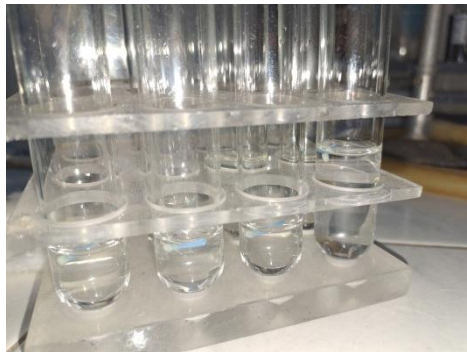
- ANEXO N º4 Y 5 inoculación de cepa e incubación por 36 hs.



- ANEXO N º 6 toma con microbrush cara vestibular de premolares.



- ANEXO N º 7 corte del microbrush en tubo de ensayo



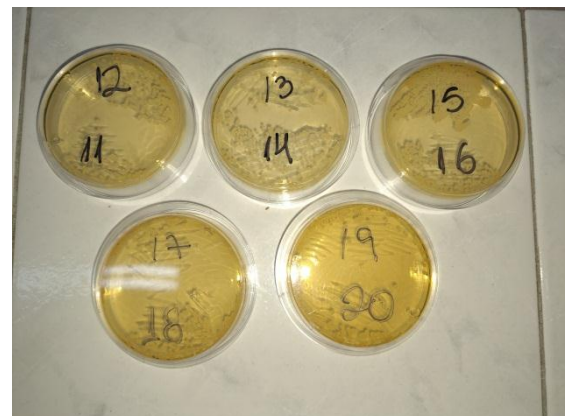
- ANEXO Nº 8 centrifugado



- ANEXO Nº 9 y 10 siembras con estriado



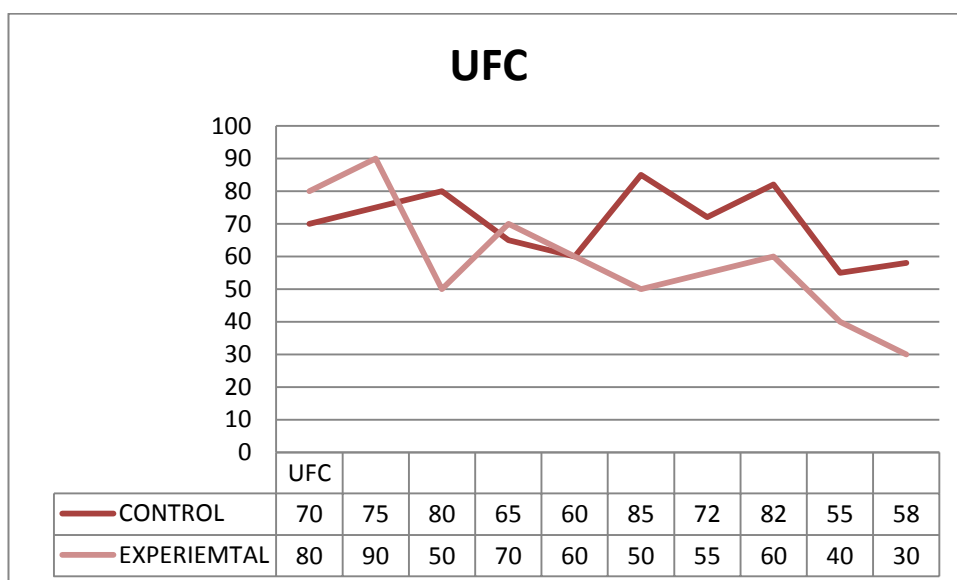
- ANEXO Nº 11 y 12 UFC 36 hs.



- ANEXO N° 13 Tabla Análisis de Datos

| Grupo Control UFC | Grupo Experimental UFC |
|-------------------|------------------------|
| 70                | 80                     |
| 75                | 90                     |
| 80                | 50                     |
| 65                | 70                     |
| 60                | 60                     |
| 85                | 50                     |
| 72                | 55                     |
| 82                | 60                     |
| 55                | 40                     |
| 58                | 30                     |

- ANEXO N° 14 Gráfico de Dispersión



- ANEXO N° 15

|                   |                          |          |                               |
|-------------------|--------------------------|----------|-------------------------------|
| Shapiro-Wilk Test |                          |          |                               |
|                   |                          |          |                               |
|                   | <i>GRUPO control UFC</i> | <i>0</i> | <i>grupo experimental UFC</i> |
| W-stat            | 0,950584596              | #¡VALOR! | 0,978663823                   |
| p-value           | 0,675420702              | #¡VALOR! | 0,957617503                   |
| Alpha             | 0,05                     | 0,05     | 0,05                          |
| Normal            | Yes                      | #¡VALOR! | yes                           |

- ANEXO N° 16

| Prueba F para varianzas de dos muestras |                          |                               |
|-----------------------------------------|--------------------------|-------------------------------|
|                                         |                          |                               |
|                                         | <i>GRUPO control UFC</i> | <i>grupo experimental UFC</i> |
| Media                                   | 70,2                     | 58,5                          |
| Varianza                                | 110,1777778              | 322,5                         |
| Observaciones                           | 10                       | 10                            |
| Grados de libertad                      | 9                        | 9                             |
| F                                       | 0,34163652               |                               |
| P(F<=f) una cola                        | 0,062687547              |                               |
| Valor crítico para F (una cola)         | 0,314574906              |                               |

- ANEXO N° 17

| Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales |                          |                               |
|---------------------------------------------------------|--------------------------|-------------------------------|
|                                                         |                          |                               |
|                                                         | <i>GRUPO control UFC</i> | <i>grupo experimental UFC</i> |
| Media                                                   | 70,2                     | 58,5                          |
| Varianza                                                | 110,1777778              | 322,5                         |
| Observaciones                                           | 10                       | 10                            |
| Varianza agrupada                                       | 216,3388889              |                               |
| Diferencia hipotética de las medias                     | 0                        |                               |
| Grados de libertad                                      | 18                       |                               |
| Estadístico t                                           | 1,778703528              |                               |
| P(T<=t) una cola                                        | 0,046091281              |                               |
| Valor crítico de t (una cola)                           | 1,734063607              |                               |
| P(T<=t) dos colas                                       | 0,092182562              |                               |
| Valor crítico de t (dos colas)                          | 2,10092204               |                               |