
ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ÁCIDO ACÉTICO Y EL CEPILLO COLGATE 360° ANTIBACTERIAL®: UN ESTUDIO *IN VITRO*¹

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF ACETIC ACID AND COLGATE 360° ANTIBACTERIAL TOOTHBRUSH®: AN *IN VITRO* STUDY¹

LAURA VIVIANA HERRERA SANDOVAL², STEPHANNY GISSELL CABALLERO ROMERO³, ANDREA CLARO NUMA⁴, HAROLD TORRES PINZÓN⁵, CARMEN ALODIA MARTÍNEZ LÓPEZ⁶

RESUMEN. Introducción: el cepillo dental se convierte en una fuente potencial de patógenos orales cuando no se hace un proceso de desinfección después de su uso, sobre todo en pacientes con infecciones en el sistema estomatognático o poblaciones que no hacen recambio frecuente de este instrumento. El objetivo de este estudio fue comparar la actividad antimicrobiana del ácido acético 5% con la del cepillo Colgate 360° antibacterial® como posibles estrategias en la desinfección del cepillo dental. **Métodos:** se utilizaron 48 cabezas de cepillos dentales que fueron inoculadas con *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* y *Cándida albicans* separadamente. Las cabezas fueron divididas en tres grupos: cabezas tratadas con ácido acético 5% (vinagre blanco casero, La Constancia®) por 10 minutos, cabezas 360° con actividad antibacterial y controles tratados con solución salina. Posteriormente se hizo recuento de UFC/ml de los microorganismos remanentes en las cabezas de cepillos después del tratamiento o tiempo de acción. **Resultados:** frente a *S. aureus*, el cepillo Colgate 360° antibacterial® mostró mejor efecto antimicrobiano que el ácido acético 5% (PI: 72,11 5). Los dos tratamientos evaluados mostraron capacidad similar para eliminar *S. mutans* de las cabezas de cepillos ($p > 0,05$); mientras que para *C. albicans*, el mejor efecto antimicrobiano lo obtuvo el ácido acético 5% (PI: 99,9%). **Conclusión:** in vitro el vinagre blanco de uso casero y el cepillo Colgate 360° antibacterial® eliminan microorganismos que colonizan cabezas de cepillos dentales como *S. aureus*, *S. mutans* y *C. albicans*, convirtiéndose en alternativas en diversas poblaciones para mantener el cepillo dental libre de microorganismos.

Palabras clave: ácido acético, desinfección, cepillado dental, sustancia antimicrobiana, cavidad oral.

Herrera LV, Caballero SG, Claro A, Torres H, Martínez CA. Actividad antimicrobiana del ácido acético 5% y el cepillo Colgate 360° antibacterial®: un estudio in vitro. Rev Fac Odontol Univ Antioq 2012; 24(1): 62-75.

ABSTRACT. Introduction: toothbrushes may become a potential source of oral pathogens when not properly disinfected once they have been used, especially in patients with infections of the stomatognathic system or among populations that do not often replace this instrument. The goal of this study was to compare the antimicrobial activity of 5% acetic acid with that of Colgate 360° antibacterial toothbrush® as possible strategies for toothbrush disinfection. **Methods:** this study included 48 toothbrush heads that were separately inoculated with

-
- 1 Estudio financiado con recursos de investigación, planta física y recurso humano suministrado por la Universidad Santo Tomás, Seccional Bucaramanga.
 - 2 Bacterióloga y laboratorista clínica, Universidad Industrial de Santander, magister en Ciencias Básicas Biomédicas, Universidad Industrial de Santander, docente de posgrado Universidad Santo Tomás y Coordinadora del Laboratorio de Ciencias Básicas, Universidad Santo Tomás. Investigadora Grupo Sistema Estomatognático y Morfofisiología Colciencias.
 - 3 Odontóloga, Universidad Santo Tomás, investigadora Grupo Sistema Estomatognático y Morfofisiología Colciencias.
 - 4 Odontóloga, Universidad Santo Tomás.
 - 5 Odontólogo, Universidad Santo Tomás, epidemiólogo Universidad del Bosque; docente de pregrado y posgrado Universidad Santo Tomás, candidato a magister en Ciencias Odontológicas de la Universidad CES. Investigador Grupo Sistema Estomatognático Colciencias.
 - 6 Odontóloga, Universidad Santo Tomás, especialista en Ortopedia Maxilar, Universidad Antonio Nariño, docente de pregrado Universidad Santo Tomás. Investigadora grupo Sistema Integral Bucal —SIB— Licenciada en Química y Biología, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia.

-
- 1 This study was sponsored with research funds, facilities and personnel provided by Universidad Santo Tomás at Bucaramanga.
 - 2 Bacteriologist - Clinical Laboratory Technologist, Universidad Industrial de Santander, Basic Biomedical Sciences Msc, Universidad Industrial de Santander, Professor at undergraduate level, Universidad Santo Tomás. Coordinator of the Basic Sciences Laboratory at Universidad Santo Tomás. Researcher of the Stomatognathic System Research Group-Colciencias.
 - 3 Dentist, Universidad Santo Tomás. Researcher of the Stomatognathic System Research Group-Colciencias.
 - 4 Dentist, Universidad Santo Tomás.
 - 5 Dentist, Universidad Santo Tomás, Epidemiologist, Universidad del Bosque; Professor at undergraduate and graduate levels, Universidad Santo Tomás. Magister Candidate, Dental Sciences, Universidad CES. Researcher of the Stomatognathic System Research Group-Colciencias.
 - 6 Dentist, Universidad Santo Tomás, Specialist in Maxillary Orthopedics Universidad Antonio Nariño, Professor at undergraduate level, Universidad Santo Tomás. Researcher of the Research Group Sistema Integral Bucal —SIB—. Chemistry-Biology BA, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia.

RECIBIDO: DICIEMBRE 13/2011-ACEPTADO: MAYO 8/2012

SUBMITTED: DECEMBER 13/2011-ACCEPTED: MAY 8/2012

Staphylococcus aureus, *Streptococcus mutans* and *Cándida albicans*. The heads were sorted out into three groups: heads treated with 5% acetic acid (white domestic vinegar; La Constanca®) for 10 minutes; 360° toothbrush heads with antibacterial properties, and control heads treated with saline solution. This was followed by calculations of CFU/ml of the microorganism remaining in the heads after treatment or time of action. **Results:** in presence of *S. aureus*, Colgate 360° antibacterial toothbrush® proved to have better antimicrobial activity than 5% acetic acid (PI: 72.11 5). The two assessed treatments showed a similar capacity to eradicate *S. mutans* from the brush heads ($p > 0,05$); concerning *C. albicans*, the best antimicrobial activity was observed in the 5% acetic acid (PI: 99,9%). **Conclusion:** in vitro, both white domestic vinegar and Colgate 360° antibacterial toothbrush® remove microorganisms colonizing toothbrush heads, such as *S. aureus*, *S. mutans* y *C. albicans*, and are therefore considered good alternatives for keeping toothbrushes free of microorganisms among several populations.

Key words: acetic acid, disinfection, tooth brushing, antimicrobial substance, oral cavity.

Herrera LV, Caballero SG, Claro A, Torres H, Martínez CA. Antimicrobial activity of acetic acid and Colgate 360° antibacterial toothbrush®: an in vitro study. Rev Fac Odontol Univ Antioq 2012; 24(1): 62-75.

INTRODUCCIÓN

El cepillo dental representa desde hace siglos un instrumento para la higiene oral.^{1,2} Su efecto de limpieza se produce por el frotado de las superficies dentales y gingivales para remover la biopelícula dental, previniendo la caries y la enfermedad periodontal.^{3,4} Sin embargo esta herramienta, especialmente las cerdas, se contaminan tanto con microorganismos orales como enterobacterias presentes en los ambientes sanitarios en los que son almacenados.^{5,6} Bajo estas circunstancias los cepillos dentales constituyen una importante fuente de contaminación y recontaminación de la cavidad oral, así como de transmisión de infecciones orales y sistémicas.^{7,8}

Diversas entidades y autores recomiendan hacer recambio del cepillo en intervalos cortos de tiempo o después de sufrir infecciones orales, sin embargo, por desconocimiento o principalmente por motivos económicos muchas poblaciones no pueden adquirir un cepillo dental nuevo con frecuencia.⁹⁻¹² Al respecto algunos estudios proponen usar mecanismos físicos o químicos que garanticen la desinfección de los cepillos dentales durante un periodo razonable de uso, siendo esta una importante estrategia en la educación en salud oral en poblaciones vulnerables como hogares geriátricos, madres comunitarias, orfanatos entre otros.¹²⁻¹⁵ Por tanto, *in vitro* se han evaluado sustancias adheridas a las cerdas dentales (triclosán y partículas de plata) con el fin de otorgarles propiedades antimicrobianas.¹⁶⁻¹⁸ Actualmente se encuentran disponibles en el mercado, cepillos cuyas cerdas poseen propiedades antibacteriales, que contribuyen a la desinfección del mismo; entre ellos el cepillo Colgate 360° antibacterial®, que contiene Silver Zeolite Irgaguard B5120 con efecto hasta por noventa días.

INTRODUCTION

For several centuries, toothbrushes have been used as an oral hygiene tool.^{1,2} Their cleaning effect is produced by rubbing dental and gingival surfaces in order to remove dental biofilm, thus preventing caries and periodontal diseases.^{3,4} Nevertheless, these tools, especially their bristles, get contaminated with both oral microorganisms and enterobacteria from the sanitary environments where they are stored.^{5,6} Consequently, toothbrushes become an important source of contamination and re-contamination of the oral cavity, as well as of transmission or oral and systemic infections.^{7,8}

Several organizations and authors recommend replacing the toothbrush in short intervals of time or after suffering oral infections; nevertheless, due to ignorance or more often to economic issues, many populations fail to acquire a new toothbrush frequently.⁹⁻¹² As a result, some studies suggest using physical or chemical mechanisms to provide toothbrush disinfection during a reasonable period of time —this being an important oral health education strategy among vulnerable populations such as geriatric homes, community mothers, orphanages or the like.¹²⁻¹⁵ Therefore, several substances adhered to the bristles (such as triclosan and silver particles) have been evaluated in vitro in order to identify their antimicrobial properties.¹⁶⁻¹⁸ There are currently some toothbrushes whose bristles are provided with antibacterial properties that help maintaining disinfection. One of them is Colgate 360° antibacterial toothbrush®, containing Silver Zeolite Irgaguard B5120 which effect lasts for up to ninety days.

Existe también el cepillo Ortodent®, el cual utiliza nanotecnología e introduce en sus cerdas nanopartículas de oro y plata.¹⁷ También se han estudiado soluciones con actividad antimicrobiana como posibles agentes en la desinfección de cepillos dentales. La clorhexidina 0,2%; el hipoclorito de sodio 1%; el triclosán 2%, y el ácido acético, 5, 3, 6 y 50%, han mostrado eficacia en la eliminación de microorganismos orales.^{12-14, 19} Entre estas sustancias, el ácido acético conocido como vinagre blanco podría constituir una excelente opción en la implementación de protocolos de desinfección de cepillos. Esta solución tiene amplio uso común, como aderezo para alimentos y desinfectante para utensilios del hogar, además es de fácil acceso y bajo costo.²⁰⁻²² En odontología ha sido propuesto como agente en la desinfección de cepillos, puesto que estudios previos refieren que en concentraciones desde 3 hasta 50% tiene efecto bactericida sobre microorganismos que pudieran colonizar los cepillos.^{13, 20, 23}

Algunos microorganismos se encuentran con mayor frecuencia contaminando los cepillos dentales, entre ellos *S. aureus*, *S. mutans* y *C. albicans* y por ende están asociados con patologías orales de alta prevalencia en la población tales como abscesos, caries dental y lesiones mucosas.^{5, 7, 10} Es así como este estudio se hizo con el propósito de establecer la eficacia antimicrobiana del vinagre blanco de uso casero comparada con la acción del cepillo Colgate 360° antibacterial® como métodos de desinfección para el cepillo dental.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó una muestra por conveniencia de 48 cepillos dentales; de ellos 30 Colgate 360° convencional y 18 Colgate 360° antibacterial®. Las características de diseño de los dos tipos de cepillos fueron iguales; sin embargo en el caso de la referencia antibacterial sus cerdas contienen una sustancia llamada Silver Zeolite Irgaguard B5120, cuya función es la de mantener al cepillo dental libre de bacterias entre lavada y lavada hasta por noventa días.

Las cabezas de los cepillos fueron distribuidas con dos criterios. Inicialmente 18 cepillos Colgate 360° antibacterial®

Another good toothbrush is Ortodent®, which uses nanotechnology and introduces gold and silver nanoparticles among its bristles.¹⁷ Also, there have been some studies on solutions with antimicrobial properties as possible toothbrush disinfection agents. 0.2% chlorhexidine, 1% sodium hypochlorite, 2% triclosan, and 5, 3, 6 and 50% acetic acid have proven being effective for oral microorganisms removal.^{12-14, 19} Out of these substances, acetic acid, also known as white vinegar, appears as an excellent option in toothbrush disinfection protocols. This solution presents a wide range of uses ranging from food seasoning to home utensils disinfectant; also, it can be easily purchased at a low cost.²⁰⁻²² In dentistry, white vinegar has been suggested as a toothbrush-disinfecting agent, as several studies report that in concentrations ranging from 3 to 50% it has bactericide effects on microorganisms that might colonize toothbrushes.^{13, 20, 23}

Some of the microorganisms most frequently found in toothbrushes include *S. aureus*, *S. mutans*, and *C. albicans*, and are therefore associated to oral pathologies of a high prevalence among the general population, such as abscesses, dental caries and mucous lesions.^{5, 7, 10} In consequence, the purpose of this study was to establish the antimicrobial efficacy of white domestic vinegar in comparison to the action of Colgate 360° antibacterial brush® as toothbrush disinfection methods.

MATERIALS AND METHODS

A convenience sample of 48 toothbrushes was used; 30 of them were Colgate 360° conventional toothbrushes® and 18 were Colgate 360° antibacterial toothbrushes®. The design of both types of brushes was exactly the same; nevertheless, the antibacterial ones contain a substance called Silver Zeolite Irgaguard B5120, which purpose is to maintain the toothbrush free of bacteria in between brushings for up to ninety days.

Toothbrush heads were distributed following two criteria: Initially, 18 Colgate 360° antibacterial brushes

y 18 convencionales fueron subdivididos en tres grupos con seis cepillos para cada microorganismo, luego quedaron distribuidos de la siguiente forma: seis cabezas de cepillos Colgate 360° de cada microorganismo que fueron tratados con ácido acético 5%; seis cabezas de cepillos Colgate 360° antibacterial® inoculadas con cada microorganismo. Finalmente, un último grupo de 12 cepillos Colgate 360°® convencional se subdividió cada cuatro cabezas como controles de contaminación (figura 1).

and 18 Colgate 360° conventional brushes® were subdivided into three groups with six brushes for each microorganism, and then they were distributed like this: six Colgate 360° conventional heads of each microorganism that were treated with 5% acetic acid; six Colgate 360° antibacterial heads inoculated with each microorganism. Finally, a last group of 12 Colgate 360° conventional brushes® was subdivided every other four heads as contamination controls (figure 1).

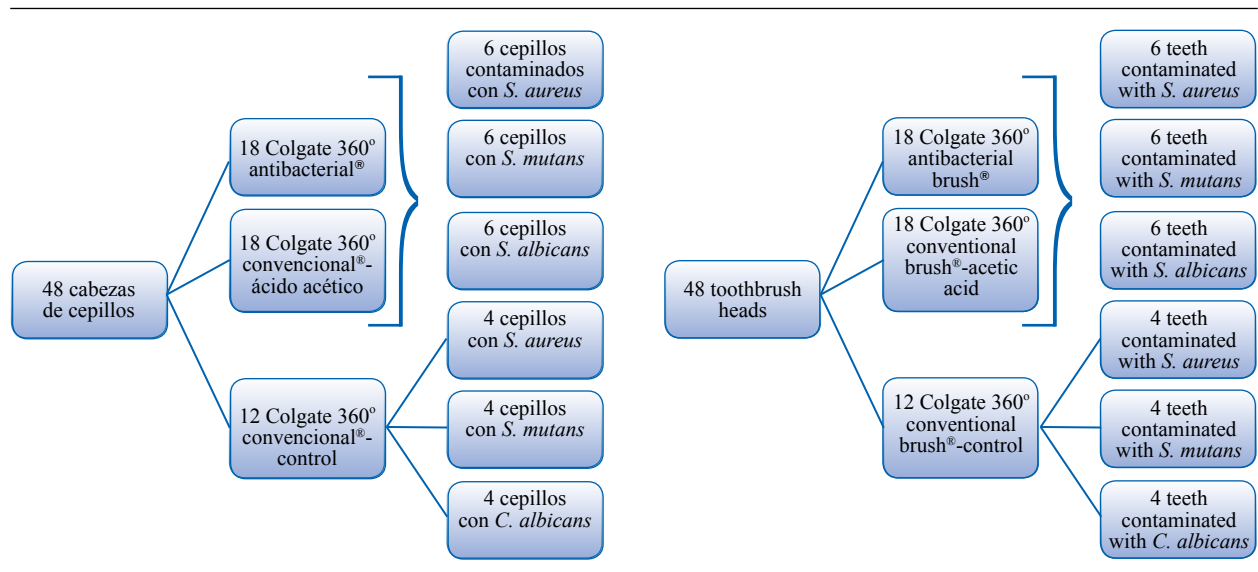


Figura 1. Distribución de las cabezas de los cepillos por cada grupo experimental

Figure 1. Toothbrush heads distribution for each experimental group

Los cepillos fueron inoculados separadamente con cada uno de los siguientes microorganismos: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y *Cándida albicans* ATCC 60193, mantenidos por cultivos sucesivos en agar sangre 5% (oxid), agar *Mitis Salivarius* (fluka analytical) y Sabouraud 2% (Merck), respectivamente.

Se usó el ácido acético de la marca La Constancia®, compuesto por agua filtrada y acético natural en una concentración de 5%.

Preparación de los cepillos

Las cabezas de los cepillos objetivo fueron cortadas y depositadas de forma individual en frascos de vidrio con 30 ml de caldo tripticasa soya (Merck)

The toothbrushes were separately inoculated with each of these microorganisms: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, and *Cándida albicans* ATCC 60193, maintained for successive cultures in 5% blood agar (oxid), *Mitis Salivarius* agar (fluka analytical), and 2% Sabouraud (Merck), respectively.

La Constancia® acetic acid was used; it is composed of filtered water and natural acetic in a concentration of 5%.

Toothbrush preparation

Toothbrush heads were cut, individually deposited inside glass jars in 30 ml of trypticase soy agar (Merck),

para ser esterilizadas por 15 min a 121 lb de presión. Posteriormente se incubaron a 37 °C durante 48 horas para garantizar la esterilidad total.¹³

Prueba de actividad antimicrobiana

Se inocularon las cabezas de los cepillos con 0,6 ml de una suspensión estandarizada de cada uno de los microorganismos de interés, que fue llevada a escala de McFarland tres (*S. aureus* ATCC 6538, *S. mutans* ATCC 25175 y *C. albicans* ATCC 60193) y se incubaron a 37 °C por 48 horas.^{13, 14}

Posteriormente todas las cabezas fueron depositadas en tubos estériles y lavadas dos veces con agua destilada estéril a chorro, con el fin de eliminar el exceso de microorganismos en las cabezas de los cepillos.¹⁴ Se procedió a la distribución en los grupos de tratamiento: las cabezas de cepillos tratadas con ácido acético 5% fueron sumergidas en 15 ml de la solución. Los cepillos auto-desinfectantes no recibieron tratamiento químico y para equiparar las condiciones a las del cepillo tratado con ácido acético 5% fueron inmersos en solución salina. Los cepillos control se mantuvieron en solución salina. Todas las cabezas después de 10 min del tratamiento respectivo, se transfirieron a tubos estériles con 10 ml de agua destilada y se pasaron por vortex durante 10 s para eliminar el exceso del desinfectante.

A partir de estas soluciones de las cabezas de los cepillos, se hicieron diluciones seriadas hasta 10⁶, de las cuales alícuotas de 0,1 ml fueron sembradas por triplicado en agar recuento, agar *Mitis Salivarius* y agar Sabouraud 2% (Merck), según el tipo de microorganismo. Se incubaron a 37 °C en ambiente aeróbico o anaeróbico (AnaeroGen-TM, 9-13% porcentaje CO₂) según correspondía. Se hizo recuento de UFC/ml de solución de cabezas de cepillos a las 48 horas de incubación.

Los resultados de UFC/ml de cada microorganismo, se validaron y analizaron con el paquete estadístico SPSS versión 15.0. (SPSS inc®). Se calculó el porcentaje de inhibición (PI) para cada uno de los tratamientos aplicando la siguiente fórmula: [(promedio de UFC/ml cepillo control - promedio UFC/ml cepillo estudiado) / promedio de UFC/ml cepillo control] * 100.

and sterilized for 15 min at a pressure of 121 lb. They were later incubated at 37 °C for 48 hours to assure total sterilization.¹³

Test of antimicrobial activity

The toothbrush heads were inoculated with 0.6 ml of a standardize suspension of each of the microorganisms under study. These suspensions were brought to a McFarland scale number three (*S. aureus* ATCC 6538, *S. mutans* ATCC 25175 and *C. albicans* ATCC 60193) and incubated at 37 °C for 48 hours.^{13, 14}

All the heads were later deposited in sterile tubes and rinsed twice with jets of distilled sterile water in order to remove remaining microorganisms from them.¹⁴ Then the brush heads were classified according to treatment groups: the heads treated with 5% acetic acid were submerged in 15 ml of solution. The self-disinfecting brushes did not receive chemical treatment, and in order to balance their conditions to the ones of brushes treated with 5% acetic acid, they were submerged in saline solution. The control brushes were kept in saline solution. After 10 min of each treatment, all the brush heads were transferred to sterile tubes containing 10 ml of distilled water and they were turned around for 10 seconds to remove remaining disinfectant.

Based on these solutions, serial dilutions up to 10⁶ were performed; out of these, 0.1 ml aliquots were seeded in triplicate in agar recount, agar *Mitis Salivarius*, and 2% agar Sabouraud (Merck), depending on each type of microorganism. They were incubated at 37 °C in aerobic or anaerobic environment (Anaero Gen TM, 9-13% percentage CO₂) according to the case. CFU/ml count of brush heads solution was performed 48 hours after incubation.

The resulting CFU/ml of each microorganism were validated and analyzed with the SPSS statistical package, version 15.0 (SPSS inc®). The percentage inhibition (PI) was calculated for each of the treatments by applying this formula: $(100 - [(100\% \text{ average CFU/ml studied toothbrush} * 100) / 100\% \text{ average CFU/ml control toothbrush}])$.

Se aplicó el test de normalidad de Kolmogorov-Smirnov demostrándose que los recuentos de UFC/ml presentaron distribución normal en los grupos de estudio. A través de pruebas de ANOVA se determinaron las diferencias estadísticas entre los tratamientos aplicados según el microorganismo y el tipo de cepillo. Se estimaron los valores de p , siendo significativos $\leq 0,05$. Para los grupos con diferencias significativas por ANOVA se hicieron pruebas de Bonferroni para confirmar la diferencia estadística que se encontró entre los grupos.

Los aspectos éticos que se tuvieron en cuenta en esta investigación se refirieron a los profesionales que estuvieron manipulando los microorganismos y a sus posibles repercusiones; de acuerdo con la resolución 8430 de 1993 con los requisitos contemplados en el título IV, capítulo I.²⁴

RESULTADOS

El comportamiento de los recuentos de UFC/ml de acuerdo con el tratamiento aplicado a las cabezas de los cepillos se muestra en el gráfico de cajas (figura 2). Mediante la prueba de ANOVA fue posible establecer que existen diferencias estadísticamente significativas, en los recuentos según el microorganismo, así como también según el tipo de tratamiento aplicado a los cepillos (tabla 1). En las cabezas inoculadas con *S. aureus* los recuentos de UFC/ml no fueron estadísticamente significativas para los cepillos Colgate 360° antibacterial® ($p = 0,072$) con respecto a los tratados con ácido acético 5%; para *S. mutans* el ácido acético 5% y el cepillo Colgate 360° antibacterial® arrojaron recuentos de UFC/ml similares ($p = 1$).

The Kolmogorov-Smirnov normality test was applied, showing that the CFU/ml counts presented normal distribution among the study groups. Statistical differences among the applied treatments were determined by means of ANOVA tests, according to each microorganism and brush type; p values were estimated, and the ones of ≤ 0.05 were considered significant. Bonferroni tests were applied to the groups that showed ANOVA significant differences in order to confirm the statistical difference among the groups.

The ethical aspects considered for this study had to do with the professionals in charge of manipulating the microorganisms and their possible repercussions, according to Resolution 8430 of 1993, especially the requirements included in Title IV, Chapter I.²⁴

RESULTS

The behavior of CFU/ml counts, according to the treatments applied to each type of toothbrush head is shown in the box plot (figure 2). By means of an ANOVA test, it was possible to recognize significant statistical differences among the counts, according to each microorganism and type of treatment applied (table 1). Toothbrush heads inoculated with *S. aureus* did not show statistical significant differences in terms of CFU/ml counts for Colgate 360° antibacterial brushes® ($p = 0.072$) in comparison to the ones treated with 5% acetic acid; for *S. mutans*, both 5% acetic acid and Colgate 360° antibacterial brushes yielded similar CFU/ml counts ($p = 1$).

Tabla 1. Recuento de UFC/ml de microorganismos presentes en cabezas de cepillos dentales después de aplicar los tratamientos evaluados

Tipo de tratamiento de cabezas de cepillos	Microorganismo/recuento de UFC/ml solución					
	<i>S. aureus</i> ATCC 6538 P = (0,000)*		<i>S. mutans</i> ATCC 25175 P = (0,002)*		<i>C. albicans</i> ATCC 60193 P = (0,000)*	
	X	DE	X	DE	X	DE
Cepillo tratado con ácido acético al 5% †	26.012,50	22.564,06	31,44	71,14	0,38	0,69
Cepillo Colgate 360° Antibacterial® (Silver Zeolite Irgaguard B5120) †	11.738,80	14.384,44	39,88	38,34	539,91	454,79
Cepillo Control	93.297,22	15.298,47	308,62	430,74	1.341,83	254,27

†: diferencias significativas según el tipo de tratamiento con el control en los microorganismos evaluados, X: promedio, DE: desviación estándar, *: diferencias significativas en el recuento de cada microorganismo según el tratamiento aplicado.

Table 1. CFU/ml counts of the microorganism found in toothbrush heads after applying the studied substances

Type of treatment of toothbrush heads	Microorganism/CFU/ml solution count					
	<i>S. aureus</i> ATCC 6538 P=(0.000)*		<i>S. mutans</i> ATCC 25175 P=(0.002)*		<i>C. albicans</i> ATCC 60193 P=(0.000)*	
	X	SD	X	SD	X	SD
Toothbrush treated with 5% acetic acid†	26.012.50	22.564.06	31.44	71.14	0.38	0.69
Colgate 360° antibacterial toothbrush® (Silver Zeolite Irgaguard B5120)†	11.738.80	14.384.44	39.88	38.34	539.91	454.79
Control toothbrush	93.297.22	15.298.47	308.62	430.74	1.341.83	254.27

†: significant differences according the treatment type with control in studied microorganisms, X: average, SD: standard deviation, *: significant count differences of each microorganism according to applied treatment.

Las cabezas de los cepillos contaminadas con *C. albicans* y tratadas con ácido acético 5% obtuvieron un recuento significativamente menor de UFC/ml comparados con los otros grupos de estudio (tabla 1).

A partir del cálculo del PI de crecimiento para cada microorganismo se estableció que el cepillo Colgate 360° antibacterial® inhibió 87,41% del crecimiento de *S. aureus* respecto a 72,11% obtenido por el ácido acético al 5%. Para *S. mutans* el ácido acético 5% y el cepillo Colgate 360° antibacterial® mostraron PI similares de 89,81% y 87,07% respectivamente; el crecimiento de *C. albicans* mostró mayor inhibición con el ácido acético 5% con PI del 99,97% respecto a un 59,76% obtenido por el cepillo Colgate 360° antibacterial® (tabla 2). mediante de la prueba de Bonferroni se establecieron diferencias estadísticamente significativas entre el cepillo tratado con ácido acético 5% y el cepillo 360 antibacterial mostrando mayor eficacia del primero para eliminar *C. albicans* (tabla 2).

Brush heads contaminated with *C. albicans* and treated with 5% acetic acid showed a significantly lower CFU/ml count in comparison to the other studied groups (table 1).

Calculations of each microorganism's percentage of growth inhibition (PI) showed that the Colgate 360° antibacterial brush® inhibited 87.41% of *S. aureus* growing, compared to 72.11% obtained with 5% acetic acid. For *S. mutans*, both 5% acetic acid and the Colgate 360° antibacterial brush® showed similar PI's: 89.81% and 87.07%, respectively; *C. albicans* growth showed greater inhibition with the use of 5% acetic acid, with a PI of 99.97% in comparison to the 59.76% obtained with the Colgate 360° antibacterial brush® (table 2). Application of a Bonferroni tests allowed establishing significant statistical differences between the brush treated with 5% acetic acid and the 360° antibacterial brush, being the former more efficient for removing *C. albicans* (table 2).

Tabla 2. Inhibición de crecimiento de microorganismos presentes en cabezas de cepillos dentales después de aplicar los tratamientos estudiados

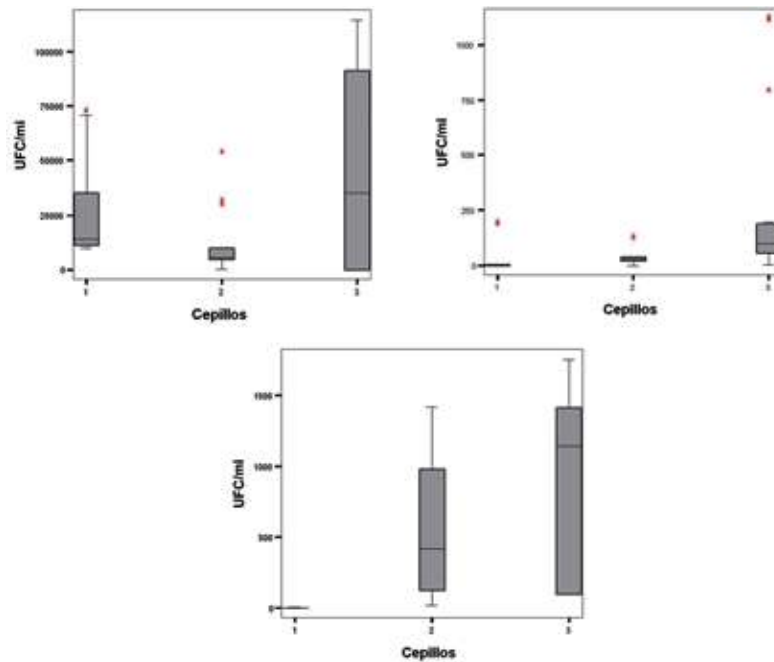
Tipo de cepillo	<i>S. aureus</i> ATCC 6538		<i>S. mutans</i> ATCC 25175		<i>C. albicans</i> ATCC 60193	
	PI (%)	DE	PI (%)	DE	PI (%)	DE
Cepillo tratado con ácido acético al 5%	72,11	13,73	89,81	8,24	99,97	0,00
Cepillo Colgate 360° antibacterial®	87,41	24,71	87,07	30,22	59,76	26,22

PI: porcentaje de inhibición, DE: desviación estándar

Table 2. Growth inhibition of the microorganism found in toothbrush heads after applying the studied treatments

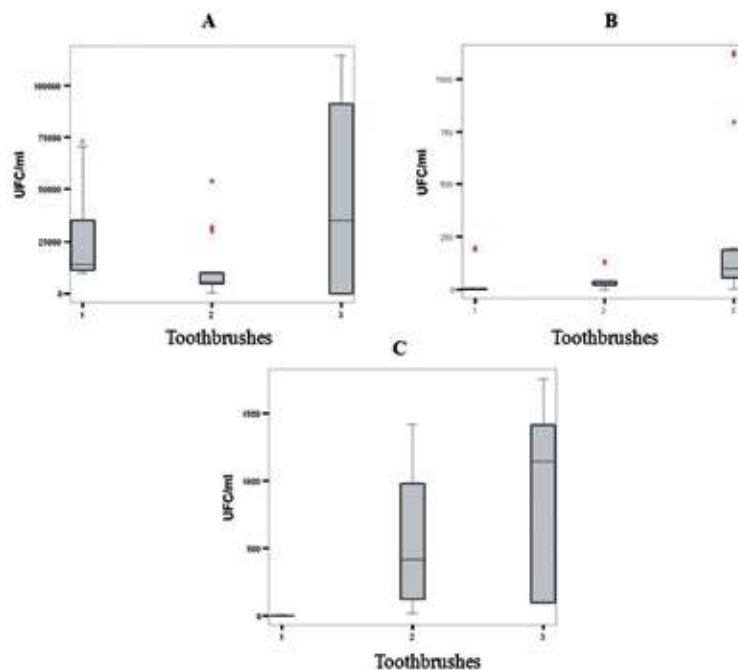
Type of brush	<i>S. aureus</i> ATCC 6538		<i>S. mutans</i> ATCC 25175		<i>C. albicans</i> ATCC 60193	
	PI (%)	SD	PI (%)	SD	PI (%)	SD
Brush treated with 5% acetic acid	72.11	13.73	89.81	8.24	99.97	0.00
Colgate 360° antibacterial brush®	87.41	24.71	87.07	30.22	59.76	26.22

PI: Percentage of inhibition, DE: standard deviation.



Cada subgráfico representa un tipo de microorganismo A. recuento de UFC/ml de cabezas de cepillos dentales inoculadas con *S. aureus*; B. recuento de UFC/ml de cabezas de cepillos dentales inoculadas con *S. mutans*; C. recuento de UFC/ml de cabezas de cepillos dentales inoculadas con *C. albicans*. 1. Cepillo Colgate 360° antibacterial®, 2. cepillo Colgate 360° convencional tratado con ácido acético y 3. cepillo 360° convencional con solución salina (control).

Figura 2. Diagrama de cajas para los recuentos de UFC/ml de los microorganismos presentes en las cabezas de cepillos dentales después del tiempo de acción de las sustancias evaluadas



Each sub-graph represents a type of microorganism: A. CFU/ml count of toothbrush heads inoculated with *S. aureus*; B. CFU/ml count of toothbrush heads inoculated with *S. mutans*; C. CFU/ml count of toothbrush heads inoculated with *C. albicans*. 1. Colgate 360° antibacterial toothbrush®, 2. Conventional Colgate 360° brush® treated with acetic acid; 3. Conventional Colgate 360° brush with saline solution (control).

Figure 2. Box plot of CFU/ml counts of the microorganism found in toothbrush heads after action time of the studied substances

DISCUSIÓN

El cepillo dental ha sido usado para la higiene oral desde hace miles de años.¹¹ Sin embargo, numerosos estudios han demostrado la importancia de mantener libre de microorganismos este implemento, dado que puede contaminarse con bacterias de la cavidad oral y su entorno incluyendo patógenos como *S. aureus*, *S. mutans*, *C. albicans*, *S. pyogenes*, *S. epidermidis* y *Klebsiella pneumoniae*.^{3, 13, 19, 25} Este estudio demostró la efectividad del ácido acético 5% y el cepillo Colgate 360° antibacterial®, para desinfectar las cabezas de cepillos dentales contaminadas, representando un hallazgo significativo en la búsqueda de estrategias complementarias a la higiene oral que estén al alcance en nuestro medio y que mejoren la salud bucal de la comunidad en general. Sin embargo, los resultados de este estudio tienen límites de interpretación dado que el tamaño de muestra para cada grupo experimental fue pequeño y requieren estudios complementarios.

Los métodos químicos y físicos evaluados en este estudio disminuyeron significativamente el recuento de UFC/ml de *S. aureus* presente en las cerdas dentales y superficies de las cabezas de cepillos dentales. Si bien, este microorganismo pertenece a la microbiota oral también tiene un papel patogénico importante dado que está implicado en procesos como queilitis angular, parotiditis, mucositis en niños y ancianos; así como caries radiculares, glositis, infecciones pulpares y periapicales, gingivitis y algunos tipos de periodontitis principalmente en pacientes con alteraciones sistémicas. Por tanto resulta importante su eliminación de los cepillos dentales.²⁶⁻²⁸ Los resultados de la investigación sobre la actividad del ácido acético 5% frente a *S. aureus* son concordantes con reportes previos que demuestran que desde 0,25% es efectivo en la eliminación de este microorganismo.²⁹

Una de las estrategias que los organismos de salud proponen en la prevención de la caries dental, es hacer control sobre *S. mutans* eliminándolo del cepillo dental para evitar la autoinoculación.^{30, 31} En este estudio, se encontró que los dos métodos evaluados eliminaron cerca del 90% de *S. mutans* que colonizó las cabezas de los cepillos, por ende es probable que al usarlos en la rutina

DISCUSSION

Toothbrushes have been used for oral hygiene for ages.¹¹ In consequence, numerous studies have shown the importance of maintaining them free of microorganisms as they may get contaminated with bacteria from the oral cavity and its surroundings, including pathogens such as *S. aureus*, *S. mutans*, *C. albicans*, *S. pyogenes*, *S. epidermidis*, and *Klebsiella pneumoniae*.^{3, 13, 19, 25} This study demonstrated the effectiveness of 5% acetic acid and Colgate 360° antibacterial brush® to disinfect contaminated brush heads, and therefore it is a significant contribution in the search for additional strategies of oral health available in our context in order to improve the oral health of the community in general. However, the results of this study present some limitations because the size of the sample for each experimental group was small and therefore further studies are required.

The physicochemical methods assessed in this study significantly reduced the CFU/ml count of *S. aureus* found in both bristles and head surfaces of toothbrushes. Even though this microorganism makes part of the oral microbiota, it also plays an important pathogenic role participating in conditions such as angular cheilitis, parotitis, and mucositis in children and the elderly, as well as root caries, glositis, pulpal and periapical infections, gingivitis, and some types of periodontitis, especially in patients with systemic alterations. It is therefore important to eradicate it from toothbrushes.²⁶⁻²⁸ The results of the present study on 5% acetic acid activity in presence of *S. aureus* agree with previous reports that have proven its effectiveness in concentrations starting at 0.25% to eradicate this microorganism.²⁹

One of the strategies suggested by health organizations for preventing dental caries refers to controlling *S. mutans*, eradicating it from toothbrushes in order to avoid self-inoculation.^{30, 31} This studied showed that the two assessed methods removed almost 90% of the *S. mutans* found in brush heads, so it is probable that using them in daily

de desinfección del cepillo, se disminuya la carga contaminante del principal microorganismo causante del proceso cariogénico.²⁶ Aunado a lo anterior resulta gratificante encontrar que el ácido acético 5%, como un producto de uso común en el hogar y de fácil acceso, brinda efectividad en la eliminación de *S. mutans*, favoreciendo así las poblaciones vulnerables.

Así mismo, se estableció la eliminación entre 60 y 99% de *C. albicans* por el cepillo Colgate 360°® autodesinfectante y el vinagre blanco respectivamente. Aunque esta levadura es un habitante normal de la cavidad bucal de algunos individuos, puede llegar a convertirse en patógeno bajo ciertos factores predisponentes del huésped, tales como, higiene oral deficiente, uso de aditamentos ortodónticos y prótesis, estados de inmunosupresión o enfermedades sistémicas en los individuos. En estas circunstancias es cuando el cepillo dental puede ser un reservorio de las estructuras fúngicas que ocasionan lesiones como mucositis, estomatitis protésica, queilitis angular e hiperplasias crónicas.³² Los hallazgos sobre la potente actividad del vinagre blanco en *C. albicans* son concordantes con estudios previos hechos por Azuma y colaboradores²³ y controvertidos con los propuestos por Komiyama y colaboradores,¹³ quienes establecieron que el vinagre blanco no reduce significativamente el crecimiento de esta levadura. Las diferencias en la actividad del vinagre blanco reportadas por la literatura podrían estar relacionadas con los diversos modelos de estudio aplicados por los investigadores, dado que no existe un método estándar para evaluar la capacidad de una sustancia en la desinfección de cepillos dentales.

Los resultados de este estudio indican, que el cepillo Colgate 360° antibacterial® se propone como una herramienta que contribuye a mantener la salud oral de quienes lo usan. Su actividad antimicrobiana está relacionada con un componente denominado Silver Zeolite Irgaguard B5120 presente en sus cerdas. Según información del fabricante contiene zeolita combinada con partículas de plata, siendo estas últimas reportadas por la literatura como agentes que inhiben la adherencia y el crecimiento de microorganismos Gram positivos y Gram negativos.¹⁶ En el mercado existen otros productos para el mismo fin, es el caso del cepillo dental con cerdas impregnadas de triclosán¹⁶ y el VIOlighth, un instrumento portable para la desinfección del cepillo dental.¹⁴

disinfection routines helps decrease the contaminating load of the microorganism that most commonly causes the cariogenic process.²⁶ Similarly, it is satisfying to recognize that 5% acetic acid, a product commonly used at homes and easily available, is effective for eliminating *S. mutans*, thus benefiting vulnerable populations.

It was also possible to verify elimination of 60 and 99% of *C. albicans* by Colgate 360° self-disinfecting brush® and white vinegar respectively. Although this type of yeast usually inhabits the oral cavity of some individuals, it may turn into a pathogen under certain host-predisposing factors, such as insufficient oral hygiene, use of orthodontic appliances and prostheses, immunosuppressive states, or systemic diseases. It is under these circumstances that toothbrushes may become reservoirs of fungal structures that produce lesions such as mucositis, prosthetic stomatitis, angular cheilitis, and chronic hyperplasia.³² The findings on the powerful properties of white vinegar to control *C. albicans* agree with previous studies by Azuma et al²³ but also challenge the findings of Komiyama et al,¹³ who suggested that white vinegar does not significantly reduce this yeast's growth. The differences within the specialized literature in terms of white vinegar properties may be related to the diverse approaches used by researchers, as there is not a single standard model to evaluate the capacity of a given substance to disinfect toothbrushes.

The results of the present study indicate that Colgate 360° antibacterial toothbrush® appears as an effective tool that contributes to maintaining oral health among its users. Its antimicrobial properties are related to a component called Silver Zeolite Irgaguard B5120 found in its bristles. According to the manufacturer's information, it contains zeolite mixed with silver particles, which according to the literature may inhibit adherence and growth of Gram-positive and Gram-negative microorganisms.¹⁶ There are several products with the same purpose available in the market, such as the toothbrush with bristles covered by triclosan,¹⁶ and the VIOlighth, a portable instrument for toothbrush disinfection.¹⁴

Sin embargo el cepillo Colgate 360° antibacterial® mostró ser significativamente menos efectivo en la eliminación de *C. albicans* con respecto al ácido acético 5%. Este hallazgo podría estar relacionado con la amplia variedad de moléculas de superficie que posee dicha levadura y que le permiten adherirse fuertemente a cualquier tipo de tejido e incluso sobre estructuras inertes como las cerdas de los cepillos.^{13, 33}

Con esta investigación se estableció la capacidad del ácido acético 5% en la eliminación de los microorganismos orales evaluados, siendo mejor su efecto frente a *S. mutans* y *C. albicans* con respecto al cepillo Colgate 360° antibacterial®. El efecto antimicrobiano del ácido acético incluso a concentraciones tan bajas como 5%, ha sido atribuido a su capacidad para disminuir el pH tanto intra- como extracelularmente y por ende alterar el transporte, la integridad de la membrana celular, así como la actividad enzimática llegando incluso a precipitar las proteínas citoplasmáticas.²¹ La amplia actividad antimicrobiana de esta sustancia ha sido reportada por Aïnda IK y colaboradores²⁰ demostrando que el vinagre blanco fue más efectivo que el vinagre tinto frente a cepas hospitalarias de *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus* y *E. coli*. Así mismo Ryssel H y colaboradores²¹ reportaron que el ácido acético usado como antiséptico local elimina a los cinco minutos cepas de bacterias Gram negativas como *Proteus vulgaris*, *P. aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*, y Gram positivas como *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis* y *S. aureus*; y Azuma y colaboradores²³ establecieron la actividad fungicida del ácido acético sobre cepas de *C. albicans* aisladas de cavidad oral. Con estos resultados y dado que el vinagre blanco es de uso común en la preparación de alimentos, así como en odontología en la desinfección de prótesis dentales³⁴ y eliminación de microorganismos presentes en las cerdas de cepillos dentales representa una buena opción como un método económico, de fácil acceso y aplicación para la desinfección de cepillos dentales sobre todo en poblaciones vulnerables y de bajos recursos económicos como hogares geriátricos, madres comunitarias y orfanatos.

La capacidad del ácido acético para desinfectar las cabezas de los cepillos dentales demostrada es concordante con una investigación previa de este grupo en la que a través de pruebas de desinfección en tubo se estableció la efectividad del 100%

Nevertheless, the Colgate 360° antibacterial brush® has proven to be significantly less effective for eliminating *C. albicans*, in comparison to 5% acetic acid. This finding might be related to the wide variety of surface molecules this yeast is provided with, which enable it to strongly adhere to any type of tissue, and even to lifeless structures such as toothbrush bristles.^{13, 33}

This study showed that 5% acetic acid was able to remove the studied microorganisms, being more effective to control *S. mutans* and *C. albicans* in comparison to the Colgate 360° antibacterial brush®. The antimicrobial effect of acetic acid, even at concentrations as low as 5%, has been attributed to its ability to decrease pH both in intra- and extracellular conditions and therefore to altering the cell membrane's transportation and integrity, as well as enzymatic activity, and even precipitating cytoplasmic proteins.²¹ The extensive antimicrobial activity of this substance has been reported by Aïnda et al,²⁰ who demonstrated that white vinegar was more effective than red vinegar in the presence of hospital strains of *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus*, and *E. coli*. Similarly, Ryssel et al²¹ reported that acetic acid used as a local antiseptic may remove, in five minutes, strains of Gram-negatives bacteria such as *Proteus vulgaris*, *P. aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*, as well as Gram-positive bacteria such as *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis*, and *S. aureus*; and Azuma et al²³ identified the fungicide activity of acetic acid on *C. albicans* strains found in the oral cavity. These results suggest that since white vinegar is commonly used in foods, as well as for disinfecting dental prostheses³⁴ and eliminating microorganisms usually found in toothbrush bristles, it represents a good option as an inexpensive, easily available method for toothbrush disinfection, especially among vulnerable populations such as geriatric homes, child care centers, and orphanages.

The proven properties of acetic acid to disinfect toothbrush heads agrees with a previous study of this research group, which, by means of disinfection tests in tubes, established the 100%

del vinagre blanco para inhibir, desde 3 min de contacto directo, el crecimiento de cepas de *Stafilococcus epidermidis*, *Klebsiella oxytoca* y *Cándida albicans*, aisladas de cabezas de cepillos dentales.²⁵

CONCLUSIONES

Este estudio constituye un avance en la búsqueda de protocolos de higiene oral al alcance y permite proponer al vinagre blanco de uso casero y el cepillo Colgate 360° antibacterial® como verdaderas alternativas para mantener el cepillo dental libre de microorganismos en diversas poblaciones. Sin embargo, son necesarios estudios complementarios con otros patógenos orales e incluso periodontopatógenos.

AGRADECIMIENTOS

A los grupos de Colciencias de Sistema Estomatognático y Morfofisiología. A la Universidad Santo Tomás por facilitar la planta física y al grupo de docentes que brindaron apoyo técnico y científico que permitieron el desarrollo de la presente investigación.

CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores manifiestan que no existen conflictos de interés con las compañías Colombina-La Constancia® y Colgate Palmolive®, quienes producen y comercializan el vinagre blanco y cepillo Colgate 360° antibacterial®, respectivamente, como los productos evaluados en este estudio.

CORRESPONDENCIA

Laura Viviana Herrera Sandoval
Universidad Santo Tomás, seccional Bucaramanga
Campus Floridablanca
Facultad de Odontología
Edificio Santander
Laboratorio de Ciencias Básicas USTA
Teléfono: 680 08 01. Ext.: 2409
Fax: 639 70 98
Bucaramanga. Colombia
Correo electrónico: l.vivianaherrera@gmail.com

effectiveness of white vinegar to inhibit, as early as 3 min of direct contact, the growth of strains of *Stafilococcus epidermidis*, *Klebsiella oxytoca* and *Cándida albicans* found in toothbrush heads.²⁵

CONCLUSIONS

This study represents an advance in the search for oral hygiene protocols easily available, and allows suggesting white domestic vinegar and Colgate 360° antibacterial brush® as real alternatives to maintaining the toothbrush free of microorganisms in several populations. Nevertheless, further studies with other oral and even periodontal pathogens are required.

ACKNOWLEDGMENTS

To the Stomatognathic System Research Group-Colciencias. To Universidad Santo Tomás for offering its facilities, and to the group of professors who provided technical and scientific support for the development of this study.

CONFLICT OF INTEREST

The authors would like to express that there exist no conflict of interest with companies such as Colombina-La Constancia® and Colgate Palmolive®, who produce and commercialize white vinegar and Colgate 360° antibacterial brush® respectively, as the products evaluated in this study.

CORRESPONDING AUTHOR

Laura Viviana Herrera Sandoval
Universidad Santo Tomás at Bucaramanga
Campus Floridablanca
Facultad de Odontología
Edificio Santander
Laboratorio de Ciencias Básicas USTA
Phone number: 680 08 01. Ext.: 2409
Fax number: 639 70 98
Bucaramanga. Colombia
Email address: l.vivianaherrera@gmail.com

REFERENCIAS / REFERENCES

1. Castro P, Corral C, García F, León P, Martínez C, Moreno F. Eficacia de cuatro cepillos dentales en la remoción de placa bacteriana mediante la técnica modificada de Bass en estudiantes de Salud Oral de la ciudad de Cali. *Rev Estomat* 2008; 16(2): 15-24.
2. American Dental Association. Toothbrush care, cleaning and replacement. *J Am Dent Assoc* 2006; 137: 415.
3. Gil E, Segura M, Segura M. Revisión bibliográfica sobre la prevención de la placa dental utilizando cepillos de dientes basados endióxido de titanio TiO₂ [en línea]. 2008 [fecha de acceso 25 de noviembre de 2010]; URL Disponible en: http://biopat.cs.urjc.es/conganat/files/2007-2008_G10.pdf
4. Escobar ML, Fernández G, Santander MC. Comparación de la eficacia de dos diferentes clases de cepillos de dientes en la remoción de placa blanda supragingival en estudiantes de medicina y odontología de III y V semestre de 1992. *CES Odontol* 1993; 6(2): 157-159.
5. Malmberg E, Birkhed D, Norvenius G, Norén JG, Dahlén G. Microorganisms on toothbrushes at daycare centers. *Acta Odontol Scand* 1994; 52: 93-98.
6. Long SR, Santos AS, Nascimento CMO. Avaliação da contaminação de escovas dentais por enterobactérias. *Rev Odontol Univ St Amaro* 2000; 5: 21-25.
7. Glass RT, Shapiro S. Oral inflammatory diseases and the toothbrush. *J Okla Dent Assoc* 1992; 82: 28-32.
8. Wetzel WE, Schaumburg C, Ansari F, Kroeger T, Sziegoleit A. Microbial contamination of toothbrushes with different principles of filament anchoring. *J Am Dent Assoc* 2005; 136(6): 758-765.
9. Casals-Peidro E. Hábitos de higiene oral en la población escolar y adulta española. *RCOE* [revista en línea] 2005 [fecha de acceso noviembre 9 de 2011]; 10(4): 389-401. URL Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1138-123X2005000400002&lng=es
10. Karibasappa GN, Nagesh L, Sujatha BK. Assessment of microbial contamination of toothbrush head: an *in vitro* study. *Indian J Dent Res* 2011; 22 (1): 2-5.
11. Manau C, Zabalegui I, Noguero B, Llodra JC, Echevarría JJ, Martínez-Canut P et al. Control de placa e higiene buccodental, resumen de los resultados del 1.º workshop Ibérico. *RCOE* 2004; 9(2): 215-223.
12. Balappanavara A, Nageshb L, Ankola A, Tangadec P, Kakodkard P, Varune S. Antimicrobial efficacy of various disinfecting solutions in reducing the contamination of the toothbrush. A comparative study. *Oral Health Prev Dent* 2009; 7(2): 137-145.
13. Komiyama EY, Back-Brito GN, Balducci I, Koga-Ito CY. Evaluation of alternative methods for the disinfection of toothbrushes. *Braz Oral Res* 2010; 24(1): 28-33.
14. Beneduce C, Baxter KA, Browman J, Haines M, Andreana S. Germicidal activity of antimicrobials and VIOLight personal travel toothbrush sanitizer: An *in vitro* study. *J Dent* 2010; 38(8): 621-625.
15. Berger JR, Drukartz MJ, Tenenbaum MD. The efficacy of two UV toothbrush sanitization devices. A pilot study. *N Y State Dent J* 2008; 74(1): 50-52.
16. Efstratiou M, Papaioannou W, Nakou M, Ktenas E, Vrotsos IA, Panis V. Contamination of a toothbrush with antibacterial properties by oral microorganisms. *J Dent* 2007; 35: 331-337.
17. Ortodont. Las ventajas del cepillo de dientes antibacterial Ortodont [en línea] [fecha de acceso 24 de noviembre de 2010]; URL disponible en: <http://spanish.ortodont.no/index.php?p=39-40-39>
18. Quirynen M, De Soete M, Pauwels M, Gizani S, Meerbeek B, Steenberghe D. Can toothpaste or an *in vivo* toothbrush with antibacterial tufts prevent toothbrush contamination? *J Periodontol* 2003; 74(3): 312-322.
19. Sato S, Pedrazzi V, Guimarães Lara EH, Panzeri H, Ferreira de Albuquerque R, Yoko I. Antimicrobial spray for toothbrush disinfection: an evaluation. *J Appl Oral Sci* 2004; 12(2): 99-103.
20. Aindalk, Andrade D, Watanab E, Yoko I. Atividade antimicrobiana *in vitro* do acético e dos vinagres branco e tinto sobre bacterias hospitalares. *Rev Ciênc Méd Biol* 2006; 5(2): 111-116.
21. Ryssel H, Kloeters O, Germann G, Shafer TH, Wiedemann G, Oehlbauer M. The antimicrobial effect of acetic acid-an alternative to common local antiseptics. *Burns* 2009; 35: 695-700.
22. Florentino RE, Costa A, Silva S, Macedo G, Duarte M, Martins R. Avaliação das principais características de vinagres comerciais. *Hig Aliment* 2004; 18(119): 36-39.
23. Azuma CRS, Cassanho ACA, Da Silva FC, Ito CYK, Jorge AOC. Atividade antimicrobiana de soluções de acético de diferentes tipos e procedências sobre *Cándida albicans*. *RPG Rev Pós Grad* 2006; 13(2): 164-167.
24. Colombia. Ministerio de la Protección Social. Resolución 8430 por la cual se establecen normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud. 1993.
25. Martínez CA, Forguione WF, Anaya J, Plata AF, Prada SE, Herrera LV et al. Soluciones de uso común en el hogar como alternativa para desinfectar el cepillo dental: un estudio *in vitro*. *Usta Salud* 2010; 9: 75-83.
26. Guilarte C, Perrone M. Microorganismos de la placa dental relacionados con la etiología de la periodontitis. *Acta Odontol Venez* 2004; 42(3): 213-217.

27. Klevens M, Gorwitz R, Collins A. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: a primer for dentists. J Am Dent Assoc 2008; 139: 1328-1337.
28. Smith AJ, Robertson D, Tang MK, Jackson MS, MacKenzi D, Bagg J. *Staphylococcus aureus* in the oral cavity: a three-year retrospective analysis of clinical laboratory data. Br Dent J 2003; 195(12): 701-703.
29. Akiyama H, Yamasaki O, Tada J, Arata J. Effects of acetic acid on biofilms formed by *Staphylococcus aureus*. Arch Dermatol Res 1999; 291(10): 570-573.
30. Gamboa F, Herazo B, Martínez MC. Control microbiológico sobre *Streptococcus mutan* y su acción acidogénica. Univ Sci 2004; 9: 45-55.
31. Abadía CE. Pobreza y desigualdades sociales: un debate obligatorio en salud oral. Acta Bioética 2006; 12(1): 9-22.
32. Soysa NS, Samaranayake LP, Ellepola ANB. Antimicrobials as a contributory factor in oral candidiasis-a brief overview. Oral Dis 2008; 14(2): 138-143.
33. McCullough MJ, Ross BC, Reade PC. *Candida albicans*: a review of its history, taxonomy, epidemiology, virulence attributes, and methods of strain differentiation. Int J Oral Maxillofac Surg 1996; 25: 136-144.
34. Ucar A, Rojas G, Ballester L. Acción de agentes químicos en la eliminación de *Candida albicans* sobre prótesis dentales. Acta Odontol Venez 2007; 45(1):172-177.