



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE PREVENTIVA Y SOCIAL

**Efectividad antimicrobiana del BRIX 3000® contra *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus sanguinis* y *Lactobacillus acidophilus*.
Estudio *in vitro***

Trabajo Especial de Grado para optar al título de Odontólogo

Autores: Niño Ana.

Ramírez Ariana.

Tutor: Dra. Yanet Simancas.

Cotutor: MSc. Greana Aguilera.

Mérida - Venezuela, abril de 2026

DEDICATORIA

Dedico este triunfo profesional a **Dios** y a la memoria de mis sueños y a quienes siempre los mantuvieron vivos:

A mis padres, por su fe y su apoyo inquebrantable.

A mis hijos, por ser el impulso que me hizo superar el miedo al fracaso y recordarme mi valor cada día.

A mis amigos y familiares, por ser el aliento constante en la adversidad.

Con orgullo y gratitud, para ustedes y para mi ilustre **Universidad de Los Andes**.

Ariana Gabriela Ramírez Cáceres.

Dedico mi tesis con todo mi amor y cariño a:

A mi madre Eloina Merchan por ser mi pilar incondicional, por su fe inquebrantable en mis capacidades y por enseñarme que con amor y perseverancia todo es posible. Este logro es tan tuyo como mío mamita.

A mi padre Pedro Niño Aunque tu presencia física me hizo falta, tu recuerdo fue el motor que me impulsó a no rendirme. Espero que, desde donde estés, te sientas orgulloso de la persona en la que me he convertido. Tu ejemplo sigue guiando mi camino.

A mi hija adorada Emily para que siempre sepas que no hay meta inalcanzable si se trabaja con el corazón, eres mi inspiración presente y mi promesa de futuro; este logro te pertenece también a ti.

A mis hermanos y mi cuñada, por ser mis mejores amigos y mi red de apoyo. Gracias por estar presentes en cada paso, por las palabras de aliento y por compartir conmigo la alegría de este sueño cumplido.

Ana Yuleidy Niño Merchan.

AGRADECIMIENTOS

A **Dios**, por ser nuestro guía espiritual, llenarnos de fortaleza en los momentos difíciles y ser la fuerza para no rendirnos y poder culminar esta meta.

A **toda nuestra familia**, en especial a **nuestros padres** quienes con su amor infinito, paciencia y esfuerzo constante, de una u otra forma creyeron en este sueño hasta verlo cumplido, gracias por tanto. ¡LO LOGRAMOS!

A **nuestros hijos**, por ser motor y luz, motivo de resiliencia y perseverancia, quienes nos enseñaron que ser suficientes no es una meta, sino el amor con el que día a día luchamos por nuestros sueños.

Al área de **preparación de medios de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis** de la Universidad de Los Andes de manera especial a la Ing. **Sulay Araque** por su incondicional apoyo y orientación a lo largo de la fase experimental de este estudio.

A la familia de trabajo que conforma el **Centro Diagnóstico La Paz ETR, C.A** por su invaluable colaboración y paciencia.

Al laboratorio **Megalabs**, Dra. **Francy Pírela** y la Lcda. **Ana Ramírez** por su colaboración para la adquisición de insumos.

A la Dra. **Yanet Simancas**, MSc. **Greana Aguilera**, y a la Lcda. **Mileidy Hernández** por su apoyo, paciencia, dedicación y su orientación en esta investigación.

Al Profesor **Elix Izarra** por su colaboración para el procesamiento y análisis de los datos obtenidos en esta investigación.

El aporte de todos, sumó hasta poder materializar este trabajo que hoy representa el inicio a una nueva línea de investigación. Les estaremos eternamente agradecidas.

ÍNDICE

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
ÍNDICE	iii
LISTA DE TABLAS	v
LISTA DE FIGURAS	vi
RESUMEN	viii
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
1.1 Objetivos de la investigación	5
1.1.1 Objetivo general	5
1.1.2 Objetivos específicos	5
1.2 Hipótesis	5
1.3 Justificación	6
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	7
2.1 Antecedentes	7
2.1.1 Efectividad antimicrobiana del Brix 3000® en relación con <i>Streptococcus mutans</i> y <i>Lactobacillus acidophilus</i>	7
2.1.2 Brix 3000® en relación con <i>Streptococcus mutans</i>	8
2.1.3 Otros productos con principio activo gel enzimático de papaína en relación con <i>Streptococcus mutans</i> y <i>Lactobacillus acidophilus</i>	9
2.1.4 Aislamiento de <i>Streptococcus mutans</i> de muestras de placa dental	12

2.2 Bases Conceptuales	12
CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO	20
3.1. Alcance y diseño de investigación	20
3.2. Población y muestra	20
3.2.1. Población	20
3.2.2. Muestra	20
3.3. Sistema de variables	21
3.4. Técnica e instrumento de recolección de datos	22
3.5. Procedimientos, materiales, equipos e instrumentos	22
3.6. Principios éticos	35
3.7. Análisis de resultados	35
CAPÍTULO IV. RESULTADOS	36
4.1 Resultados	36
CAPÍTULO V. DISCUSIÓN	42
CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	46
5.1 Conclusiones	46
5.2 Recomendaciones	46
REFERENCIAS	48
ANEXOS	57

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Estadísticas descriptivas del halo de inhibición de las soluciones ensayadas en las cepas aisladas de <i>Streptococcus sobrinus</i>	38
Tabla 2. Estadísticas descriptivas del halo de inhibición de las soluciones ensayadas contra <i>Streptococcus sanguinis</i>	39
Tabla 3. Estadísticas descriptivas del halo de inhibición de las soluciones ensayadas contra <i>Lactobacillus acidophilus</i>	40

www.bdigital.ula.ve

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Foto referencial de presentación comercial de Brix 3000®	19
Figura 2a. Toma de muestra de saliva	24
Figura 2b. Toma de muestra de placa en cavidad cariosa	24
Figura 2c. Toma de muestra de placa supragingival	25
Figura 3. Siembra de muestras	26
Figura 4. Jarra de microaerofilia	26
Figura 5a. Selección de colonias sospechosas del genero <i>Streptococcus</i>	27
Figura 5b. Coloración de Gram. 100X Microscopio óptico	27
Figura 6. Prueba bioquímica de catalasa	28
Figura 7a. Pruebas bioquímicas de Voges Proskauer (VP) e hidrólisis de esculina	28
Figura 7b. Prueba bioquímica de hidrólisis de esculina positivo	29
Figura 8. Sistema de identificación con pruebas bioquímicas miniaturizadas STEPTOSYSTEM 12®	30
Figura 9a. Pruebas bioquímicas fermentación de carbohidratos (maltosa, lactosa, glucosa, sacarosa, fructosa)	30
Figura 9b. Pruebas bioquímicas fermentación de carbohidratos (maltosa, lactosa, glucosa, sacarosa, fructosa) positivo	31
Figura 10. Preparación de discos	32
Figura 11. Ubicación de los discos para prueba de susceptibilidad antimicrobiana	32

Figura 12a. Prueba de susceptibilidad antimicrobiana para <i>Streptococcus sobrinus</i> en medio de cultivo agar Mueller-Hinton (MHA) + 5% de sangre	33
Figura 12b. Prueba de susceptibilidad antimicrobiana para <i>Streptococcus sanguinis</i> en medio de cultivo agar Mueller-Hinton (MHA) + 5% de sangre	33
Figura 12c. Prueba de susceptibilidad antimicrobiana para <i>Lactobacillus acidophilus</i> en medio de cultivo agar De Man-Rogosa y Sharpe (MRS)	33
Figura 13. Gráfico sobre el diámetro del halo de inhibición en microorganismos <i>Streptococcus sobrinus</i> , según sustancia inhibidora	36
Figura 14. Gráfico sobre el diámetro del halo de inhibición en microorganismos <i>Streptococcus sanguinis</i> , según sustancia inhibidora	37
Figura 15. Gráfico sobre el diámetro del halo de inhibición en microorganismos <i>Lactobacillus acidophilus</i> , según sustancia inhibidora	37
Figura 16. Control del experimento con cepas ATCC de <i>Staphylococcus aureus</i> 25923	41



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGÍA PREVENTIVA Y SOCIAL

Efectividad antimicrobiana del BRIX 3000® contra *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus sanguinis* y *Lactobacillus acidophilus*. Estudio *in vitro*

Trabajo Especial de Grado para optar al título de Odontólogo.

Autores: Niño Ana

Ramírez Ariana

Tutor: Dra. Yanet Simancas

Cotutor: MSc. Greana Aguilera.

RESUMEN

Streptococcus sanguinis, *Streptococcus sobrinus* y *Lactobacillus acidophilus*, son microorganismos propios del microbioma oral que pueden favorecer la aparición de caries dental cuando su equilibrio se altera. El Brix3000® es un gel enzimático de papaína que elimina selectivamente el tejido cariado sin procedimientos invasivos, consolidándose como una alternativa biológica eficaz, segura y conservadora para el manejo de la caries dental. **Objetivo:** determinar la efectividad antimicrobiana del Brix 3000® contra *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus sanguinis* y *Lactobacillus acidophilus*. **Metodología:** se realizó un estudio en una muestra de 57 especímenes biológicos de tipo saliva no inducida, placa dental de cavidad cariosa y placa supragingival, de 19 niños entre 6 y 10 años en el estado Mérida, Venezuela. La recolección de datos se realizó a través de la observación directa en laboratorio controlado, empleando medios selectivos Agar Mitis Salivarius con bacitracina y telurito de potasio al 1% para el aislamiento de *Streptococcus sobrinus* y *Streptococcus sanguinis*, identificados con pruebas bioquímicas miniaturizadas y, agar De Man - Rogosa - Sharpe (MRS) para *Lactobacillus acidophilus*, identificados con pruebas bioquímicas de fermentación de azúcares. Para las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana se elaboraron discos de Brix 3000® diluido 1:2, control positivo discos de clorhexidina al 2% y control negativo discos de solución salina fisiológica estéril. Los análisis estadísticos se realizaron mediante prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. **Resultados:** se observaron promedios de halos de inhibición de 10,4 mm. y 9,5 mm. para los discos de Brix 3000® dilución 1:2, ensayados en las cepas de *Streptococcus sobrinus* y *Streptococcus sanguinis*, respectivamente, no observándose halos de inhibición en las cepas de *Lactobacillus acidophilus*. Al evaluar la actividad antimicrobiana en las cepas de *Streptococcus sobrinus*, se observan diferencias estadísticamente significativas, revelando que el Brix 3000® dilución 1:2 muestra una actividad inhibitoria inferior al control positivo y superior al control negativo. Sin embargo, la alta variabilidad experimental que presenta limita la capacidad de establecer una significación estadística definitiva entre los grupos en las condiciones evaluadas. En las cepas de *Streptococcus sanguinis* y *Lactobacillus acidophilus*, no alcanzó significancia estadística ($p = .123$ y $p = .091$, respectivamente), debido a la alta variabilidad y al reducido tamaño de la muestra. **Conclusiones:** El Brix 3000® produce inhibición del crecimiento del *Streptococcus sobrinus* y *Streptococcus sanguinis*, y no contra *Lactobacillus acidophilus*. Sin embargo, en las condiciones evaluadas no se puede confirmar su efectividad antimicrobiana.

Palabras clave: caries, microbioma bucal, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus sobrinus*, *Lactobacillus acidophilus*, Brix 3000, efectividad antimicrobiana, niños.

INTRODUCCIÓN

La caries dental es una enfermedad infecciosa de etiología multifactorial, la cual produce un deterioro sustancial sobre los órganos dentarios, en la cual los principales microorganismos cariogénicos responsables de la formación de dichas lesiones son *Streptococcus mutans* como principal patógeno, seguido de *Streptococcus sobrinus* quien aumenta la virulencia en etapas tempranas y *Lactobacillus acidophilus*; siendo capaces de provocar la pérdida de minerales en el esmalte y la consecuente formación de una cavidad, esto debido al desequilibrio iónico en el proceso de mineralización y desmineralización de los tejidos duros del diente como producto del metabolismo de carbohidratos por parte de estas bacterias.

En este sentido, expertos en el área de microbiología en los últimos años han realizado investigaciones para buscar alternativas de tratamiento en la remoción de la mayor cantidad de tejido dentario desmineralizado e infectado, en un ambiente más cómodo para el paciente. Es así, como se comienza a usar el Brix 3000®, un producto médico-odontológico de remoción químico-mecánica, a base de papaína bioencapsulada con tecnología EBE (Encapsulating Buffer Emulsion) y, que por su efecto antimicrobiano se propuso su estudio sobre las bacterias causales de la caries dental.

Esta investigación nace de una brecha de conocimiento, empírica y de evidencia contradictoria sobre el efecto del Brix 3000® contra *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus sobrinus* y *Lactobacillus acidophilus*, mediante métodos experimentales en pruebas de laboratorio para estudios *in vitro*, debido a que no hay información concluyente en la literatura científica y la existente resulta controversial sobre la efectividad del Brix 3000® sobre los microorganismos antes mencionados.

Se realizó un estudio experimental en una muestra conformada por 57 especímenes biológicos de tipo saliva no inducida, placa dental de cavidad cariosa y placa supragingival, de 19 niños en edad escolar entre 6 y 10 años de edad en escuelas del municipio Libertador del estado Mérida, Venezuela para determinar en un estudio *in vitro*, la efectividad antimicrobiana del Brix 3000® contra *Streptococcus sobrinus*,

Streptococcus sanguinis y *Lactobacillus acidophilus*. La técnica de recolección de datos fue la observación directa en laboratorio controlado, empleando medios selectivos agar Mitis Salivarius con bacitracina y telurito de potasio al 1% para el aislamiento de *Streptococcus sobrinus* y *Streptococcus sanguinis*, identificados con pruebas bioquímicas miniaturizadas y, agar De Man - Rogosa - Sharpe (MRS) para *Lactobacillus acidophilus*, identificados con pruebas bioquímicas de fermentación de azúcares. Para las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana se elaboraron discos de Brix 3000 diluido 1:2, control positivo discos de clorhexidina al 2% y control negativo discos de solución salina fisiológica estéril. Los análisis estadísticos se realizaron mediante prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, evaluando los halos de inhibición.

El presente trabajo especial de grado está estructurado en 6 capítulos:

Capítulo I: titulado planteamiento del problema, se formuló el problema, los objetivos de la investigación y se argumentaron las razones que justifican el estudio.

Capítulo II: hace referencia al marco teórico, el cual se divide en dos partes; en primer lugar, se da conocer los antecedentes que sustentan la investigación; luego se presentan los fundamentos teóricos sobre caries dental, microorganismos cariogénicos, técnicas para la remoción de caries y gel enzimático de papaína.

Capítulo III: marco metodológico, el cual describe el enfoque, alcance y diseño de la investigación, población y muestra, procedimiento de laboratorio para el experimento propiamente dicho y, el procedimiento para el análisis de los datos.

Capítulo IV: se presentan los resultados que se obtuvieron en esta investigación,

Capítulo V: presenta la discusión, el análisis y la interpretación de los resultados.

Capítulo VI: finalmente, se presentan las conclusiones y recomendaciones a las que condujo esta investigación.

CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La caries dental es una enfermedad de origen multifactorial, considerada como un problema de salud a nivel mundial que se presenta con mayor incidencia en niños. Se ha determinado que existe una alteración del microbioma habitual, predominando en este proceso *Streptococcus mutans* como principal responsable acompañado por *Lactobacillus acidophilus* lo que genera un desequilibrio bacteriano junto a otros factores condicionantes que permiten el avance de la enfermedad¹⁻⁶. No obstante, la complejidad del microbioma oral y las variaciones de pH resultantes de las exposiciones a azúcares de la dieta sugiere que otros microorganismos como *Streptococcus sanguinis* pueden afectar su comportamiento mostrando cierto potencial cariogénico⁷, jugando entonces un papel relevante en la dinámica bacteriana de la cavidad bucal, lo que hace necesario evaluar su comportamiento frente a nuevos tratamientos.

El protocolo de manejo para la caries dental tradicionalmente ha consistido en la remoción mecánica del tejido infectado, con la desventaja de no tener un control en la remoción total del tejido afectado y la posibilidad de pérdida de estructura sana. Por ello, se han implementado otros medios atraumáticos de remoción como lo es la remoción química, en la que el agente usado debe tener propiedades antimicrobianas que permitan garantizar la eliminación completa de bacterias en el tejido sano, posteriormente restaurar y así disminuir el riesgo a complicaciones postoperatorias^{6,8-10}.

Entre los agentes de remoción química se encuentra el gel de papaína, ésta es una enzima proteolítica obtenida de la papaya^{11,12}, actúa destruyendo las moléculas de colágeno que han sido parcialmente degradadas por una actividad severa de caries, incluso puede digerir células inertes y así facilitar su eliminación. No afecta el colágeno intacto, solo el de la dentina cariada, por lo que elimina selectivamente dentina con colágeno desnaturalizado, sin afectar el tejido sano¹³.

En la última década se han realizado distintas investigaciones con el objetivo de establecer la actividad antimicrobiana del gel de papaína, pero es de notar la controversia

en los resultados y la falta de lineamientos en la estandarización de las técnicas utilizadas, no permitiendo su reproducibilidad y resultados poco confiables.

Ortega⁴ se propuso comparar la actividad antimicrobiana de la clorhexidina al 2% y Papacárie® (removedor químico de caries) en microorganismos asociados a la caries dental como *Streptococcus mutans*. Para ello, realizó una medición de las colonias a las 24, 48 y 72 horas, observándose que a las 24 horas hubo poco crecimiento de los microorganismos que fueron expuestos tanto con clorhexidina al 2% como al Papacárie®. Sin embargo, a las 48 y 72 horas se evidenció un crecimiento microbiológico en el grupo al que se le aplicó Papacárie®. Concluye que la clorhexidina sigue siendo la mejor sustancia en la desinfección y eliminación de microorganismos.

Asimismo, Sandoval⁵, realizó un estudio que tuvo por objetivo determinar la efectividad antibacteriana de Papacárie®, Brix 3000® y la yodopovidona al 8% contra *Streptococcus mutans*. Concluye que al limitarse a pruebas contra *Streptococcus mutans*, no se puede confirmar la actividad antibacteriana de las soluciones evaluadas, pues dicho microorganismo no es el único involucrado en la formación y actividad de caries dental. Además, se desconoce su cuál será su eficacia *in vivo* y otros factores que puedan influir en la formación de un halo de inhibición.

Por su parte, Kandil *et al.*¹⁴, realizó un estudio para determinar la eficacia en la acción bactericida y bacteriostática del Brix 3000® al compararla con la técnica convencional de eliminación de caries dental. Los investigadores concluyen que ambas técnicas son efectivas para la disminución del recuento de bacterias, tanto *Streptococcus mutans* como de *Lactobacillus acidophilus*, lo que indica la eficacia en la acción bactericida y bacteriostática del Brix 3000®, sin embargo, sugiere realizar estudios con muestras más grandes y con un seguimiento a largo plazo para poder generalizar los resultados de la investigación.

Por lo anteriormente descrito, aun cuando se han realizado algunos estudios para evaluar el efecto antimicrobiano del gel de papaína sobre *Streptococcus mutans* o *Lactobacillus acidophilus*, no se han encontrado reportes de la literatura que determinen la efectividad del Brix 3000® contra *Streptococcus sobrinus* quien se encuentra estrechamente relacionado con la progresión de la caries dental, ni contra *Streptococcus*

sanguinis quien a pesar de ser del microbioma habitual de la cavidad bucal, está presente en la placa dental. Por tanto, se llega a la siguiente pregunta de investigación:

¿Cuál es la efectividad antimicrobiana del Brix 3000® en cepas de *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus sanguinis* y *Lactobacillus acidophilus*, aisladas de saliva no inducida, placa dental de cavidad cariosa y placa supragingival?

1.1 Objetivos de la investigación

1.1.1 Objetivo general

Determinar en un estudio *in vitro*, la efectividad antimicrobiana del Brix 3000®, en cepas de *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus sanguinis* y *Lactobacillus acidophilus*, aisladas de saliva no inducida, placa dental de cavidad cariosa y placa supragingival.

1.1.2 Objetivos específicos

1. Evaluar la acción antimicrobiana del Brix 3000® en cepas de *Streptococcus sobrinus*, aisladas de saliva no inducida, placa dental de cavidad cariosa y placa supragingival.
2. Evaluar la acción antimicrobiana del Brix 3000® en cepas de *Streptococcus sanguinis*, aisladas de saliva no inducida, placa dental de cavidad cariosa y placa supragingival.
3. Evaluar la acción antimicrobiana del Brix 3000® en cepas de *Lactobacillus acidophilus*, aisladas de saliva no inducida, placa dental de cavidad cariosa y placa supragingival.
4. Comparar la efectividad antimicrobiana de Brix 3000®, de la clorhexidina al 2% y de la solución salina fisiológica estéril en cepas de *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus sanguinis* y *Lactobacillus acidophilus*, aisladas de saliva no inducida, placa dental de cavidad cariosa y placa supragingival.

1.2 Hipótesis

Para la presente investigación se planteó la siguiente hipótesis alternativa:

El producto de remoción atraumático de caries Brix 3000® presenta efectividad antimicrobiana sobre *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus sanguinis* y *Lactobacillus acidophilus*.

1.3 Justificación

La presente investigación se justifica por los siguientes motivos:

En primer lugar, si bien la revisión de la literatura científica indica que se han realizado estudios que describen el gel enzimático de papaína y sus diferentes propiedades, se ha encontrado poca evidencia científica que demuestre la efectividad antimicrobiana del Brix 3000® en cepas de *Lactobacillus acidophilus* y no se han encontrado estudios que describan su actividad antimicrobiana contra *Streptococcus sobrinus* ni *Streptococcus sanguinis*.

En segundo lugar, a pesar de que existen algunos estudios que pretenden demostrar la actividad antimicrobiana del Brix 3000®, los resultados y conclusiones son controversiales y contradictorios.

En tercer lugar, el presente estudio resulta de gran utilidad, pues considerada la caries dental como una entidad que afecta a la población pediátrica y adulta a nivel mundial y siendo el método de remoción convencional el más utilizado, de obtener resultados favorables se podría sugerir al Brix 3000® como una opción de tratamiento alternativo seguro, que podría resultar menos invasivo, contribuyendo a aquella población con menos recursos e inclusive ubicada en zonas lejanas o no privilegiadas cuya atención odontológica convencional sea compleja de realizar.

En cuarto lugar, en el estado Mérida, Venezuela y, específicamente en la Facultad de Odontología de la Universidad de Los Andes, no hay estudios realizados en esta área, por tanto, el iniciar esta línea de investigación constituye un aporte a la misma.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes

Tras una revisión de la literatura, se ha evidenciado una notable ausencia de investigaciones que evalúen la efectividad antimicrobiana de Brix 3000® específicamente frente a las cepas de interés para este estudio, tales como *Streptococcus sobrinus* y *Streptococcus sanguinis*. De igual modo, aunque existen reportes sobre *Lactobacillus acidophilus*, sus hallazgos no resultan concluyentes.

Por lo expuesto, en este capítulo se detallan los antecedentes teóricos organizados de forma temática. La revisión inicia con estudios sobre la efectividad del Brix 3000® y otros geles enzimáticos de papaína en cepas de *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus acidophilus*. Finalmente, se abordan investigaciones sobre el aislamiento de *Streptococcus mutans* en placa dental, dada su estrecha relación biológica con *Streptococcus sobrinus* y su coexistencia en el ambiente típico de *Streptococcus sanguinis*.

2.1.1 Efectividad antimicrobiana del Brix 3000® en cepas aisladas de *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus acidophilus*

Kandil *et al.*¹⁴, evaluaron la eficacia clínica del agente removedor de caries a base de papaína, Brix 3000®, en comparación con el método convencional de fresas rotatorias en dientes temporales. Los resultados microbiológicos no mostraron diferencias estadísticamente significativas en el crecimiento bacteriano inicial de *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus acidophilus* entre ambos grupos. Sin embargo, tras la intervención, se observó una reducción significativa en ambos métodos, lo que confirma su efectividad. Se concluye que tanto la eliminación mecánica convencional como el uso de Brix 3000® poseen una alta capacidad para reducir la carga bacteriana en la dentición decidua.

2.1.2 Brix 3000® con relación a *Streptococcus mutans*

Sandoval⁵, evaluó la efectividad antibacteriana de los removedores atraumáticos Papacárie® y Brix 3000®, la yodopovidona al 8% y clorhexidina al 2% como control positivo, frente al *Streptococcus mutans*. Se observó que solo el control positivo generó un halo de inhibición de 21.71 mm, mientras que las demás sustancias experimentales no mostraron actividad inhibitoria. Este autor indica que no se pueden afirmar que los removedores atraumáticos de caries y la yodopovidona no funcionan como antibacterianos, además enfatiza que los resultados obtenidos contra el *Streptococcus mutans* no son definitivos para el entorno clínico, ya que en la cavidad bucal existe un biofilm complejo y no bacterias aisladas, ni es el único relacionado con el desarrollo de caries dental. Asimismo, señala que los estudios *in vitro* no replica la difusión del fármaco en el diente, sugiriendo además que la concentración de yodopovidona pudo ser insuficiente para formar un halo de inhibición.

Cardoso *et al.*¹⁵, evaluaron la efectividad clínica y microbiológica de la remoción de caries en lesiones cavitadas de dientes temporales, comparando el método tradicional frente a sistemas químico-mecánicos (Brix 3000® y Papacárie®). El estudio evidenció el recuento total de bacterias viables, en la toma de muestra inicial donde se obtuvieron en promedio resultados similares en los tres grupos. Después de realizado el procedimiento, los métodos químico-mecánicos alcanzaron una reducción bacteriana significativamente superior en un 65,95% y 83,45%, respectivamente, en comparación con la técnica convencional en un 41,22%, $p < 0,001$. Concluyen que las técnicas que utilizan algún agente químico permiten una mayor eliminación de bacterias durante la remoción de tejido cariado. No obstante, los autores no especifican las cepas bacterianas particulares sobre las cuales se ejerció dicha acción antimicrobiana.

Inamdar *et al.*¹⁶, en un estudio *in vivo*, evaluaron la eficacia y eficiencia del Brix 3000®, Carie-Care y fresas Smart Burs, para la remoción de caries dental, a través de la reducción del recuento bacteriano mediante el conteo de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC). Se observó que se logró con el Brix 3000® ($156,93 \times 10^4$ UFC), seguido de Smart Burs ($139,07 \times 10^4$ UFC) y Carie-Care ($135,80 \times 10^4$ UFC).

Concluyen que las técnicas redujeron el recuento bacteriano, siendo el Brix 3000® el más eficaz de los tres. Los autores recomiendan realizar estudios clínicos a largo plazo para comparar estos nuevos agentes con fresas de alta velocidad; al igual que el estudio anterior, en este no se identificó las bacterias involucradas en las lesiones cariosas.

Angel *et al.*¹⁷, evaluaron el efecto antimicrobiano del Brix3000® como agente de remoción químico-mecánica de caries a base de papaína, con Clorhexidina al 2% como control positivo y, caldo enriquecido de soya tripticaseína TSB como control negativo. Se observó que el crecimiento del número de UFC en las muestras de dentina infectada con el Brix3000® fue de $9 \pm 4.1 \times 10^4/\text{mL}$, mientras que en las muestras con clorhexidina al 0.2% fue de $22.6 \pm 12.3 \times 10^4/\text{mL}$, encontrándose una disminución estadísticamente significativa del crecimiento bacteriano cuando se comparó con las muestras que no fueron expuestas a ningún compuesto $153 \pm 43.9 \times 10^4/\text{mL}$ ($p < 0.001$). Concluyen que el Brix3000® tiene un mayor efecto antimicrobiano, sin embargo, recomiendan que se realicen más estudios para evaluar el efecto antimicrobiano de este producto, utilizando un mayor número de muestras e identificando las especies bacterianas presentes para determinar la sensibilidad o resistencia del agente químico removedor de la caries dental.

Toro¹⁸, en un estudio *in vitro* comparó el efecto antibacteriano de dos removedores químico-mecánicos de la caries dental Carisolv® y Brix 3000® en una cepa estándar de *Streptococcus mutans*. Se observó que el Carisolv® tiene un porcentaje de efectividad de 100% mientras que el Brix 3000® su efectividad es nula. Recomendamos seguir realizando investigaciones con otras cepas como *Lactobacillus* y *Staphylococcus*, así como también realizar investigaciones *in vivo* con el Brix 3000® y el Carisolv®, para determinar si el resultado *in vitro* tiene el mismo efecto.

2.1.3 Otros productos cuyo principio activo es el gel enzimático de papaína con relación a *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus acidophilus*

Ortega⁴ evaluó la eficacia antimicrobiana de la clorhexidina al 2% frente al gel Papacárie® sobre *Streptococcus mutans*. Se pudo observar que a las 24 horas hubo poco crecimiento en ambos grupos; sin embargo, a partir de las 48 horas, el grupo ensayado con Papacárie® evidenció un incremento en las unidades formadoras de

colonias (UFC), obteniendo 50% de UFC en baja cantidad, 50% cantidad moderada de UFC para el grupo control; mientras que en el grupo experimental se obtuvo un 41,7% en cantidad baja de UFC, 50% UFC en cantidad moderada y un 8.3% de UFC en cantidad alta. A las 72 horas hubo mayor diferencia de recuento de colonias observando que en 58.4% hubo 29 UFC en moderada cantidad y con un porcentaje de 33.3% hubo una baja cantidad de UFC. Sólo se tuvo un 8.3% de UFC en cantidad alta para el grupo control versus el 58.3% UFC en cantidad moderada, un 25% en cantidad alta de UFC, y sólo un 16.7% en cantidad baja de UFC del *Streptococcus mutans*, en el grupo del Papacárie®. Concluyen que a las 72 horas existe más efectividad de inhibición de microorganismos con la clorhexidina al 2% que con el Papacárie®.

AlHumaid¹⁹, comparó *in vitro* la eficacia y eficiencia del Papacárie® y el método convencional en la eliminación de caries de dientes primarios. La presencia/ausencia de bacterias se comparó entre los dos grupos mediante la prueba de χ^2 (χ^2) y el tiempo (en segundos) necesario para la eliminación de la caries se comparó mediante la prueba *t* de student. Se observó que la presencia de colonias bacterianas después de la eliminación de caries con Papacárie® (n = 7; 23,3%) fue ligeramente mayor que con el método convencional (n = 5; 16,7%) ($p = 0,52$). En cuanto al tiempo medio para la eliminación de caries en los dientes primarios usando Papacárie® fue significativamente mayor que el de la fresa de carburo (351,56 s versus 158,41 s) ($P < 0,0001$). Se concluye que no hubo diferencia significativa en la presencia de colonias bacterianas después de la eliminación de la caries con Papacárie® y la técnica convencional. Cabe destacar que este estudio no identificó las bacterias observadas.

Gulzar *et al.*²⁰, compararon la actividad antimicrobiana de dos removedores químico-mecánicos de caries Carisolv® y Carie-Care. Se tomó el recuento total viable (TVC), medida de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL) en los dientes y se evaluaron muestras de dentina limpia para detectar *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus acidophilus* después de la eliminación del tejido cariado. Los resultados mostraron una reducción significativa en el medio después del uso de ambos geles, sin embargo, no hubo diferencia significativa entre ambos grupos.

Goyal *et al.*²¹, compararon la eficacia y tolerancia del Papacárie® con el método convencional en la eliminación de caries. En 25 niños con al menos 2 molares con lesión de caries oclusal amplia, un diente fue tratado con Papacárie® y el otro con la técnica convencional, se tomaron muestras de dentina antes y después de la eliminación completa de la caries. Se observa que el recuento de *Lactobacillus* y de *Streptococcus* disminuyeron significativamente en las muestras tomadas después de la eliminación de la caries con ambos métodos, presentando resultados similares ($p < 0,001$).

Segura *et al.*³, en un estudio *in vitro* e *in vivo* analizaron nuevos materiales biológicos (papaína, pectina, tres extractos de plantas y sus combinaciones), para la prevención, control y tratamiento de las bacterias orales y la biopelícula bacteriana. Se observó que, en todos los tratamientos, excepto con la papaína y la pasta de dientes, una disminución de *Streptococcus*. Se concluye que la papaína no demostró efecto antibacteriano contra *Streptococcus* en un medio líquido. Sin embargo, se recomienda ensayos con formación de biopelículas, ya que según los resultados de las pruebas *in vivo*, los extractos de las plantas seleccionadas (*Quercus rubra*, *Carya illinoensis* y *Smilax gliphylla*) y la papaína (con o sin pectina) tuvieron un efecto inhibitor sobre la formación de biopelículas dentales.

Zaragoza y Calixto²², determinaron la actividad antimicrobiana del Papacárie® contra *Streptococcus mutans* aislado en muestras de saliva. Transcurrido 24 horas se observaron halos de inhibición desde 30 mm a 45 mm con un promedio de $37,3 \text{ mm} \pm 4,37 \text{ mm}$. Estos autores concluyen que el Papacárie® posee una elevada actividad antimicrobiana sobre *Streptococcus mutans*, comprobando así sus propiedades bactericidas, por su composición la cual cuenta con sustancias antimicrobianas, como la papaína, cloramina y azul de toluidina.

Alvarado *et al.*², en un estudio *in vitro* comprobaron la efectividad de Papacárie® con relación al tiempo de exposición indicado por el fabricante. Se observó después de 15 segundos un promedio de 0 UFC; a los 30 segundos un promedio de 0,4 UFC, a las 48 horas de 3668 UFC y, de 4488 UFC a las 72 horas de control. Se concluye que Papacárie® tiene un efecto durante las 24 horas, pero se pierde a medida que avanza el

tiempo y las bacterias recuperan su viabilidad, siguiendo la acción bacteriostática del producto.

2.1.4 Aislamiento de *Streptococcus mutans* a partir de muestras de placa

La literatura científica coincide en que, para garantizar un aislamiento efectivo de la microbiota cariogénica, se deben priorizar técnicas que permitan la búsqueda en los nichos de mayor concentración bacteriana, bajo esta premisa el aislamiento de *Streptococcus* del grupo *mutans* a partir de muestras de placa bacteriana se presenta como un procedimiento esencial, fundamentado en antecedentes que demuestran que la selección de medios selectivos y técnicas de siembra estandarizadas es el mecanismo que asegura la correcta identificación del agente etiológico y minimiza sesgos en la fase diagnóstica.

Calisaya *et al.*²³, determinó la efectividad inhibitoria de los extractos de ajo (*Allium sativum*) y té verde (*Camellia sinensis*) frente a cepas de *Streptococcus mutans* aisladas de placa dental. El estudio incluyó clorhexidina al 0,12% como control positivo y agua destilada como control negativo, con evaluaciones realizadas a las 24 y 48 horas. Se observó halos de inhibición a las 24 y 48 horas; el mejor efecto inhibitorio lo registra el extracto de Ajo (*Allium sativum*) al 100% a las 24 horas con un promedio de 15.67 mm de halo inhibición frente al Té verde (*Camelia sinensis*) al 100% con un promedio de 14.18 mm. Se concluye que el extracto de ambas plantas tiene efecto inhibitorio *in vitro* frente a las cepas de *Streptococcus mutans*.

2.2 Bases Conceptuales

2.2.1 Caries dental

Es una enfermedad multifactorial^{1,6-8,24,25} y es reconocida como una entidad patológica transmisible, de carácter invasivo y destructivo que lleva a la pérdida de tejido dentario²⁶, debido a la producción de ácidos que generan las bacterias presentes en la placa bacteriana al metabolizar sustratos tales como azúcares y almidones que se encuentran en alimentos y bebidas; estos ácidos degradan la matriz de colágeno

presente en las diferentes estructuras dentarias causando desmineralización de las mismas, avanzando continuamente desde el tejido dental más externo (esmalte o cemento), prosiguiendo por la dentina hasta llegar a la pulpa dentaria^{7,27}.

Siendo considerada como un incesante problema de Salud Pública, a nivel mundial aún se considera la enfermedad más crónica y con mayor extensión afectando a numerosos niños en diferentes países²⁷.

2.2.1.1 Tipos de caries dental

2.2.1.1.1 Caries de esmalte

La caries en esmalte pasa por períodos de desmineralización y remineralización, si este proceso se altera, se pierden elementos como fosfato y calcio, trayendo como consecuencia la pérdida de cristales de hidroxiapatita presentes en el esmalte dental, y si esto sucede la disolución será progresiva, el esmalte se verá más opaco y se volverá más poroso, estas características corresponden con una lesión cariosa inicial²⁷.

La caries de esmalte se manifiesta primero como una mancha blanca^{27,28}, que presenta etapas de desmineralización seguidas de etapas de remineralización; cuando el proceso de remineralización es mayor que el de desmineralización se dice que la caries es reversible²⁸.

2.2.1.1.2 Caries de dentina

La dentina es un tejido conjuntivo diferenciado, calcificado y sensible, segregado por los odontoblastos, constituido por un 50% de materia inorgánica (cristales de hidroxiapatita más pequeños que los del esmalte, calcio en menor cantidad y 5% de carbonatos), 30% de materia orgánica y 20% de fluidos⁹. Los túbulos se hallan desorganizados, con aspecto de humedad, con consistencia blanda, coloración amarillenta a marrón, debido a la reducción de dentina peritubular y al incremento de diámetro tubular. Así pues, esta dentina se halla irreversiblemente desnaturalizada y desmineralizada²⁹ y se dividen en:

2.2.1.1.2.1 Dentina infectada

Denominación que se le da a la capa exterior de la dentina cariada, caracterizada por poseer contenido bacteriano sumamente alto, presente en el interior de los túbulos dentinarios y que es además incapaz de remineralizarse^{29,30}, el tejido dentario es no vital, se tiñe con detectores de caries y colorantes, y debe eliminarse²⁹.

2.2.1.2.2 Dentina afectada

Capa subyacente que se caracteriza por: pérdida de minerales, posibilidad de remineralizarse y poseer un contenido bacteriano insignificante^{29,30}, es considerada también como un tejido vital, más sensible y dura comparada con la dentina infectada, por lo que debe conservarse²⁹.

2.2.2 Microbioma oral

2.2.2.1 Microorganismos cariogénicos

El concepto actual contempla que varios microorganismos se incluyen en la patogénesis de la caries dental (*Streptococcus* del grupo *mutans*, *Lactobacillus* spp. y *Actinomyces* spp.) de los cuales, *Streptococcus mutans* es el más relacionado a la aparición y desarrollo de la misma³¹⁻³³.

La etiología de la caries dental se asocia a múltiples factores que están relacionados con la evolución de una población bacteriana que pasa de una biopelícula saludable a una patológica. Una biopelícula sana o saludable puede estar formada por más de 700 especies bacterianas, de las cuales menos del 1% son bacterias potencialmente patógenas; una biopelícula saludable actúa como defensa de primera línea para ayudar a proteger la cavidad bucal de infecciones por bacterias patogénicas u otros patógenos³¹.

Cuando ocurren cambios en la flora bacteriana, estos inducen, a su vez, a variaciones del pH interactuando *Streptococcus* del grupo *mitis* (*Streptococcus sanguis*, *Streptococcus gordonii* y *Streptococcus oralis*), con las especies acidúricas como el grupo de *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus*. Estos últimos son capaces de producir grandes

cantidades de ácidos en un pH bajo, resultando en una placa altamente ácida que favorece la desmineralización dental³³.

2.2.2.1.1 *Streptococcus mutans*

Es el agente más importante asociado a caries dental, es el primero en colonizar la superficie del diente después de la erupción³¹ y recibe su nombre por su tendencia a cambiar de forma, se puede encontrar como coco o de forma más alargada, como bacilo^{32,33}.

Es un microorganismo capaz de sintetizar polisacáridos, dextrosa y fructanasas para posteriormente favorecer a la producción de ácidos; es considerado como un microorganismo acidógeno, acidófilo y acidúrico, ya que es capaz de producir ácido láctico, el cual interviene en el proceso de desmineralización del diente induciendo a la formación de caries y cavidades en el esmalte. Puede sobrevivir, desarrollarse y seguir generando ácido en un pH bajo³⁴.

2.2.2.1.2 *Streptococcus sobrinus*

Streptococcus sobrinus destaca por su estrecha relación con el desarrollo de la caries dental, incluso en escenarios clínicos donde la progresión de las lesiones es independiente de *Streptococcus mutans*, su agresividad radica en una mayor capacidad acidogénica y una mayor tolerancia a entornos ácidos, lo que le permite mantener una actividad metabólica sostenida en condiciones de pH extremadamente bajo. Esta ventaja competitiva, documentada ampliamente en la literatura, lo posiciona como un patógeno clave en la desmineralización del esmalte dental y un alto índice de CPOD (índice de dientes permanentes cariados, perdidos y obturados)^{35,36,37}.

Además de su potencia metabólica, esta especie facilita la formación de biopelículas patogénicas mediante relaciones simbióticas con otros microorganismos de la comunidad oral. Diversos estudios demuestran que su presencia es significativamente más frecuente y elevada en niños con caries activa en comparación con individuos sanos. Por tanto, la detección de *Streptococcus sobrinus* no solo es un indicador de alta

virulencia, sino también un factor determinante en la severidad de las lesiones cariosas en la población infantil ^{35,36,38}.

2.2.2.1.3 *Lactobacillus acidophilus*

Al igual que *Streptococcus mutans*, este microorganismo también se encuentra asociado a la caries dental en etapas más avanzadas; su capacidad de producción de ácido láctico, le otorga mayor facilidad para sintetizar polisacáridos y de esta manera tener una gran actividad en la dentina³⁴.

Los *Lactobacillus* se relacionan con la progresión de la lesión cariosa en corona y/o raíz. El alto grado de infección por *Lactobacillus* ($>10^6$ UFC *Lactobacillus*/mL de saliva), se relaciona con elevada ingesta de carbohidratos fermentables, así como, una elevada actividad de caries³³.

2.2.2.2 Microbioma comensal: *Streptococcus sanguinis*

Anteriormente conocido como *Streptococcus sanguis*, es un coco Gram positivo anaerobio facultativo, no formador de esporas, dispuesto en cadenas cortas o pares de cocos e inmóvil³⁹.

Descrito ampliamente en la literatura como un microorganismo comensal que se asocia típicamente a la placa dental y aun así su presencia se correlaciona con salud oral; sin embargo, también se ha descrito su participación en el desarrollo de endocarditis bacteriana^{39,40}.

2.2.3 Factores que favorecen la producción de microorganismos cariogénicos y la caries dental

La caries dental está influenciada por muchos factores, como el medio ambiente, el comportamiento, el estilo de vida, la mala higiene bucal, la pobreza, entre otros. La colonización de bacterias productoras de ácido y carbohidratos fermentables desempeña un papel fundamental en el desarrollo de la caries dental. Afecta a todas las edades, desde niños pequeños hasta adultos^{35,36}.

2.2.4 Tratamiento de la caries dental

2.2.4.1 Técnica de remoción de caries

La caries dental como enfermedad sigue siendo un problema sanitario a nivel mundial y es por ello por lo que ante la presencia de cavidades por caries y la necesidad de tratarla, se han empleado muchos métodos a lo largo de la historia odontológica⁴¹.

2.2.4.1.1 Técnica mecánica rotatoria

En la técnica convencional de remoción de tejido infectado se utilizan los siguientes instrumentos: piezas de alta y baja velocidad, fresas y curetas de dentina. Esta técnica en su procedimiento elimina tejido infectado y tejido sano; se sigue empleando en los pacientes que acuden a centros especializados. Black diseñó los pasos a seguir en operatoria dental, el primer paso es obtener un acceso visible a la lesión mediante una cavidad, esto se realiza con la pieza de alta velocidad y fresas; si la caries abarca hasta dentina, ésta debe removerse manualmente con curetas de dentina, si la lesión es profunda o cerca de la cámara pulpar se debe tener mayor cuidado de no retirar tejido sano o afectado²⁷.

Ante la presencia de caries se pueden tomar dos medidas terapéuticas, si la caries se limita al esmalte, el tratamiento de elección será la remineralización del diente mediante la aplicación de flúor y su control en citas posteriores; si la caries afecta a la dentina esta deberá de ser eliminada. El resultado será pérdida de tejido dental que deberá recuperarse mediante los diferentes materiales restauradores de los que disponemos hoy en día²⁷.

2.2.4.1.2 Técnica restauradora atraumática

Es un procedimiento que se caracteriza por asociar el carácter preventivo a una intervención mínimamente invasiva, cuando sea necesario. Se basa en la eliminación de tejido dentario cariado, utilizando únicamente instrumentos cortantes manuales⁴².

2.2.4.1.2.1 Gel enzimático de papaína

En 1972, se introdujo por primera vez el concepto de remoción químico-mecánico de caries con el uso del hipoclorito de sodio para remover materia orgánica de la dentina, sin embargo, tenía el inconveniente de agresión a los tejidos sanos. En 1975, se introdujo el sistema de agentes químico mecánicos para la remoción de caries (GK-101) y posteriormente, se introdujeron al mercado productos como el Caridex y Carisolv®. Por último, el Papacarie® se introdujo en 2003 constituyendo una alternativa conservadora pues ofrece eliminar la caries sin inducir a una pérdida de tejido dentario sano⁴².

La papaína es una enzima proteolítica. Tiene características bactericidas, bacteriostáticas y antiinflamatorias⁴³⁻⁴⁵; de manera similar a la pepsina humana, la papaína actúa como desbridante, agente antiinflamatorio que no daña el tejido sano y acelera el proceso cicatricial⁴³.

2.2.4.1.2.1.1 Propiedades

Las propiedades más importantes que se le atribuyen al gel de papaína son⁴⁶:

- a. Acelera el proceso cicatricial.
- b. Acción bacteriostática.
- c. Acción bactericida.
- d. Propiedad desinfectante.
- e. Acción antiinflamatoria.
- f. Preserva la dentina afectada para su posterior desmineralización.

2.2.4.1.2.2 Brix 3000®

En 2016 en Argentina se había declarado un nuevo material denominado Brix 3000® (*Figura 1*). Se trataba de un producto odontológico con actividad enzimática de 3000 U/mg para el tratamiento atraumático de caries^{13,14,47}, libre de hipoclorito de sodio⁴⁷.



Figura 1. Presentación comercial Brix 3000®⁴⁷.
Tomado de Web site del fabricante.

2.2.4.1.2.2.1 Composición y características del Brix 3000®

De acuerdo con el fabricante, la diferencia de este producto con otros removedores químicos es la cantidad de Papaína utilizada (3000 U/mg en una concentración del 10%) quien es el componente principal del producto, y la bioencapsulación de la misma por la tecnología EBE (Encapsulating Buffer Emulsion), lo cual le otorga al gel el pH óptimo para inmovilizar la enzima y liberarla al momento de ejercer su proteólisis sobre el colágeno desnaturalizado de la caries, incrementando su actividad por encima de un 50 a 60%. De esta manera, se logra una alta actividad proteolítica sobre el tejido necrótico para remover fibras de colágeno en tejido cariado, menor disolución del principio activo por los fluidos bucales, además de mayor potencia antibacteriana y antifúngica, con aumento de su poder antiséptico a nivel de los tejidos; es de acción selectiva, es decir, solo actúa en tejido necrosado y pierde su capacidad enzimática al tomar contacto con tejidos sanos^{16,17,47-49}.

2.2.4.1.2.2.2 Mecanismo de acción

Actúa exclusivamente sobre el tejido dental necrótico, ya que no posee la propiedad $\alpha 1$ - antiproteasa plasmática antitripsina, que impediría la acción proteolítica en tejidos sanos⁵⁰; por este motivo se produce un reblandecimiento del tejido necrótico, dando como resultado el desbridamiento de las fibras de colágeno parcialmente degradadas directamente por la actividad bacteriana, preservando el tejido sano porque no está desmineralizado ni tiene fibras de colágeno expuestas, conservando de esta manera la dentina reparativa^{50,51}.

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

3.1 Alcance y diseño de investigación

Con base a la clasificación de Hernández *et al.*⁵², el alcance de esta investigación fue explicativo, ya que determinó las causas de relación entre la variable independiente con la variable dependiente. Por su parte, el diseño fue experimental, cumpliendo los requisitos de manipulación de la variable independiente, medición del efecto de la variable independiente sobre la dependiente, la existencia de grupos experimentales y control y, la asignación aleatoria de los grupos, llevado a cabo en un ambiente de laboratorio controlado.

3.2 Población y muestra

3.2.1 Población

La población estuvo conformada por 19 niños escolares entre 6 y 10 años de edad de la escuela “5 de Julio de 1811”, ubicada en la Parroquia Domingo Peña, y en la escuela “Jacinto Lara”, de la Parroquia Juan Rodríguez Suárez, del municipio Libertador del estado Mérida, seleccionados bajo los siguientes criterios de inclusión:

1. Lesiones de caries activas según el sistema internacional de clasificación y manejo de la caries (ICCMSTM)⁵³ en dientes temporarios y dientes permanentes.
2. Ausencia de sintomatología clínica asociada a la lesión de caries.
3. No estar recibiendo terapia antimicrobiana en los 30 días previos a la toma de la muestra.
4. Consentimiento informado por parte de los padres y/o representantes (Anexo 1).

3.2.2 Muestra

Estuvo conformada por 57 especímenes biológicos de tipo saliva no inducida (19 muestras), placa dental de cavidad cariosa (19 muestras) y placa supragingival (19 muestras), para lograr el aislamiento e identificación de los microorganismos *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus sanguinis* y *Lactobacillus acidophilus*.

3.3 Sistemas de variables

Variable independiente: Brix 3000® dilución 1:2, control positivo Clorhexidina al 2% y control negativo solución salina fisiológica estéril.

Variable dependiente: Efectividad antimicrobiana sobre las cepas aisladas de: *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus sanguinis* y *Lactobacillus acidophilus*.

Variable	Dimensión	Indicador	Tipo de variable	Valor final
Sustancia inhibidora	Tipo de sustancia inhibidora	Nombre de la sustancia inhibidora	Cualitativa Nominal	Brix 3000® Clorhexidina Solución Salina Fisiológica Estéril
Efectividad antimicrobiana sobre las cepas aisladas de: <i>Streptococcus sobrinus</i> , <i>Streptococcus sanguinis</i> y <i>Lactobacillus acidophilus</i>	Inhibición bacteriana	Presencia o ausencia de halo de inhibición	Cualitativa Nominal- dicotómica	Presencia-ausencia del halo de inhibición
		Diámetro del halo de inhibición	Cualitativa Nominal- dicotómica	Milímetros

Las variables como temperatura, medios de cultivo, técnica de preparación y conservación de los discos con las diferentes soluciones ensayadas fueron controladas; los equipos para el mantenimiento y cultivo de las bacterias fueron sometidos a estrictos controles de esterilización y de calidad, así como un respaldo eléctrico (inversor) que nos permitió mantener las condiciones de temperatura durante los periodos de incubación en ausencia de corriente eléctrica en la zona.

3.4 Técnicas e instrumentos de recolección de datos

A través de la observación directa con la utilización de un microscopio se pudo corroborar la morfología, coloración y organización de los microorganismos aislados *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus sanguinis* y *Lactobacillus acidophilus*

Los datos obtenidos fueron recolectados en una hoja de registro, el cual constaba de tres secciones:

Sección 1: datos del paciente, número y tipo de muestra (Anexo 2).

Sección 2: crecimiento bacteriano.

Sección 3: halos de inhibición en milímetros (mm) obtenidos a través de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana, según el método de Kirby Bauer para observar la ausencia o presencia del halo (Anexo 3), según metodología descrita por Toro¹⁸.

Para la interpretación de los datos se tomó en cuenta el diámetro del halo de inhibición de los discos preparados con los productos: Brix 3000® dilución 1:2, Clorhexidina al 2% y solución salina fisiológica estéril.

3.5 Procedimientos, materiales, equipos e instrumentos

La investigación se desarrolló en cuatro fases, las cuales se describen a continuación: una primera fase que consistió en la realización de una prueba piloto la cual una vez validada y estandarizada la técnica permitió realizar el muestreo propiamente dicho de esta investigación.

Fase 1: Realización de prueba piloto

Para realizar la validación y estandarización de la técnica de toma de muestra, procesamiento e identificación de los microorganismos de interés, así como, preparación de medios de cultivos y discos para la prueba de susceptibilidad, se realizó un estudio piloto constituido por 10 niños en edad escolar, entre los 7 y 9 años, de los cuales 5 niños pertenecían a la unidad educativa Escuela Básica “Cecilio Acosta” de la parroquia Juan Rodríguez Suárez del municipio Libertador y 5 niños de la Unidad Educativa Escuela

“Tomas Zerpa”, ubicada en el municipio Rangel de estado Mérida, que cumplieran con los criterios de inclusión antes mencionados. Las muestras fueron llevadas al Laboratorio Centro Diagnóstico La Paz E.T.R., C.A, ubicado en el municipio Libertador del estado Mérida, para su procesamiento en el área de microbiología con la finalidad de evaluar la operatividad de las técnicas de recolección y análisis de las muestras, así como, identificar posibles ajustes necesarios para optimizar la fase experimental propiamente dicha. Los niños que formaron parte de la prueba piloto no fueron considerados para los resultados del estudio.

Fase 2: Selección de los participantes del estudio: revisión dental, entrega de consentimientos informados e indicaciones previas

La selección de los participantes se realizó con una evaluación clínica odontológica para identificar aquellos que presentaran mayor número de caries en dentición temporal y permanente. Tras la captación de los participantes, se procedió a la entrega formal del consentimiento informado a los padres y/o representantes, detallando los objetivos y alcances de la investigación; en simultáneo, se suministraron de forma verbal y escrita las directrices de preparación e higiene necesarias, las cuales fueron no cepillarse los dientes, no realizarse ningún enjuague bucal previo a la toma de muestra y, estar totalmente en ayunas.

Fase 3: Fase microbiológica

1. Toma de muestras

El procedimiento llevado fue el siguiente:

1.1 Toma de muestra de saliva no inducida: consistió en recolectar la mayor cantidad de saliva que los participantes de la investigación podían producir durante un minuto, en un envase boca ancha estéril, previamente rotulados con nombre y el número asignado para cada una de las muestras (Ver *Figura 2a*).



Figura 2a. Toma de muestra de saliva no inducida.

1.2 Toma de muestra de placa en cavidad cariosa: con un hisopo de algodón estéril fue tomada una muestra directamente de la cavidad que presentaba la lesión de caries (Ver Figura 2b).



Figura 2b. Toma de muestra de placa en cavidad cariosa.

1.3 Toma de muestra de placa supragingival: con un palillo de madera estéril (mondadientes) fue tomada una muestra representativa en la cara vestibular del diente que presentara mayor cantidad de placa dental (Ver Figura 2c).

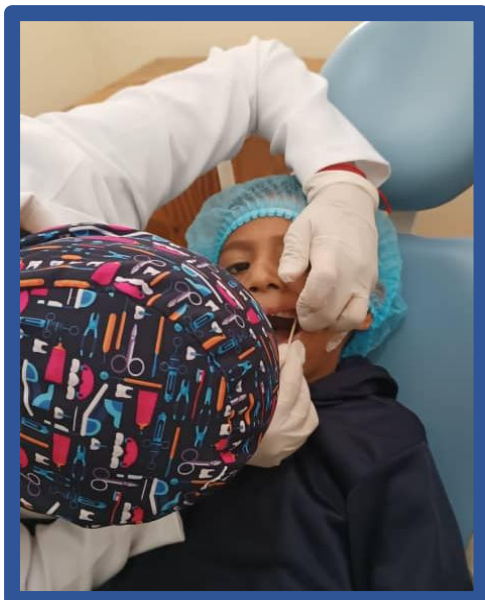


Figura 2c. Toma de muestra de placa supragingival.

2. Siembra y transporte de las muestras

Después de obtener la muestra (saliva no inducida, cavidad cariosa y placa supragingival) de cada escolar, fueron sembradas inmediatamente en los diferentes medios de cultivo preparados en el Laboratorio Centro Diagnóstico La Paz E.T.R., C.A y en el área de preparación de medios de cultivo, de la Facultad de Bioanálisis y Farmacia de la Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela, respectivamente: Mitis Salivarius Agar (Difco Laboratories, Detroit, USA) con bacitracina y telurito potásico al 1% para garantizar el crecimiento, aislamiento y recuperación de *Streptococcus sobrinus* y *Streptococcus sanguinis* y Agar De Man, Rogosa y Sharpe (MRS) (Liofilchem S.R.L., Roseto degli Abruzzi, Italia) para *Lactobacillus acidophilus* (Ver Figura 3).

Para la siembra se empleó la técnica de agotamiento en 4 cuadrantes^{54,55} distribuyendo la muestra uniformemente sobre la superficie del medio de cultivo para lograr el crecimiento de los microorganismos en monocapa y colonias aisladas.



Figura 3. Siembra de muestras.

Una vez finalizada la siembra de las muestras, estas fueron colocadas en una jarra de microaerofilia y transportadas inmediatamente al laboratorio para ser incubadas en estufa a 37°C por 48 horas (Ver *Figura 4*).



Figura 4. Jarra de microaerofilia.

3. Aislamiento e identificación de *Streptococcus sobrinus* y *Streptococcus sanguinis*

Transcurridas las 48 horas de incubación se realizó la revisión de cada placa de Agar Mitis Salivarius con bacitracina y telurito potásico al 1%. Al crecimiento bacteriano mayor a 25.000 Unidades Formadoras de Colonias (UFC), con características morfológicas sospechosas del género *Streptococcus* se le realizó la tinción de Gram y

seguidamente su observación se realizó con la utilización de un microscopio óptico (BBM-17, Biobase, China) con objetivo de 100x para confirmar la presencia de cocos Gram positivos en pares o cadenas (Ver *Figura 5a*).

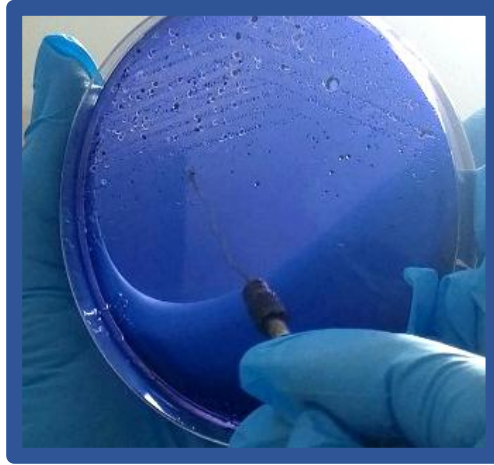


Figura 5a. Selección de colonias sospechosas al género *Streptococcus*.

Realizada la tinción de Gram, se seleccionaron las colonias cuyas características microscópicas correspondían a cocos Gram positivos, típicas del género bacteriano *Streptococcus* (Ver *Figura 5b*).

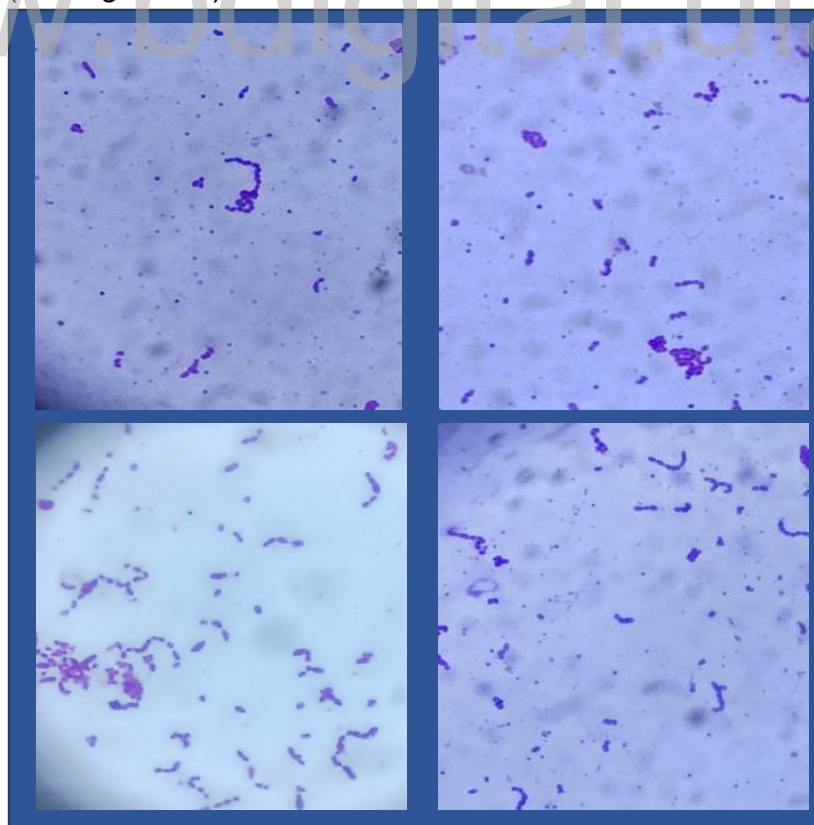


Figura 5b. Coloración de Gram. 100X Microscopio óptico.

Posteriormente, cada colonia sospechosa al género *Streptococcus* fue repicada por separado en Agar Mitis Salivarius con bacitracina y telurito potásico al 1%, con la finalidad de obtener colonias puras y aisladas, las cuales fueron incubadas a 37°C en microaerofilia por 24 horas.

3.1 Pruebas bioquímicas para selección e identificación de especies de *Streptococcus* (*Streptococcus* spp)

Trascurrido el tiempo de incubación las colonias de interés fueron sometidas a pruebas bioquímicas como catalasa y oxidasa (Ver Figura 6).



Figura 6. Prueba bioquímica de catalasa.

Aquellas colonias que resultaron catalasa negativa y oxidasa positiva fueron seleccionadas para ser sometidas a las pruebas bioquímicas Voges Proskauer (VP)⁵⁶ e hidrólisis de la esculina como pruebas claves para la identificación del *Streptococcus sobrinus* y *Streptococcus sanguinis* (Ver Figura 7a y 7b).



Figura 7a. Pruebas bioquímicas de Voges Proskauer (VP) e hidrólisis de esculina.



Figura 7b. Prueba bioquímica de hidrólisis de esculina positivo.

Para mantener la viabilidad de las diferentes cepas a estudiar, se inocularon las colonias de interés en caldo infusión de cerebro corazón (BHI) (Oxoid - Thermo Fisher Scientific, Hampshire, UK) y posteriormente, se incubaron en microaerofilia durante 24 horas. Transcurrido el tiempo de incubación los caldos fueron sembrados en Agar Mitis Salivarius bacitracina y telurito al 1% e incubados a 37° C por 24 horas, con la finalidad de tener cultivos jóvenes.

Para la identificación de las especies de *Streptococcus*, se utilizó un sistema de identificación microbiológica de 24 pocillos con 12 pruebas bioquímicas miniaturizada conocido como STEPTOSYSTEM 12® (Liofilchem S.R.L., Roseto degli Abruzzi, Italia).

Seguidamente, con los cultivos jóvenes de cada cepa se procedió a preparar la suspensión de microorganismo para posteriormente inocular cada microtubo del sistema de identificación e incubar en cámara húmeda a 37°C, procedimiento realizado siguiendo las recomendaciones del fabricante. A las 24 horas de incubación se añadió los reactivos de revelado para las diferentes pruebas. Finalmente, se procedió a la lectura de las pruebas bioquímicas miniaturizadas evidenciando el cambio de color después del tiempo sugerido por el fabricante (Ver Figura 8).



Figura 8. Sistema de identificación con pruebas bioquímicas miniaturizadas STEPTOSYSTEM 12®.

4. Aislamiento e identificación de *Lactobacillus acidophilus*

Una vez realizada la tinción de Gram, las colonias correspondientes a bacilos Gram positivos fueron sometidas a pruebas bioquímicas de fermentación de carbohidratos específicas para la identificación de *Lactobacillus acidophilus*^{54,55}. Los diferentes azúcares (maltosa, lactosa, sacarosa, glucosa y fructosa) fueron inoculados con las cepas de interés con la finalidad de conocer su fermentación después de 24 horas de incubación a 37 °C (Ver Figura 9a).

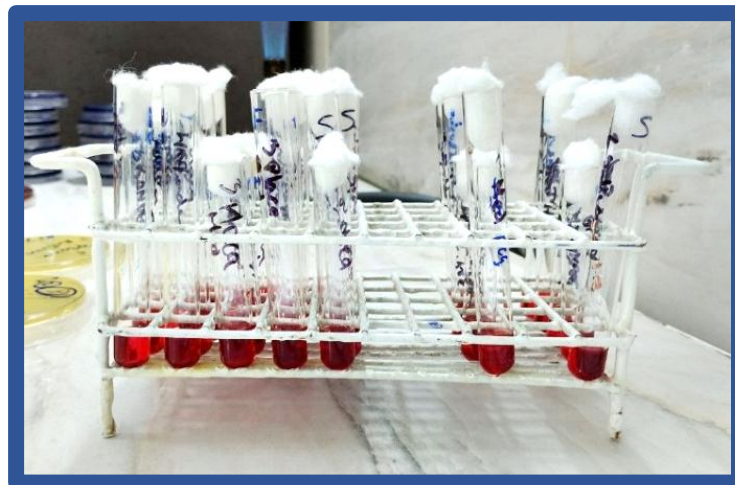


Figura 9a. Pruebas bioquímicas fermentación de carbohidratos (maltosa, lactosa, glucosa, sacarosa, fructosa).

Aquellas cepas que fermentaron los 5 carbohidratos (maltosa, lactosa, glucosa, sacarosa, fructosa)^{54,55}, fueron identificadas como *Lactobacillus acidophilus* (Ver Figura 9b).

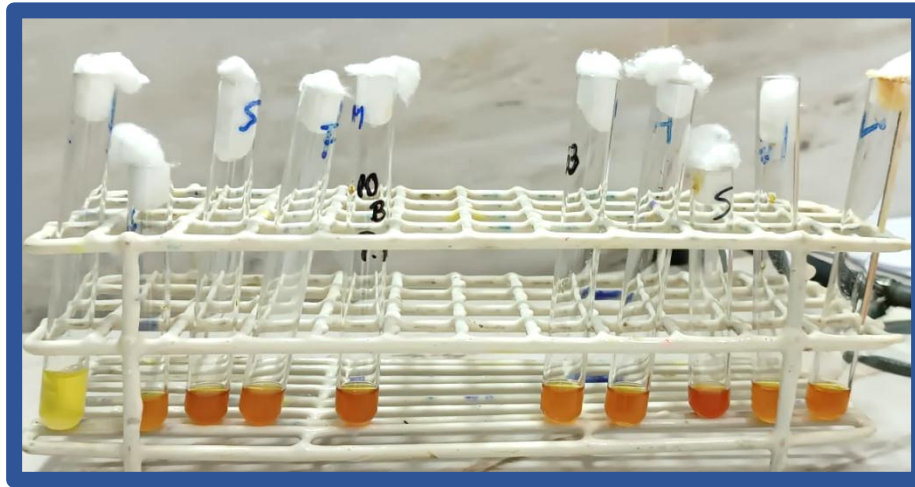


Figura 9b. Pruebas bioquímicas fermentación de carbohidratos (maltosa, lactosa, glucosa, sacarosa, fructosa) positivo.

5. Prueba de susceptibilidad antimicrobiana al Brix 3000®

Inicialmente se realizó la esterilización de los discos de papel filtro de 6 mm de diámetro a utilizar sometiéndolos a calor húmedo con 15 libras de presión por un periodo de tiempo de 15 minutos a 121°C en autoclave.

Posteriormente, se procedió a la preparación de los discos ya inactivados con 30µL de las soluciones: solución salina fisiológica estéril como control negativo para esta investigación en discos identificados con las letras “SSF”; Clorhexidina al 2% como control positivo en discos identificados con la letra “CLHX” y, solución de Brix 3000®, diluido 1:2 en agua destilada para facilitar la preparación de los discos; estos discos fueron identificados con las letras “B” (Ver Figura 10).

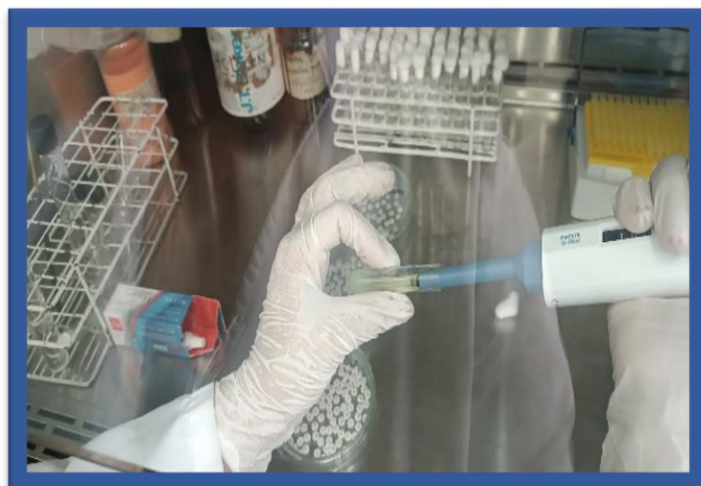


Figura 10. Preparación de discos.

Las pruebas de susceptibilidad para las dos especies de *Streptococcus* se realizaron en medio agar Mueller-Hinton (MHA) (CM0337, Oxoid, Basingstoke, UK) con 5% de sangre¹⁸ envasados en placas de Petri. Se utilizó el método difusión en disco según la técnica de Kirby Bauer⁵⁶. En el MHA con sangre se inoculó el microorganismo a ensayar y sobre este agar se colocaron los discos de papel filtros previamente preparados colocando un total de 3 discos (1 disco con Brix 3000® dilución 1:2, 1 disco con clorhexidina al 2% y 1 disco con solución salina fisiológica). Utilizando una pinza estéril se presionaron ligeramente los discos sobre el agar para asegurar un contacto uniforme, dejando entre disco y disco una distancia entre 20 y 25 mm para evitar que las zonas de inhibición quedaran superpuestas una sobre otra. Cada placa fue identificada con el número de muestra correspondiente a la investigación (Ver Figuras 11, 12a, 12b, 12c). Las placas se incubaron en microaerofilia a una temperatura a 37 °C por de 24 horas.

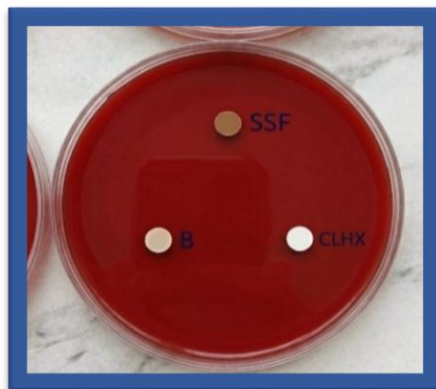


Figura 11. Ubicación de los discos para prueba de susceptibilidad antimicrobiana.

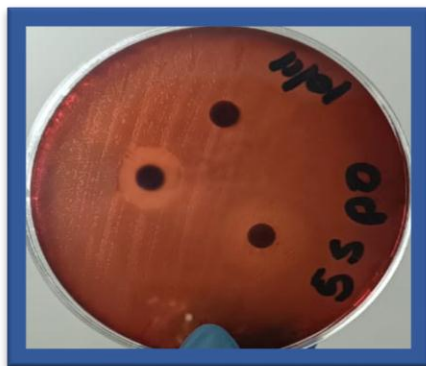


Figura 12a. Prueba de susceptibilidad antimicrobiana para *Streptococcus sobrinus* en medio de cultivo agar Mueller Hinton (MHA) + 5% de sangre.



Figura 12b. Prueba de susceptibilidad antimicrobiana para *Streptococcus sanguinis* en medio de cultivo agar Mueller Hinton (MHA) + sangre.

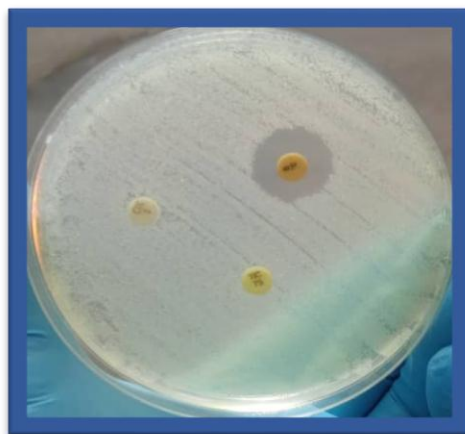


Figura 12c. Prueba de susceptibilidad antimicrobiana para *Lactobacillus acidophilus* en medio de cultivo agar MRS.

Las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana para las cepas de *Lactobacillus acidophilus* se realizaron en el medio MRS⁵⁷ selectivo para este microorganismo. Se

inoculó con un hisopo estéril una suspensión de turbidez de 0.5 Mcfarland de *Lactobacillus acidophilus* en la placa, previamente cada placa fue identificada con el número de la muestra correspondiente.

Cada placa de MRS inoculada con el microorganismo a ensayar se empleó el método de difusión en disco según la técnica de Kirby Bauer⁵⁸; sobre este agar se colocaron los 3 discos de papel filtro preparados previamente con las soluciones a ensayar (1 disco con Brix 3000® dilución 1:2, 1 disco con clorhexidina al 2% y 1 disco con solución salina fisiológica estéril), garantizando un contacto uniforme con el agar, dejando la separación entre discos descrita en la prueba de susceptibilidad para especies de *Streptococcus*. Las placas fueron incubadas a 37°C durante 24 horas y en una atmósfera de microaerofilia.

6. Control del Experimento

Para el control del experimento se utilizó la cepa ATCC (Colección Americana de Cultivos Tipo) de *Staphylococcus aureus* 25923, ya que es un representante de cocos Gram positivos en microbiología para el control de calidad, validación de métodos y pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. La prueba de susceptibilidad antimicrobiana por el método de difusión en disco según la técnica de Kirby Bauer se realizó en agar Mueller Hinton y se ensayaron los diferentes discos preparados (Clorhexidina al 2%, Brix 3000® dilución 1:2 y solución salina fisiológica estéril) y, disco comercial de penicilina 10 UI para verificar su susceptibilidad a través del halo de inhibición.

Fase 4. Informe de resultados

Posterior a la incubación por 24 horas de las pruebas de susceptibilidad, se procedió a verificar la presencia del halo de inhibición. En aquellas placas donde se observó la presencia del halo de inhibición se procedió a medir su diámetro, cuyos datos se recolectaron en las fichas de registros, destinadas para tal fin (Ver Anexo 3).

3.6. Principios Éticos

En cualquier investigación del ámbito médico, es deber del profesional proteger la integridad, la vida, la dignidad, la salud, así como garantizar el derecho a la autodeterminación, y la confidencialidad de la información de las personas que participan en la investigación, aspectos claves dentro de la declaración de Helsinki.

Por lo expuesto anteriormente, los niños que formaron parte de este estudio fueron aquellos autorizados por sus padres y/o representantes legales, posterior a la recepción de un consentimiento informado. Se les informó sobre los objetivos del estudio, el proceso, la estructura de este, y que los datos, así como en el análisis de los resultados, serían empleados únicamente para la realización de esta investigación, con estricta confidencialidad y anonimato, basado en la “Propuesta de Principios Éticos para investigaciones médicas en seres humanos, incluida la investigación del material humano y de información identificable”, de Helsinki, bajo el consentimiento informado⁵⁹.

3.7 Análisis de resultados

Se utilizó el programa estadístico SPSS versión 24 (IBM Corp., Chicago, IL, EE. UU). En primer lugar, se realizó un análisis descriptivo de la variable cuantitativa diámetro del halo de inhibición de cada microorganismo aislado para cada disco ensayado con las diferentes soluciones: Brix 3000® diluido 1:2, Clorhexidina al 2% y solución salina fisiológica estéril. Como medida de tendencia central se utilizó la media aritmética y como medida de dispersión, la desviación estándar.

En segundo lugar, se realizó un análisis Inferencial, a través del análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis, para evaluar el efecto de la sustancia inhibitoria en el crecimiento de los microorganismos aislados y determinar las diferencias significativas entre los grupos ($p < 0,05$).

Finalmente, según el caso, para las comparaciones por pares (post hoc), se empleó la prueba de Dunn con corrección de Bonferroni.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

5.1 Resultados del Aislamiento e Identificación Bacteriana

En la fase de análisis cuantitativo, la totalidad de las muestras recolectadas (n = 57), provenientes de saliva, placa de cavidad cariosa y placa supragingival, exhibieron un desarrollo bacteriano superior a 25.000 UFC tras un periodo de incubación de 48 horas. Posterior al aislamiento primario, la identificación taxonómica se realizó mediante el sistema de pruebas bioquímicas miniaturizadas Streptosystem 12®, permitiendo confirmar la presencia de dos (2) cepas de *Streptococcus sanguinis* y once (11) cepas de *Streptococcus sobrinus*. Complementariamente, mediante ensayos de fermentación de carbohidratos, se identificaron dos (2) cepas de *Lactobacillus acidophilus*.

5.2 Evaluación de la Actividad Antimicrobiana

Tras la ejecución de las pruebas de susceptibilidad y la observación del comportamiento fenotípico de los microorganismos, se tomaron las dimensiones del halo de inhibición en cada microorganismo según la sustancia inhibidora evaluada (Ver **Figura 13, 14 y 15**).

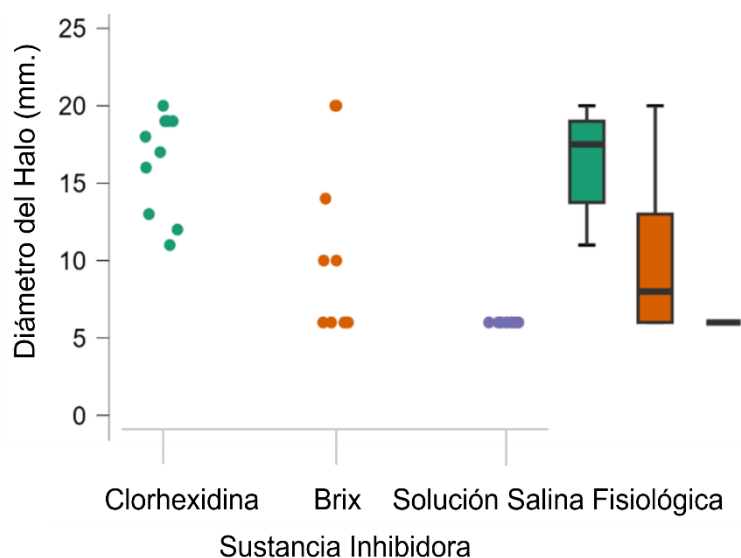


Figura 13. Gráfico sobre el diámetro del halo de inhibición en microorganismos *Streptococcus sobrinus*, según sustancia inhibidora.

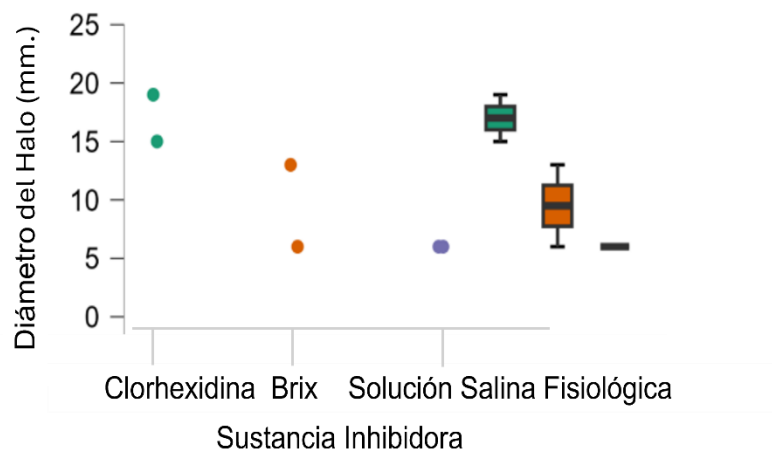


Figura 14. Gráfico sobre el diámetro del halo de inhibición en microorganismos *Streptococcus sanguinis*, según sustancia inhibidora.

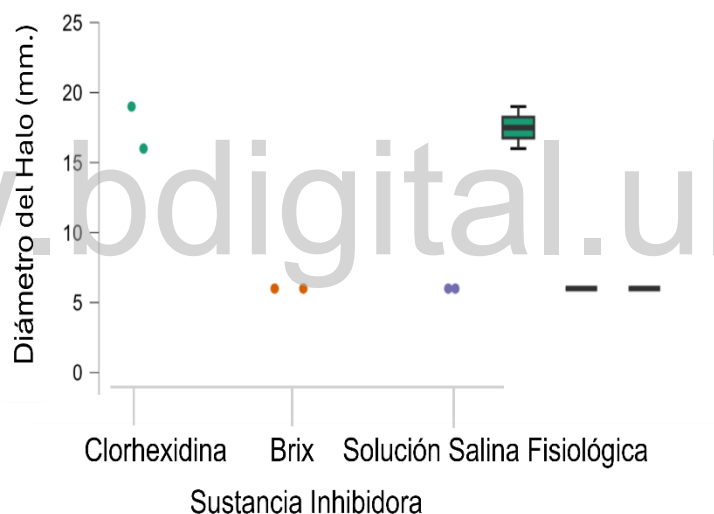


Figura 15. Gráfico sobre el diámetro del halo de inhibición en microorganismos *Lactobacillus acidophilus*, según sustancia inhibidora.

De los *Streptococcus* del grupo *mutans*, solo se logró aislar e identificar la especie *Streptococcus sobrinus*. Este microorganismo para la solución ensayada clorhexidina al 2% obtuvo un promedio de halo de inhibición de 16.40 mm; para el Brix 3000® dilución 1:2, la medida del promedio del halo de inhibición fue de 10.40 mm, mientras que para la solución salina fisiológica estéril fue de 6 mm correspondiente al diámetro del disco (Ver tabla 1).

Tabla 1. Estadísticas descriptivas del halo de inhibición de las soluciones ensayadas en las cepas aisladas de *Streptococcus sobrinus*

Sustancias inhibidoras	n	Media (mm)	Desv. Estándar	Desv. Error	Coefficiente de variación
Clorhexidina	10	16.40	3.27	1,03	0,20
Brix 3000®	10	10.40	5.72	1,80	0,55
SSF	10	6.00	0.00	0.00	0,00

SSF: Solución Salina Fisiológica
Desv.: Desviación

Al no cumplirse el supuesto de igualdad de varianzas, se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis para comparar los promedios del tamaño del halo de inhibición. Los resultados revelaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ($H = 17.31$, $p < 0.05$), con un tamaño del efecto (Rango χ^2) de 0.597.

Para evaluar las diferencias específicas, se utilizaron la prueba de Post Hoc de Dunn y Prueba de Bonferroni en cada caso:

- **Brix 3000® vs. Clorhexidina:** Existe una diferencia entre los grupos, observando que el Brix 3000® obtuvo rangos menores de halos de inhibición frente a la clorhexidina. Sin embargo, debido a la alta dispersión de los datos en el grupo Brix 3000®, la diferencia no alcanzó significancia estadística tras el ajuste de Bonferroni ($p = .083$).
- **Brix 3000® vs. SSF:** Se observó una diferencia en el límite de la significancia ($p = .050$), aunque al ajustar por Bonferroni para comparaciones múltiples, esta se diluye ($p = .151$).

Los datos indican que el Brix 3000® dilución 1:2 muestra una actividad inhibitoria inferior al control positivo y superior al control negativo en términos absolutos y que, la clorhexidina es el agente más efectivo y predecible contra *Streptococcus sobrinus*. Sin embargo, la alta variabilidad experimental del Brix 3000® limita la capacidad de

establecer una superioridad estadística definitiva frente a los otros grupos en las condiciones evaluadas.

Por otra parte, del *Streptococcus* del grupo *mitis*, solo se logró aislar e identificar la especie *Streptococcus sanguinis* con solo dos microorganismos por grupo. Para la solución ensayada Brix 3000® dilución 1:2, la medida del promedio del halo de inhibición fue de 9.5 mm, mientras que la solución ensayada clorhexidina al 2% obtuvo un promedio de halo de inhibición de 17 mm y, para la solución salina fisiológica estéril fue de 6 mm (Ver tabla 2).

Al aplicar el contraste no paramétrico, el estadístico es de 4.194 con un $p = .123$, no alcanzando significancia estadística ($p > 0.05$).

Tabla 2. Estadísticas descriptivas del halo de inhibición de las soluciones ensayadas contra *Streptococcus sanguinis*

Sustancias inhibidoras	n	Media (mm)	Desv. Estándar	Desv. Error	Coefficiente de variación
Clorhexidina	2	17,00	2.83	2,00	0,16
Brix	2	9,50	4.95	3,50	0,52
SSF	2	6,00	0.00	0,00	0,00

SSF: Solución Salina Fisiológica
Desv.: Desviación

El análisis de la actividad antimicrobiana sobre *Streptococcus sanguinis* no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos según la prueba de Kruskal-Wallis ($p = .123$). Aunque la clorhexidina obtuvo el mayor halo de inhibición promedio (17.00 mm), la alta variabilidad del Brix 3000® y el reducido tamaño de la muestra limitaron la potencia del estudio.

Al ensayar *Lactobacillus acidophilus* al igual que con *Streptococcus sanguinis*, este estudio cuenta con un tamaño de muestra limitado ($n=2$ por grupo). Para la solución

ensayada Brix 3000® dilución 1:2, la medida del promedio del halo de inhibición fue de 6 mm, para la clorhexidina al 2%, 17.5 mm y, para la solución salina fisiológica estéril 6 mm. (Ver tabla 3).

Se aplicó contraste no paramétrico de Kruskal-Wallis para comparar los tamaños promedios sin lograr significancia estadística ($p = .091$).

Tabla 3. Estadísticas descriptivas del halo de inhibición de las soluciones ensayadas contra *Lactobacillus acidophilus*

Sustancias Inhibidoras	n	Media (mm)	Desv. Estándar	Desv. Error	Coefficiente de variación
Clorhexidina	2	17,50	2,12	1,50	0,12
Brix 3000®	2	6,00	0,00	0,00	0,00
SSF	2	6,00	0,00	0,00	0,00

SSF: Solución Salina Fisiológica
Desv.: Desviación

La clorhexidina obtuvo el mayor promedio de inhibición (17.50 mm); sin embargo, la baja potencia estadística derivada del reducido tamaño de la muestra, al igual que en el caso de *Streptococcus sanguinis* impide establecer una superioridad significativa en este estudio.

5.3 Control del Experimento

Los diámetros de los halos de inhibición obtenidos de la cepa ATCC de *Staphylococcus aureus* 25923 fueron de 32 mm para el disco de Clorhexidina, 6 mm para el disco de solución salina fisiológica estéril, 18 mm para disco preparado de Brix 3000® dilución 1:2 y 46 mm para el disco comercial de Penicilina 10 UI (Ver Figura 16).

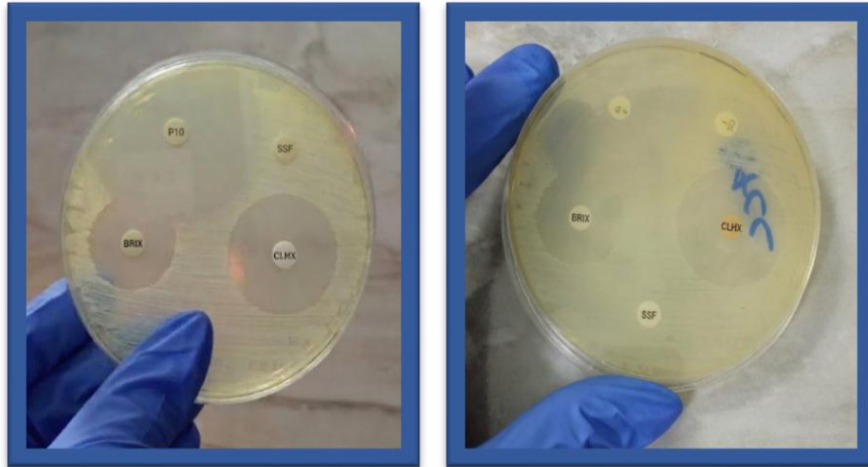


Figura 16. Control del experimento con cepas ATCC de *Staphylococcus aureus* 25923.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN

El presente estudio tuvo como propósito determinar la efectividad antimicrobiana del Brix 3000®, en *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus sanguinis* y *Lactobacillus acidophilus*, aislados en especímenes biológicos de tipo saliva no inducida, placa dental de cavidad cariosa y placa supragingival de niños en edad escolar entre 6 y 10 años, en escuelas del municipio Libertador del estado Mérida, Venezuela. Este estudio permitió conocer *in vitro* la susceptibilidad antimicrobiana de este compuesto que en la actualidad además de ser utilizado como un removedor químico de la caries dental, ha sido considerado como un agente con propiedades antibacterianas.

Es importante resaltar que el microbioma de la cavidad bucal es muy variado y muchos de estos microorganismos poseen efecto cariogénico, siendo el principal representante *Streptococcus* grupo *mutans*, específicamente *Streptococcus mutans* que, por sus características propias resulta difícil su procesamiento; aun cuando la literatura científica muestra su aislamiento e identificación, son pocos los que señalan la dificultad técnica para su recuperación⁶⁰. Esta complejidad operativa suele ser omitida, la cual tiende a simplificar el proceso de identificación y recuperación de este patógeno. De allí que el aislamiento del *Streptococcus mutans*, así como, de las demás especies que conforman este grupo podría considerarse como un reto clásico en el laboratorio de microbiología.

A menudo, la literatura hace que el aislamiento de estos microorganismos parezca un procedimiento de rutina, cuando en realidad su naturaleza exigente y la competencia con otros microorganismos del microbioma bucal complican bastante la tarea. Esta reflexión surge debido a que en las 57 muestras obtenidas en el presente estudio no se logró aislar dicho patógeno. De igual modo, en este sentido, en la presente investigación se logró aislar en poca cantidad los microorganismos de interés, lo que impidió junto con la alta variabilidad del Brix 3000® poder determinar la efectividad antimicrobiana de esta sustancia en las cepas aisladas, por lo que únicamente se podría concluir que efectivamente produce inhibición bacteriana, pero sin poder llegar a una verificación en

términos absolutos, lo que necesariamente obliga a recomendar aumentar el tamaño de la muestra para futuras investigaciones.

La interpretación de la susceptibilidad antimicrobiana del Brix3000® presenta una limitación metodológica significativa: la ausencia de puntos de corte establecidos por organismos internacionales de referencias como EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) y CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Debido a que este compuesto no está catalogado bajo los criterios de estos estándares, los diámetros de los halos de inhibición obtenidos mediante la técnica de difusión en discos no pueden traducirse en categorías clínicas de sensible, intermedio o resistente. Por tanto, la inexistencia de rangos validados impide la categorización fenotípica del microorganismo sobre este agente. En consecuencia, no es posible determinar su eficacia clínica, bactericida o antibacteriana bajo la normativa vigente, por lo que deberían realizarse estudios específicos para establecer puntos de corte.

Otra limitante significativa fue la falta de acceso inmediato a herramientas de biología molecular. La presente investigación realizó la identificación mediante métodos convencionales, los cuales, aunque válidos presentan brechas debido a la diversidad genética de los microorganismos de la cavidad bucal. Por lo que se hace imperativo que en futuras investigaciones se incorpore el análisis molecular. A pesar de su alta precisión, los elevados costos operativos de las técnicas moleculares limitan su implementación como herramientas de diagnóstico.

Este estudio, aunque fue experimental *in vitro*, confirmó que cada muestra analizada, presentó un crecimiento bacteriano distinto, y que no en todos los casos la sustancia inhibidora utilizada actuó de manera similar. Estas variaciones de respuestas en las pruebas de susceptibilidad resaltan de manera directa la importancia de la microbiología para el avance de la ciencia, al demostrar, por un lado, que la caries dental no es causada por un solo microorganismo y por otro, que en dos pacientes diferentes la respuesta antimicrobiana sobre el mismo tipo de microorganismo puede ser distinta, pudiendo ser eficaz o no, en cualquier caso.

Ahora bien, los resultados obtenidos en esta investigación indican que el Brix 3000® con una dilución 1:2, si bien es capaz de inhibir el crecimiento de *Streptococcus*

del grupo *mutans*, específicamente *Streptococcus sobrinus*, así como también, de *Streptococcus* del grupo *mitis*, específicamente *Streptococcus sanguinis*, no tiene la capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano de *Lactobacillus acidophilus*; siendo *Streptococcus sobrinus* y *Lactobacillus acidophilus* dos microorganismos estrechamente relacionados con la formación y progresión de lesiones de caries dental. Sin embargo, la alta variabilidad de los resultados obtenidos no permite determinar su efectividad en términos absolutos frente a las otras sustancias inhibitorias.

Por otra parte, al observar la presencia de halo inhibitorio con *Streptococcus sobrinus* y *Streptococcus sanguinis*, se podría inferir que, al utilizar el Brix 3000® directamente sobre la lesión de caries (*in vivo*) tendría un efecto inhibitorio igual o mayor que el obtenido en este estudio, pues mantendría su concentración original pudiendo potenciar su acción antimicrobiana. Sin embargo, esta afirmación solo podría confirmarse si y solo si, se pudiera en futuras investigaciones utilizar la sustancia en presentación líquida, en su concentración original y, con una muestra representativa de microorganismos. De esta manera, se podría evaluar el comportamiento del Brix 3000® frente a las otras sustancias que reporta la literatura como efectivas para inhibir el crecimiento bacteriano.

En un estudio realizado por Kandil *et al.*¹⁴, quien evaluaron la eficacia clínica de la papaína con el agente removedor Brix 3000® en comparación con la eliminación de caries con fresas convencionales en dientes temporales, encontró que después de la preparación, los recuentos de *Streptococcus* y *Lactobacillus* disminuyeron ligeramente más en el grupo tratado con Brix 3000® que en el grupo tratado con fresas. Concluyen que la disminución del recuento bacteriano pudo observarse tanto para *Streptococcus* como para *Lactobacillus*. Estos hallazgos coinciden con la presente investigación, en que el Brix 3000® inhibió los microorganismos de la cavidad bucal, incluyendo especies de *Streptococcus*, entre ellas, *Streptococcus sobrinus* y *Streptococcus sanguinis* y, está en contraposición con lo reportado sobre *Lactobacillus acidophilus*, ya que en este estudio no presentó ningún tipo de inhibición al ser ensayadas con los discos de Brix 3000® dilución 1:2.

Sandoval⁵, realizó un estudio *in vitro* para determinar la efectividad antibacteriana de dos removedores atraumáticos de caries, Papacárie® y Brix 3000®, utilizando la yodopovidona al 8% y la clorhexidina al 2% como antisépticos contra el *Streptococcus mutans*. Encontró que solo presentó halo de inhibición la clorhexidina al 2%, no observándose halo de inhibición con las demás soluciones incluido el Brix 3000®. Estos hallazgos no respaldan la presente investigación, ya que el Brix 3000® formó halo de inhibición en cepas ensayadas de *Streptococcus sobrinus* quien forma parte del grupo *mutans*. Sin embargo, por las razones antes expuestas no puede concluirse que el Brix tiene efectividad antimicrobiana.

De acuerdo con los estudios de Cardoso *et al.*¹⁵, Inamdar *et al.*¹⁶ y Angel *et al.*¹⁷, quienes investigaron la actividad antimicrobiana del Brix 3000® en la cavidad bucal, los hallazgos coinciden parcialmente con la presente investigación al observar una reducción del recuento bacteriano. Sin embargo, en dichos estudios no se especifica el tipo de bacterias evaluadas, por lo que se podría decir que al no haber identificación bacteriana se hace imposible poder afirmar que realmente el Brix 3000® actúa en todos aquellos microorganismos asociados a la caries dental.

En cuanto a *Streptococcus sobrinus* y *Streptococcus sanguinis*, no se encontraron referencias bibliográficas con los descriptores utilizados en las diferentes bases de datos como SciELO, Redalyc, Google Académico y PubMed; por lo que este trabajo se presenta como la primera referencia que los involucre en pruebas para determinar la efectividad antimicrobiana del Brix 3000®, siendo un aporte a la línea de investigación.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

En las condiciones en que se realizó la presente investigación se concluye:

1. El agente químico removedor de la caries dental, Brix 3000® dilución 1:2, fue capaz de inhibir el crecimiento bacteriano de cepas de *Streptococcus sobrinus* y *Streptococcus sanguinis*, aun cuando en la mayoría de las muestras el halo inhibitorio producido es menor que el presentado por la clorhexidina al 2%.
2. El agente químico removedor de la caries dental, Brix 3000® dilución 1:2, no fué capaz de inhibir el crecimiento bacteriano de cepas de *Lactobacillus acidophilus*.
3. No se puede afirmar que Brix 3000® funcione como un antibacteriano efectivo en todas las especies de *Streptococcus* que conforman el grupo *mutans* y *mitis*.
4. El Brix 3000® presenta un efecto inhibitorio frente a las cepas *Streptococcus sobrinus* y *Streptococcus sanguinis*. Aun cuando fue utilizado una dilución 1:2, el compuesto mantuvo su capacidad para inhibir el crecimiento bacteriano de dichos microorganismos. Aunque el diámetro de los halos fue inferior al de la clorhexidina al 2%, se podría inferir que su uso en la concentración original y condiciones *in vivo* podría potenciar sustancialmente su actividad antimicrobiana. Sin embargo, esta afirmación solo podría confirmarse si y solo si, se pudiera en futuras investigaciones utilizar la sustancia en presentación líquida, en su concentración original y, con una muestra representativa de microorganismos.

5.2 Recomendaciones

1. Continuar con la línea de investigación iniciada, con el apoyo de los miembros de las cátedras Odontopediatría de la Facultad de Odontología y Microbiología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, para evaluar la efectividad del Brix 3000® como agente inhibidor de los microorganismos causales de la caries dental.

2. Lograr obtener el Brix 3000® en presentación líquida en su concentración original, para poder determinar su capacidad antibacteriana.
3. Realizar estudios experimentales, *in vitro*, con mayor número de muestras, para obtener más información del microbioma oral y su comportamiento ante los productos inhibidores de la caries dental.
4. Complementar los estudios experimentales, *in vitro*, con el uso de cepas aisladas comerciales o biofilms multiespecie, como estrategias conveniente y reproducible, y así lograr evaluar la actividad antimicrobiana de manera controlada sin depender del aislamiento de muestras clínicas, facilitando la obtención del microorganismo, su manipulación, minimizando los riesgos de contaminación y requiriendo solo de medios de cultivos simples e incubación adecuada. Sin embargo, habría que considerar costos y posibilidad de adquirirlas en el país para evaluar la factibilidad y viabilidad de la investigación.
5. Complementar los estudios experimentales, *in vitro*, con pruebas más avanzadas que simulen mejor el entorno oral real. El uso de pruebas moleculares permitirá la identificación más precisa y específica de especies cariogénicas del género *Streptococcus mutans* y *Streptococcus mitis* (*Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus sanguinis*) y *Lactobacillus acidophilus*, superando las limitaciones de los métodos convencionales basados en cultivos y pruebas bioquímicas, facilitando estudios más detallados sobre su papel en la patogénesis de la caries dental y la evaluación de intervenciones terapéuticas. Sin embargo, es importante considerar costos en el país para evaluar la factibilidad y viabilidad de la investigación que permitirá avanzar en estudios más precisos de caries dental.
6. Continuar con los estudios de susceptibilidad cuantitativos para conocer las concentraciones en que el Brix® 3000 inhibe a las bacterias asociadas a caries dental.
7. Una vez cumplida satisfactoriamente la fase experimental *in vitro*, que los resultados se complementen con ensayos clínicos aleatorizados (ECA), para evaluar el comportamiento y efectividad de los productos inhibidores de caries dental en la población infantil en condiciones reales de uso.

REFERENCIAS

1. Torresi F, Acosta M. Estudio comparativo entre el uso de brix-3000 y la técnica convencional rotatoria contra la caries. Horiz Sanit. [Internet]. 2019 [Consultado 6 noviembre 2023]; 18(3):365-71. Disponible en: <https://www.scielo.org.mx/pdf/hs/v18n3/2007-7459-hs-18-03-365.pdf>
2. Alvarado V, Espinoza L, Robles D, Montes P, Vivas S, Albrizzio J, et al. Efectividad antimicrobiana in vitro del Papacarie® en muestras de tejido cariado en escolares de educación primaria. Odontol Sanmarquina. [Internet]. 2010 [Consultado 06 noviembre 2023];13(1):20-2. Disponible en: <https://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/odont/article/view/2832/4390>
3. Segura E, Méndez L, Márquez E, Vargas A, Gregorio K, Martínez J, et al. Effect of *Carya illinoensis*, *Quercus rubra* and *Smilax glycyphylla* extracts, pectin, and papain on the dental biofilm microorganisms. J Pharm Pharmacogn Res. [Internet]. 2015 [Consultado 07 noviembre 2023]; 3(1):118-29. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/4960/496050276002.pdf>
4. Ortega J. Evaluación antimicrobiana del Papacaries y la Clorhexidina al 2% en microorganismos de la caries dental Cerro de Pasco - 2019. [Trabajo de grado en Cirujano Dentista]. Cerro de Pasco: Universidad Nacional Daniel Alcides Carrión. 2020. Disponible en: <http://repositorio.undac.edu.pe/handle/undac/1790>
5. Sandoval E. Efectividad antibacteriana de removedores atraumáticos contra el *Streptococcus mutans*, estudio *in-vitro*. [Tesis para Especialidad en Odontopediatría]. Querétaro: Universidad Autónoma de Querétaro. 2023. Disponible en: <https://ring.uaq.mx/handle/123456789/8955>
6. Guerrero N, Morales L, Montiel R, López M. Técnicas mínimamente invasivas en Odontopediatría para el tratamiento de lesiones cariosas en tiempos de COVID-19. Reporte de caso. Odontología. [Internet]. 2022 [Consultado 03 noviembre 2023];24(1):3596. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=8307851>

7. Díaz N, Lozano C, Kreth J, Giacaman R. Extended biofilm formation time by *Streptococcus sanguinis* modifies its non-cariogenic behavior, in vitro. Braz. Oral Res. [Internet]. 2022 [Consultado 05 Diciembre 2023];36(107): 1-11. Doi: <https://doi.org/10.1590/1807-3107bor-2022.vol36.0107>
8. Alegría F, Nieto D, Lara E, Sánchez L. Aceptación de la remoción químico-mecánica de caries en pacientes de 4 a 6 años de edad atendidos en 2018. Archivos de Investigación Materno Infantil.[Internet]. 2019 [Consultado 10 Diciembre 2023]; 10(1):22-29. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/imi/imi-2019/imi191e.pdf>
9. Hermida L, Cardoso C, Jansiski L, Marcílio E, Bussadori S. Comparación entre la utilización de elementos rotatorios de baja velocidad y tratamiento químico mecánico de caries dentinal en dentición decidua. Acta Odontológica Venezolana. [Internet] 2009 [Consultado 09 Diciembre de 2023]; 47(4):22-30.Disponible en: http://ve.scielo.org/scielo.php?pid=S0001-63652009000400003&script=sci_arttext
10. López J, Amaral S, Bussadori S. Proteólisis enzimática del colágeno dentinario. Odontoestomatología. [Internet].2010 [Consultado 05 Enero 2024];12(14):35-44. Disponible en: <http://www.scielo.edu.uy/pdf/ode/v12n14/v12n14a04.pdf>
11. Da Silva L, Hartley J, Marcílio E, Guedes A, Bussadori S. Utilización del gel de la papaya para la remoción de la caries - reporte de un caso con seguimiento clínico de un año. Acta Odontológica Venezolana. [Internet]. 2005 [Consultado 05 Enero 2024];43(2):155-8. Disponible en: http://ve.scielo.org/scielo.php?pid=S0001-63652005000200010&script=sci_arttext
12. Bussadori S, Guedes C, Bachiega J, Santis T, Motta L. Clinical and radiographic study of chemical-mechanical removal of caries using Papacárie: 24-month follow up. J Clin Pediatr Dent. [Internet]. 2011 [Consultado 05 Enero 2024];35(3):251-4. DOI: 10.17796/jcpd.35.3.75803m02524625h5
13. Pucuhuayla N, Paucar D. Efectividad *in vitro* de dos geles enzimáticos reblandecimiento y remoción químico-mecánica en dentina cariada. [Trabajo de Grado para Cirujano Dentista]. Huancayo: Universidad Continental.2023. Disponible en: <https://hdl.handle.net/20.500.12394/13446>

14. Kandil A, Abu Hamila N, Ezzat M, Metwally N. Evaluation of caries removal using papain versus conventional bur in primary teeth. Tanta Dental Journal [Internet]. 2023 [Consultado 05 Enero 2024]; 20:130-136. Disponible en: https://journals.lww.com/tdoj/fulltext/2023/20020/evaluation_of_caries_removal_using_papain_versus.9.aspx
15. Cardoso M, Goicoechea P, Giusiano G. Evaluación clínica y microbiológica de tres técnicas de eliminación de tejido cariado. Revista de Odontopediatría Latinoamericana. [Internet]. 2023;(13). DOI:<https://doi.org/10.47990/alop.v13i1.523>
16. Inamdar M, Chole D, Bakle S, Gandhi N, Hatte N, Rao M. Comparative evaluation of Brix3000, carie care ®, and smart burs in caries excavation: An *in vivo* study. J Conserv Dent. 2020; 23(2):163-168. DOI: 10.4103/JCD.JCD_269_20
17. Ángel N, Pérez O, Almaguer A. Evaluación *in vitro* del efecto antimicrobiano de un agente de remoción quimiomecánica de caries dental a base de papaína (Brix3000®). [Trabajo de Investigación para Especialidad en Odontopediatría]. México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2019. Disponible en: https://www.odonto.unam.mx/sites/default/files/inline-files/Nery%20Jocelyn%20%C3%81ngel%20Hern%C3%A1ndez_0.pdf
18. Toro T. Comparación del efecto antibacteriano de geles usados para la remoción química mecánica de la caries dental en cepa estándar de *Streptococcus mutans*. [Trabajo de Grado para Cirujano Dentista]. Pimentel: Universidad Señor de Sipán; 2018 Disponible en: <https://repositorio.uss.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12802/5661/Toro%20Andonayre%20Sussethy.pdf?sequence=5&isAllowed=y>
19. AlHumaid, Jehan. Efficacy and Efficiency of Papacarie versus Conventional Method in Caries Removal in Primary Teeth: An SEM Study. Saudi Journal of Medicine & Medical Sciences. [Internet]. 2020 [Consultado 05 Enero de 2024];8(1):41-45. DOI: 10.4103/sjmms.sjmms_104_18
20. Gulzar S, Arora R, Shah A, Bhardwaj B, Abusalim G, Khalil H, *et al.* Antibacterial Activity of Two Chemomechanical Caries Removal Gels on Carious Dentin of Primary

Teeth: An *in vitro* Study. The Journal of Contemporary Dental Practice. [Internet]. 2016 [Consultado 06 Enero de 2024];17(12):1027-1032. DOI: 10.5005/jp-journals-10024-1976

21. Goyal P, Kumari R, Kannan V, Madhu S. Efficacy and Tolerance of Papain Gel with Conventional Drilling Method: A Clinico-Microbiological Study. The Journal of Clinical Pediatric Dentistry. [Internet]. 2015 [Consultado 27 Enero 2024];39(2):109-12. Disponible en: <https://oss.jocpd.com/files/article/20220719575/pdf/JOCPD39.2.109.pdf>

22. Zaragoza M, Calisto V. Actividad antimicrobiana del Papacárie® contra *Streptococcus mutans* aislado de saliva. OdontoPediatria Actual. [Internet]. 2012 [Consultado 02 Febrero 2024];3:18-22. Disponible en: <https://www.researchgate.net/profile/Ma-Teresa-Zaragoza/publication/273722131>

23. Calisaya S, Coaquira N, Padilla T, Maque S. Efecto antibacteriano del extracto de ajo (*Allium sativum*) y té verde (*Camelia sinensis*) sobre *Streptococcus mutans* a las 24 y 48 horas en placa bacteriana bucal. Revista Científica Especialidades Odontológicas EOUG. [Internet]. 2023 [Consultado 08 Febrero 2024];6(1):1-9. Disponible en: <https://doi.org/10.53591/eoug.v6i1.1628>

24. Mizuno D, Guedes C, Hermida L, Motta L, Santos E, Bussadori S. Análisis clínico y radiográfico de las técnicas ART y remoción químico- mecánica de caries: estudio piloto. Odontoestomatología. [Internet]. 2011 [Consultado 05 Enero 2024];13(18):29-35. Disponible en: <http://www.scielo.edu.uy/pdf/ode/v13n18/v13n18a04.pdf>

25. Alulema R. Brix-3000: un método alternativo para reducir la ansiedad del paciente adulto, causada por tratamientos dentales. [Trabajo de Grado para Odontólogo]. Ambato: Universidad Regional Autónoma de Los Andes; 2022. Disponible en: <https://dspace.uniandes.edu.ec/handle/123456789/14954>

26. Ismail M, Al Haidar A. Evaluation of the Efficacy of Caries Removal Using Papain Gel (Brix 3000) and Smart Preparation Bur (*in vivo* Comparative Study). J Pharm Sci. [Internet]. 2019 [Consultado 24 Enero 2024];11. Disponible en: <https://global-ie.com/wp-content/uploads/2022/02/comparativo-brix-vs-fresas-inteligentes.pdf>

27. Casos S. Eficacia de la remoción de caries en dientes temporales mediante técnica convencional y técnica químico mecánica en preclínica odontológica Universidad de Huánuco 2019. [Trabajo de Grado para Cirujano Dentista]. Huánuco: Universidad de Huánuco; 2022. Disponible en: <http://repositorio.udh.edu.pe/123456789/3350>
28. Money J, Barrancos P. Operatoria Dental. 4ta ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2006.
29. Flores A, Rosas G. Remoción químico-mecánica de caries: reporte de un caso. Revista Tamé [Internet]. 2013 [consultado 20 Marzo 2025];2(5):148-53. Disponible en: https://www.uan.edu.mx/d/a/publicaciones/revista_tame/numero_5/Tam135-05.pdf
30. Arenas A. Eficacia de la papaína en la remoción química-mecánica de la caries. [Trabajo de Grado para Cirujano Dentista]. Tacna: Universidad Privada de Tacna; 2019. Disponible en: <http://repositorio.upt.edu.pe/handle/20.500.12969/2240>
31. Ojeda J, Oviedo E, Salas L. *Streptococcus mutans* y caries dental. Rev. CES Odontol [Internet]. 2013 [consultado 11 Marzo 2025];26(1)44-56. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-971X2013000100005
32. Estrada J, Pérez J, Hidalgo I. Caries dental y ecología bucal, aspectos importantes a considerar. Rev Cubana Estomatol [Internet]. 2006 [consultado 20 Marzo 2025];43:(1). Disponible en <http://scielo.sld.cu/pdf/est/v43n1/est07106.pdf>
33. Estrada J, Pérez J, Hidalgo I, Perez J. Asociación del Estreptococos mutans y lactobacilos con la caries dental en niños. Rev Cubana Estomatol. [Internet]. 2007 [consultado 20 Marzo 2025];44:(4) Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75072007000400002
34. Geometry R, Analysis G. Odontología Preventiva. 2da ed. Mexico D.F: McGraw-Hill Interamericana; 2009.
35. Zubaidah N, Dianawati N, Ridwan R, Shirakawa T, Kuntaman K, Setiawatie E, *et al.* Patrón clínico y prevalencia de *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus* en pacientes adultos y niños con caries dental. Pesquisa Brasileira en Odontopediatria Clín

Integr. [Internet]. 2022 [Consultado 06 Enero 2025];22. Disponible en: <https://doi.org/10.1590/pboci.2022.029>

36. Korona G, Skawska A, Wrobel, R, Pietrak, J, Tkacz I, Maslanko M, *et al.* *Streptococcus sobrinus* como bacteria oral predominante relacionada con la aparición de caries dental en niños polacos a los 12 años. *Revista Internacional de Investigación Ambiental y Salud Pública*. [Internet]. 2022 [Consultado 15 Enero de 2024];19(22):15005. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/ijerph192215005>

37. Yadav K, Prakash S. Dental Caries: A Microbiological Approach. *J Clin Infect Dis Pract* [Internet]. 2017 [Consultado 10 Febrero 2024];2(1):118. Disponible en: <https://doi.org/10.4172/2476-213X.1000118>

38. Zhu Y, Wang Y, Zhang S, Li J, Li X, Ying Y, *et al.* Association of polymicrobial interactions with dental caries development and prevention. *Front. Microbiol.* [Internet]. 2023 [Consultado 11 Marzo 2025];14:1162380. Disponible en: [10.3389/fmicb.2023.1162380](https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1162380)

39. Zhu B, Macleod L, Kitten T, Xu P. *Streptococcus sanguinis* biofilm formation & interaction with oral pathogens. *Future Microbiol.* [Internet]. 2018 [Consultado 15 de enero de 2024];13(8):915-932. DOI: [10.2217/fmb-2018-0043](https://doi.org/10.2217/fmb-2018-0043).

40. Al-Tai T, Al-Qassab Y, AL-Hadithi H, Al-Alwany A. El papel de *Streptococcus sanguinis* en la salud humana normal y en los pacientes. *JOBRC* [Internet]. 2025 [Consultado 15 Diciembre 2025];19(3):26-33. Disponible en: <https://jobrc.org/index.php/jobrc/article/view/852>

41. Velazco M. Tratamiento quimio-mecánico de la caries dental. Facultad de Odontología. UNCuyo [Internet]. 2019 [Consultado 11 Marzo 2025];13(1):31-37. Disponible en: https://bdigital.uncu.edu.ar/objetos_digitales/13625/velazcorfo-1312019.pdf

42. Flores J., García E., Gutiérrez D., Ochoa C, Pardavé M, Pérez A, *et al.* Técnica de Restauración Atraumática. [Trabajo de Investigación en Odontopediatría] Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 2010.

43. Bussadori S, Castro L, Galvão A. Papain Gel: A New Chemo-Mechanical Caries Removal Agent. J Clin Pediatr Dent [Internet]. 2006 [Consultado 11 Marzo 2025];30(2):115-9. Disponible en: <https://oss.jocpd.com/files/article/20220826-1195/pdf/JOCPD.30.2.115.pdf>
44. Fronza L, Schmitz M, Porn J, Garcia E, Bussadori S, Hilgenberg S. Remoción química-mecánica del tejido cariado en dientes permanentes: reporte de caso clínico. Rev Estomatológica Herediana [Internet]. 2017 [Consultado 15 Marzo 2025];27(2):111-5. Disponible en: <http://dx.doi.org/https://doi.org/10.20453/reh.v27i2.3141>
45. Javed S, Munir M, Altaf A, Anwar M, Shafi N, Virda M. Evaluation of Success of Restoration after Chemo Mechanical Caries Removal by Using Papain Based Gel. Med Forum [Internet]. 2022 [Consultado 11 Marzo 2025];33(2):61-64. Disponible en: <http://medicalforummonthly.com/index.php/mfm/article/view/520/435>
46. Paredes M. Tratamiento ultraconservador con Papacarie en niños de 5 a 7 años que acudieron a la Clínica Odontológica Universidad Privada del Valle Cochabamba. Revista de Investigación e Información en Salud [Internet]. 2017 [Consultado 05 Enero 2024];12(31):23-31. Disponible en: <https://doi.org/10.52428/20756208.v12i31.503>
47. Brix Medical Science. Brix 3000: Gel para tratamiento atraumático de caries [Internet]. Carapachay, Argentina: Brix SRL; 2026 [consultado 04 Marzo 2025]. Disponible en: <https://publicacionescientificasbrix3000.notion.site/2b8576b2da2c808f83eac7964cf66c09?v=2b8576b2da2c80cd87d2000c798eb5a1>
48. Bratu D, Nikolajevic N, Popa G, Pop S, Dragoş B, Luca M. A Bibliometric Analysis (2010–2020) of the Dental Scientific Literature on Chemo-Mechanical Methods of Caries Removal Using Carisolv and BRIX3000. Medicina. [Internet]. 2022 [Consultado 09 Enero 2024];58(6):788. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/medicina58060788>
49. Felizardo K, Barradas N, Guedes G, Ferreira F, Lopes M. Use of BRIX-3000 Enzymatic Gel in Mechanical Chemical Removal of Caries: Clinical Case Report. J Health Sci [Internet]. 2018 [consultado 04 Marzo 2025];20(2):87-9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.17921/2447-8938.2018v20n2p87-93>

50. Brix SRL. Brix 3000: Gel enzimático para remoción de caries. Prospecto del producto [folleto]. Carapachay, Argentina: Brix Medical Science; 2018. Disponible en: <https://brix-dentist.com/wp-content/uploads/2018/07/BRIX3000-Data-Sheet.pdf>
51. Henríquez G, Castillo M, Wilches J. Brix3000: alternativa mínimamente invasiva en la eliminación de caries. Acta Bioclínica. [Internet]. 2025 [Consultado 13 Abril 2025];15(29):597-614. Disponible en:
<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=10075795>
52. Hernández R., Fernández C. y Baptista P. Metodología de la investigación. 3° Ed. México, D.F., México: McGraw Hill Interamericana. 2002.
53. Ismail A, Pitts N, Tellez M. The International Caries Classification and Management System (ICCMS™) an example of a Caries Management Pathway. BMC Oral Health. [Internet].2015 [Consultado 25 Noviembre 2025];15(1):1-13. Disponible en :
<https://doi.org/10.1186/1472-6831-15-S1-S9>
54. Kavitha P, Sindhuja D y Banumathi M. Isolation and Biochemical Characterization of *Lactobacillus* species Isolated from Dahi. Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci [Internet]. 2016 [Consultado 15 Diciembre 2025];5(4):1042-1049. Disponible en:
<http://dx.doi.org/10.20546/ijcmas.2016.504.119>
55. Soofy B, Ahmed K. Isolation and Identification of *Lactobacillus* Using Biochemical and Molecular Methods. Iraqi Journal of Biotechnology [Internet]. 2019 [Consultado 15 Diciembre 2025];18(2)116-125. Disponible en:
<https://jige.uobaghdad.edu.iq/index.php/IJB/article/view/341>.
56. Procop GW, Church DL, Hall GS, Janda WM. Koneman. Diagnóstico Microbiológico: Texto y Atlas en color. 7ª ed. Barcelona: Wolters Kluwer; 2020.
57. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 36th ed. CLSI supplement M100 [informe técnico]. Berwyn, PA: CLSI; 2026.

58. Arias M, Castillo F. Manual de prácticas de microbiología: asignatura Microbiología e Inmunología Humana. Granada: Facultad de Odontología, Universidad de Granada; 2020 Disponible en: <https://www.wordreference.com/esen/si%20procede>.

59. The World Medical Association Inc. Declaration of Helsinki Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects [Internet]. WMA General Assembly, Somerset West, Republic of South Africa. Seoul; 2008 [Consultado 15 Diciembre 2025] Disponible en: <https://www.wma.net/what-we-do/medical-ethics/declaration-of-helsinki/>

60. Diaz Alicia. Desarrollo y evaluación de una técnica para la toma de muestras, crecimiento y cuantificación de unidades formadoras de colonias cariogénicas de superficies oclusales en niños de 6 a 9 años. [Tesis para Especialidad en Odontopediatría]. México: Universidad Autónoma de Querétaro. 2019

www.bdigital.ula.ve

www.bdigital.ula.ve

ANEXOS

Anexo 1. Consentimiento informado para la investigación “Efectividad antimicrobiana del Brix 3000 contra *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus sanguinis* y *Lactobacillus acidophilus*. Estudio *in vitro*”



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE PREVENTIVA Y SOCIAL

Investigación “Efectividad antimicrobiana del BRIX 3000® contra *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus sanguinis* y *Lactobacillus acidophilus*. Estudio *in vitro*”

La caries dental es una enfermedad multifactorial, de carácter invasivo y destructivo que lleva a la pérdida de tejido dentario debido a la producción de ácidos que generan las bacterias presentes en la placa bacteriana; al metabolizar estos ácidos degradan la matriz de colágeno presente en las diferentes estructuras dentarias causando desmineralización. Su tratamiento puede realizarse a través de distintos procedimientos que incluyen desde la remoción mecánica con instrumentos rotatorios de alta o baja velocidad, hasta la utilización de productos químicos que permiten remover la caries sin dolor, a través de la aplicación de un agente químico (Gel de Papaína) denominado Brix 3000® como una alternativa de tratamiento. En la literatura científica existe controversia con relación a la efectividad de dicho agente enzimático, por lo que se ha planteado una investigación experimental, estudio *in vitro*, cuyo objetivo permitirá determinar la efectividad antimicrobiana de Brix 3000® contra los microorganismos responsables de la producción de la caries, específicamente sobre *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus sanguinis* y *Lactobacillus acidophilus*, un estudio *in vitro*.

El procedimiento que se cumplirá en los niños participantes en el estudio seguirá estrictas normas de bioseguridad y no afectará la integridad del participante. Por tanto, la participación de su hijo y/o representado consistió en colocar toda la muestra de saliva producida en un periodo de tiempo de 1 minuto en un recipiente boca ancha estéril y una muestra de placa dental tomada de cavidad de caries y supragingival para posteriormente ser enviadas a un laboratorio especializado donde se realizarán las pruebas respectivas y, así cumplir el objetivo propuesto.

Previamente se necesitará de su colaboración para el cumplimiento de las siguientes instrucciones:

- El niño deberá hacer una última higiene dental, la noche previa al estudio (no deberá bajo ningún motivo cepillar sus dientes en la mañana ni realizar ningún enjuague).

- No haber consumido agua ni ningún otro tipo de alimento, hasta después de tomada la muestra.

Los datos recogidos serán usados para fines científicos y estadísticos, además serán resguardados y presentados bajo estricto anonimato. De igual manera, el manejo de los datos se llevará a cabo cumpliendo con los principios éticos para la investigación médica consagrados en la Declaración de Helsinki.

Las Profesoras responsables de dicha investigación serán las Profesoras Yanet Simancas Pereira y Greana Aguilera y, será llevada a cabo por las Bachilleres Ariana Ramírez y Ana Niño, estudiantes del quinto año de la carrera de Odontología, para ser presentado como requisito de Trabajo Especial de Grado (TEG) para optar al Título de Odontólogo en la Universidad de los Andes”, por lo que agradecemos de antemano su colaboración y apoyo en misma.

Declaración de consentimiento por parte del padre y/o representante:

Yo _____ titular de la cédula de identidad _____, manifiesto que he leído y comprendido perfectamente lo descrito anteriormente y, que me encuentro en la capacidad de expresar mi consentimiento de manera voluntaria para que mi hijo(a) y/o representado(a) _____, identificado con la C.I.: _____, participe en la investigación “Efectividad antimicrobiana del BRIX 3000® contra *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus sanguinis* y *Lactobacillus acidophilus*. Estudio *in vitro*”.

Por favor, se agradece firmar la autorización de su hijo y/o representado(a), con finalidad de participar en el presente estudio y, devolver el oficio a la Institución los antes posible.

Representante. _____ Fecha _____

Número de teléfono: _____

Anexo 2. Fichas de registro de la toma de muestra

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGÍA PREVENTIVA Y SOCIAL

Investigación “Efectividad antimicrobiana del BRIX 3000® contra *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus sanguinis* y *Lactobacillus acidophilus*. Estudio *in vitro*”

FICHA DE REGISTRO DE MUESTRAS

NOMBRE: _____

EDAD: _____

GRADO: _____

FECHA: _____

HORA: _____

MUESTRA: _____

N° MUESTRA: _____

ASLAMIENTO BACTERIANO:

Anexo 3. Hoja de Registro para recolección de datos

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGÍA PREVENTIVA Y SOCIAL

Investigación “Efectividad antimicrobiana del BRIX 3000® contra *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus sanguinis* y *Lactobacillus acidophilus*. Estudio *in vitro*”

N° de muestra: _____

Fecha: _____

Crecimiento bacteriano:

- Agar Mitis Salivarius 24h: _____
- Agar Mitis Salivarius 48h: _____

- Agar MRS 24h: _____
- Agar MRS 48h: _____

Prueba de susceptibilidad Agar Sangre 24h:

- Diámetro del halo agar sangre Brix 3000®: _____
- Diámetro del halo agar sangre Clorhexidina: _____
- Diámetro del halo agar sangre Solución Fisiológica: _____

OBSERVACIONES:

HOJA DE REGISTRO

N° de Muestra	Prueba de Susceptibilidad.	Diámetro de Halo
		Brix: _____ Clorhexidina: _____ SSF: _____
		Brix: _____ Clorhexidina: _____ SSF: _____
		Brix: _____ Clorhexidina: _____ SSF: _____
		Brix: _____ Clorhexidina: _____ SSF: _____
		Brix: _____ Clorhexidina: _____ SSF: _____
		Brix: _____ Clorhexidina: _____ SSF: _____
		Brix: _____ Clorhexidina: _____ SSF: _____