

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA



“EFICIENCIA EN LA INHIBICIÓN DE *Streptococcus mutans* ENTRE UNA SOLUCIÓN DE BICARBONATO DE SODIO Y ENJUAGUES BUCALES COMERCIALES: ESTUDIO COMPARATIVO *IN VITRO*”.

Por

BRIANA YARELY MEDINA LIZÁRRAGA

Como requisito parcial para obtener el Grado de
Maestría en Ciencias Odontológicas en el Área de Odontopediatría

Junio, 2023

Maestría en Ciencias Odontológicas en el Área de Odontopediatría

“EFICIENCIA EN LA INHIBICIÓN DE *Streptococcus mutans* ENTRE UNA SOLUCIÓN DE BICARBONATO DE SODIO Y ENJUAGUES BUCALES COMERCIALES: ESTUDIO COMPARATIVO *IN VITRO*”.

BRIANA YARELY MEDINA LIZÁRRAGA

Comité de Tesis

Presidente

Secretario

Vocal

Maestría en Ciencias Odontológicas en el Área de Odontopediatría

“EFICIENCIA EN LA INHIBICIÓN DE *Streptococcus mutans* ENTRE UNA SOLUCIÓN DE BICARBONATO DE SODIO Y ENJUAGUES BUCALES COMERCIALES: ESTUDIO COMPARATIVO *IN VITRO*”.

TESISTA

BRIANA YARELY MEDINA LIZÁRRAGA

Comité de Tesis

DIRECTOR DE TESIS

ERANDI ESCAMILLA GARCÍA

CODIRECTOR DE TESIS

MARCELA MONTES VILLAREAL

ASESOR ESTADÍSTICO

ANTONIO COSTILLA ESQUIVEL

ASESOR METODOLÓGICO EN ANÁLISIS
MICROSCÓPICO DE CAMPO CLARO Y CONFOCAL
JUAN CARLOS SEGOVIANO RAMÍREZ

ASESOR METODOLÓGICO

PATRICIA GARCÍA PALENCIA

ASESOR METODOLÓGICO

MARÍA TERESA PÉREZ QUINTERO

AGRADECIMIENTOS

Le doy gracias a Dios por ayudarme a realizar este trabajo de investigación y por darme fuerza y salud todos los días, al igual que a mi madre Trudy por siempre apoyarme, escucharme y darme palabras de ánimo.

Quiero expresar el agradecimiento enorme que le tengo a mi directora de tesis, la Dra. Erandi Escamilla García por su disponibilidad para resolver mis dudas siempre y por guiarme de principio a fin con su gran don de la enseñanza, así como a mi codirectora, la Dra. Marcela Montes Villareal por todo su apoyo; al Dr. Antonio Costilla Esquivel por resolver mis dudas en estadística y al Dr. Juan Carlos Segoviano Ramírez por su apoyo en la parte de microscopía.



Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) por la beca otorgada por el periodo 2020-2022 en apoyo al desarrollo de mis estudios de posgrado y el cumplimiento de este proyecto en la Ciudad de Monterrey, Nuevo León.

Al Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica 2021 (PAICYT), por el fondo aprobado para el proyecto CN1927-21.



Al Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud (CIDICS) por permitirme utilizar sus instalaciones, equipo y mobiliario necesario para el desarrollo del proyecto de investigación, en especial al Laboratorio de Biotecnología Microbiana y al área de Cultivo Microbiano, así como a la Unidad de Bioimagen (microscopía) y la Unidad de Patógenos Emergentes (esterilización).

Al Laboratorio de Infectología, torre de Alta especialidad y Medicina Avanzada (AEMA), Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” por permitirme utilizar sus instalaciones para realizar ahí la preparación de reactivos para algunos experimentos.

A mi familia y amigos por su apoyo, consejos y cariño.

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS	IV
LISTA DE TABLA.....	VII
LISTA DE FIGURAS.....	VIII
RESUMEN.....	XII
ABSTRACT.....	XIII
1. INTRODUCCIÓN	14
2. HIPÓTESIS.....	17
3.OBJETIVOS	18
3.1 Objetivo general.....	18
3.2 Objetivos específicos	18
4. ANTECEDENTES	
4.1 Caries dental.....	19
4.2 Microbiota oral.....	20
4.2.1 <i>Streptococcus mutans</i>	21
4.3 Generalidades de los enjuagues bucales	23
4.3.1 Clorhexidina.....	24
4.3.2 Fluoruro de sodio	25
4.3.3 Xilitol	27
4.3.4 Cloruro de cetilpiridinio	28
4.4 Bicarbonato de sodio.....	29
5. MÉTODOS	
5.1 Conservación y activación de material biológico	31
5.2 Estandarización de la solución de bicarbonato de sodio	32
5.3 Actividad antimicrobiana del bicarbonato de sodio	34
5.3.1 Método de Difusión en Disco.....	34
5.3.2 Concentración Mínima inhibitoria y pH.....	38
5.4 Actividad bactericida y bacteriostática.....	40

5.5 Tinción de Gram.....	41
5.5.1 Diferenciación morfológica.....	41
5.6 Análisis semicuantitativo del efecto de los diferentes enjuagues sobre el crecimiento bacteriano por medio de Microscopia confocal de fluorescencia (intensidad de fluorescencia)	42
5.7 Análisis estadístico.....	42
6. RESULTADOS	
6.1 Estandarización	43
6.2 Actividad antimicrobiana	43
6.2.1 Susceptibilidad en Disco	43
6.2.2 Ensayo de Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)	44
6.2.3 Estadísticos descriptivos de los conteos celulares de <i>S. mutans UA130</i> por tipo de tratamiento	48
6.2.4 Actividad bactericida y bacteriostática.....	50
6.3 pH.....	56
6.4 Diferenciación morfológica.....	58
6.5 Análisis semicuantitativo del efecto de los diferentes enjuagues sobre el crecimiento bacteriano por medio de Microscopia confocal de fluorescencia (intensidad de fluorescencia).....	61
7. DISCUSIÓN	65
8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	70
9. LITERATURA CITADA.....	71
ANEXOS.....	87
RESUMEN BIOGRÁFICO	89

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
I. Bicarbonato de sodio marca CTR (grado laboratorio).....	33
II. Características generales de los EBC incluidos en el estudio como parte de los controles recomendados para la eliminación bacteriana: Colgate® Plax KIDS (Colgate®), Fluoxetyl®, Listerine® Cool Mint Zero alcohol (Listerine®), Organic Fresh Tea Tree, Dental Kids PJ Masks (PJ Masks), TheraBreath® for Kids (TheraBreath®), Organic Fresh Carbón Activado, Peroxidín®. Especificaciones de ingredientes (sustancia activa y de formulación), recomendación de uso (edad)	36
III. Fórmulas estructurales de los compuestos activos presentes en los EBC y NaHCO ₃ , utilizados en el estudio	38
IV. Distribución de contenidos de muestras para el ensayo de Concentración Mínima Inhibitoria	39
V. Desarrollo promedio de Unidades Formadoras de Colonia (expresado en UFC/mL) de EBC y medidas de halo de inhibición por método Kirby-Bauer con imagen representativa.....	52
VI. Comparación cuantitativa y cualitativa del desarrollo promedio de Unidades Formadoras de Colonia (expresado en UFC/mL) entre el NaHCO ₃ de la marca CTR y A&H, en un rango de concentraciones de 10 a 500 mg/mL	54

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Imágenes representativas de la ausencia de halos de inhibición a la presencia de NaHCO ₃ en concentraciones de 10-500 (mg/mL) de las marcas CTR y A&H. Se utilizó como control negativo agua destilada estéril (H ₂ O).	44
2. Representación cualitativa de la MIC de NaHCO ₃ , marca CTR, donde se muestran el control de crecimiento (cultivo de <i>S. mutans</i>) y las concentraciones utilizadas de 10 a 500 mg/mL	45
3. Representación cualitativa de la MIC de NaHCO ₃ , marca A&H, donde se muestran el control de crecimiento (cultivo de <i>S. mutans</i>) y las concentraciones utilizadas de 10 a 500 mg/mL	45
4. Reducción celular basada en la MIC de NaHCO ₃ con concentraciones utilizadas de 10 a 500 mg/mL de las marcas CTR y A&H.....	46
5. Reducción celular de la bacteria <i>S. mutans</i> (%) en presencia de distintos EBC utilizados como control positivo en el ensayo MIC.....	47
6. Representación cualitativa de la MIC de los EBC, donde se muestran los tubos que contienen el control de crecimiento (cultivo de <i>S. mutans</i>) y los EBC de las marcas Colgate [®] , Fluoxetyl [®] , Listerine [®] , Organic Fresh Tea Tree, PJ Masks, TheraBreath [®] , Organic Fresh Carbón, Peroxidín [®]	47
7. Estadísticos descriptivos representados en gráfica de caja, de los conteos celulares por mililitro (expresado en %) de la bacteria cariogénica <i>S. mutans UA130</i> por Tipo de Tratamiento conteniendo o no NaHCO ₃ (A), y Tipo de Solución (B): EBC, NaHCO ₃ CTR y NaHCO ₃ A&H.....	49
8. Estadísticos descriptivos representados en gráfica de caja, de los conteos celulares de la bacteria cariogénica <i>S. mutans UA130</i> por Tipo de EBC y soluciones de NaHCO ₃ (CTR) a diferentes concentraciones	50
9. Valores de pH de la MIC de <i>S. mutans</i> con soluciones de NaHCO ₃ marcas A&H y CTR en un rango de concentraciones de 10 a 500 mg/mL. Los valores fueron medidos después de transcurrir 18-24 horas a 37 °C	57
10. Valores de pH de la MIC de <i>S. mutans</i> con EBC. El pH fue medido después de transcurrir 18-24 horas a 37 °C	58

11. Imagen representativa de la morfología de *S. mutans* UA130 (Gram+) tomada de un cultivo puro (Control de Crecimiento), y realizada por la técnica de Tinción diferencial de Gram. Uso de microscopía invertida Axio Observer, Objetivo: Plan-Apochromat 100x/1.40 Oil..... 59
12. Diferencia cualitativa de *S. mutans* UA130 al término del ensayo de la MIC a 50, 250 y 500 mg/mL de NaHCO₃ marca A&H y CTR. Técnica de Tinción diferencial de Gram. Uso de microscopía invertida Axio Observer, Objetivo: Plan-Apochromat 100x/1.40 Oil..... 59
13. Diferencia cualitativa de *S. mutans* UA130 al término del ensayo de la MIC entre los distintos EBC utilizados en el estudio. Técnica de Tinción diferencial de Gram. Uso de microscopía invertida Axio Observer, Objetivo: Plan-Apochromat 100x/1.40 Oil..... 60
14. Representación de intensidad de fluorescencia de las soluciones de EBC en contraste con el control negativo (solución NaCL 0.9%) y el control de crecimiento (inóculo *S. mutans*)..... 62
15. Representación en *Box Plot* de las Unidades de Intensidad de Fluorescencia (UIF) de: **(A)** *S. mutans* UA130 como control de crecimiento (CC), y en presencia de soluciones de NaHCO₃ a 500 y 50 mg/mL con las marcas CTR y A&H, utilizando solución NaCL 0.9% como control negativo (CN); existe diferencia significativa en el NaHCO₃ de CTR (500 mg/mL) y el de A&H (500 y 50 mg/mL) ($p < 0.05$) con la bacteria *S. mutans*. En las UIF de *S. mutans* en presencia de **(B) Colgate®**: existe diferencia significativa entre las dos concentraciones (500 y 50 mg/mL) de ambas marcas de NaHCO₃ (CTR y A&H) y el enjuague bucal ($p < 0.05$); **(C) Listerine®**: existe diferencia significativa entre NaHCO₃ de CTR a 50 mg/mL y el enjuague ($p < 0.05$) a excepción de las soluciones de CTR y A&H a 500 mg/ mL y A&H a 50 mg/mL ($p > 0.05$); **(D) Peroxidín®**: existe diferencia significativa entre NaHCO₃ de CTR a 50 mg/mL y A&H a 500 mg/mL con el enjuague ($p < 0.05$), mientras que con las soluciones de CTR a 500 mg/ mL y A&H a 50 mg/mL no hubo diferencia significativa ($p > 0.05$) 64

NOMENCLATURA

A&H	Arm and Hammer
EBC	Enjuagues Bucales Comerciales
spp.	Especies de bacterias en plural
NaHCO ₃	Bicarbonato de Sodio
CIDICS	Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud
NaCl	Cloruro de Sodio
col.	Colaboradores
CM	Commercial Mouthwashes
MIC	Concentración Mínima Inhibitoria
MBC	Concentración mínima Bactericida/Bacteriostática
CC	Control de Crecimiento
CN	Control Negativo
CTR	Control Técnico y Representaciones Scientific
g	Gramo
ICC	Infusión Cerebro Corazón
nm	Nanómetro
µg	Microgramo
µl	Microlitro
mg	Miligramo
mL	Mililitro
mm	Milímetro

mM	Milimolar
min	Minutos
®	Registered trademark
s	Segundos
<i>S.</i>	<i>Streptococcus</i>
™	Trademark
TS	Trypticaseína de Soya
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
UIF	Unidad de Índice de Fluorescencia
UV	Ultravioleta

TESISTA: BRIANA YARELY MEDINA LIZÁRRAGA
DIRECTOR DE TESIS: ERANDI ESCAMILLA GARCÍA
CODIRECTOR DE TESIS: MARCELA MONTES VILLAREAL
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

“EFICIENCIA EN LA INHIBICIÓN DE *Streptococcus mutans* ENTRE UNA SOLUCIÓN DE BICARBONATO DE SODIO Y ENJUAGUES BUCALES COMERCIALES: ESTUDIO COMPARATIVO *IN VITRO*”.

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: Los Enjuagues Bucles Comerciales (EBC) son auxiliares efectivos en la limpieza de la cavidad oral, sin embargo, su composición en ocasiones resulta agresiva para utilizarse en niños, además, de no ser de fácil acceso para toda la población. Una alternativa de enjuague natural, efectiva y que pueda elaborarse en el hogar, podría lograr que más personas tengan acceso a una mejor higiene oral y a la prevención de infecciones de la cavidad bucal. **OBJETIVO:** Preparar y evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* de 2 soluciones de bicarbonato de sodio (NaHCO_3) de las marcas CTR (grado laboratorio) y A&H (producto comercial) sobre el crecimiento de *Streptococcus mutans* UA130. **METODOLOGÍA:** Se estandarizó la preparación de una solución madre para ambas marcas de NaHCO_3 con agua destilada (2.5 g/mL). La actividad antimicrobiana del NaHCO_3 se determinó en un rango de 10-500 mg/mL mediante los ensayos de Sensibilidad en disco (Método de Kirby-Bauer) sobre agar TS (Trypticaseína de Soya) en cajas Petri con discos de papel filtro (6mm), y de Concentraciones Mínima Inhibitoria (MIC) y Bactericida/Bacteriostática (MBC) en caldo y agar TS estériles respectivamente. Se efectuaron un análisis *cualitativo* para la diferenciación morfológica con la técnica de Tinción de Gram; un *cuantitativo* (células/mL, pH) y otro *semicuantitativo* por microscopía confocal de fluorescencia. La solución salina (NaCL 0.9%) se utilizó como control negativo y 8 EBC como control positivo de referencia. Los ensayos se realizaron por triplicado, y se aplicó un análisis estadístico de varianza, y un valor $p \leq 0.05$. **RESULTADOS:** La reducción celular promedio de *S. mutans* UA130 con 250 a 500 mg/mL de NaHCO_3 CTR fue de $82.34\% \pm 1.48$, mientras que con la marca A&H fue de $73.53\% \pm 3.06$ en el rango de 250 a 450 mg/mL. Los EBC que tuvieron una mayor reducción celular fueron PJ Masks con $97.7\% \pm 7.77$, Peroxidín® con $93.3\% \pm 4.83$ y Colgate® con $93\% \pm 4.64$, Organic Fresh Carbón alcanzó el $88.6\% \pm 4.69$ y $87\% \pm 5.60$ en presentación Tea Tree. Mientras que Listerine®, Fluoxetyl® y TheraBreath® redujeron la población celular de *S. mutans* a $64.4\% \pm 5.38$, $41\% \pm 5.55$ y $38\% \pm 3.58$, respectivamente. **CONCLUSIONES:** Ambas marcas de NaHCO_3 en concentraciones ≥ 250 mg/mL, tienen una reducción bacteriana de *S. mutans* comparable y que incluso supera a los enjuagues de las marcas Listerine®, Fluoxetyl® y TheraBreath®.

TESISTA: BRIANA YARELY MEDINA LIZÁRRAGA
DIRECTOR DE TESIS: ERANDI ESCAMILLA GARCÍA
CODIRECTOR DE TESIS: MARCELA MONTES VILLAREAL
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

“EFFICIENCY IN THE INHIBITION OF *Streptococcus mutans* BETWEEN A
SODIUM BICARBONATE SOLUTION AND COMMERCIAL MOUTHWASHES:
COMPARATIVE *IN VITRO* STUDY.”

ABSTRACT

BACKGROUND: Commercial mouthwashes (CM) are auxiliaries in cleaning the oral cavity, however, their composition is sometimes aggressive when used in children, in addition to not being easily accessible to the entire population. A natural, effective rinsing alternative made at home could give more people access to better oral hygiene and prevent infections of the oral cavity. **OBJECTIVE:** To prepare and evaluate the *in vitro* antimicrobial activity of two solutions of sodium bicarbonate (NaHCO_3) of the brands CTR (laboratory grade) and A&H (commercial product) on the growth of *Streptococcus mutans* UA130. **METHODOLOGY:** The preparation of a stock solution for both brands of NaHCO_3 was standardized with distilled water (2.5 g/mL). The antimicrobial activity of NaHCO_3 was determined in a range of 10-500 mg/mL by disk diffusion susceptibility tests (Kirby-Bauer Method) on TS (Trypticasein Soy) agar in Petri dishes with filter paper disks (6mm), and Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) and Bactericidal/Bacteriostatic (MBC) in sterile broth and TS agar respectively. A *qualitative* analysis was conducted for the morphological differentiation with Gram staining technique; a *quantitative* one (cells/mL, pH) and another *semiquantitative* by confocal fluorescence microscopy. Saline solution (NaCl 0.9%) was used as a negative control and 8 CM as a reference positive control. The tests were made in triplicate, and a statistical analysis of variance was applied, and a value $p < 0.05$. **RESULTS:** The average cell reduction of *S. mutans* UA130 from 250 to 500 mg/mL of CTR NaHCO_3 was $82.34\% \pm 1.48$, while with A&H was $73.53\% \pm 3.06$ in the range of 250 to 450mg/mL. The CM that had greater cell reduction were PJ Masks with $97.7\% \pm 7.77$, Peroxidin[®] with $93.3\% \pm 4.83$ and Colgate[®] with $93\% \pm 4.64$, Organic Fresh Carbón reached $88.6\% \pm 4.69$ and $87\% \pm 5.60$ in Tea Tree presentation. While Listerine[®], Fluoxetyl[®] and TheraBreath[®] reduced the cell population of *S. mutans* to $64.4\% \pm 5.38$, $41\% \pm 5.55$ and $38\% \pm 3.58$, respectively. **CONCLUSION:** Both brands of NaHCO_3 at ≥ 250 mg/mL have comparable and even better bacterial reduction of *S. mutans* than Listerine[®], Fluoxetyl[®] and TheraBreath[®].

1.- Introducción

Los Enjuagues Bucales Comerciales (EBC) son auxiliares efectivos en la limpieza de la cavidad oral, sin embargo, su composición en ocasiones resulta agresiva para utilizarse en niños, además, además de no ser de fácil acceso para toda la población. Una alternativa de enjuague natural, efectiva y que pueda elaborarse en el hogar, podría lograr que más personas tengan acceso a una mejor higiene oral y a la prevención de infecciones de la cavidad bucal.

Los enjuagues bucales no suplen la fuerza mecánica ejercida por el cepillo dental para la remoción de la placa dentobacteriana, sin embargo, representan una manera eficiente de disminuir los recuentos de *Streptococcus mutans*, razón por la cual se recomiendan como un refuerzo a la higiene dental. Las formulaciones de los EBC son diversas entre sí, así como el tipo de principio activo (agente antimicrobiano), por lo que cada uno ejerce una actividad y efectividad antimicrobiana diferente. En los últimos años, las alternativas de propuestas antimicrobianas comprenden un origen biológico o natural, mismas que representan una opción que prescindan el uso de sustancias químicas dañinas a los tejidos duros y blandos en la cavidad oral.

La placa dentobacteriana juega un papel importante en la proliferación y progresión de la caries dental, ésta última se considera una enfermedad multifactorial, misma que puede prevenirse. Entre las bacterias presentes se encuentra *S. mutans* como uno de los agentes etiológicos de la caries dental. Aunado a ello, el control biológico de la placa dentobacteriana se logra por medio de la acción mecánica que ejercen el cepillado dental y el uso de hilo dental. Como coadyuvantes de control biológico se recomienda el uso de

enjuagues bucales, que cuentan con agentes antimicrobianos para reducir la cantidad de bacterias presentes. Existe una amplia variedad de EBC con diferentes principios activos, pero en ocasiones, los padres de familia o tutores tienen un desconocimiento del uso de enjuagues en niños, o bien no cuentan con el recurso económico para adquirirlo, o en su defecto optan por no utilizar productos comerciales que puedan causar efectos secundarios en sus hijos, por lo que buscan alternativas que sean de origen natural, o que no causen daño o efectos secundarios en la boca de sus hijos y sean de fácil acceso. El bicarbonato de sodio (NaHCO_3), cuenta con propiedades bactericidas y ha sido estudiado en distintos ámbitos de la odontología, así como en la clínica del área médica; expuesto lo anterior, se llega a la siguiente pregunta de investigación: *¿Puede un enjuague elaborado a base de bicarbonato de sodio diluido en agua, tener un efecto antimicrobiano similar a los enjuagues bucales comerciales sobre el desarrollo de *S. mutans*?*

Los niños no tienen una coordinación motora tan desarrollada como el adulto, por lo que se les dificulta remover con eficacia la placa dentobacteriana al momento de cepillar sus dientes, si bien, cuando son menores de 8 años se recomienda que un adulto les apoye, es a partir de esta edad en promedio, que los niños comienzan a tomar conciencia en sus manos de mantener la higiene oral. A nivel comercial, existen diversos enjuagues bucales para reforzar la limpieza dental y prevenir o minimizar la presencia microbiana. Si bien, algunos están dirigidos al público infantil y otros al público en general; todos varían entre sí y contienen diferentes ingredientes activos y características de formulación. Algunos padres o tutores dudan en utilizar EBC que resulten agresivos o con efectos secundarios en sus hijos, otros no tienen la posibilidad económica de adquirirlos, por lo que en este estudio se buscó que una solución a base de NaHCO_3 preparada en agua, pueda ser una alternativa a los EBC al presentar una actividad antimicrobiana similar. De esta manera el

enjuague lo podrían preparar y realizar en el hogar, con la ventaja de ser un producto de bajo costo y fácil adquisición.

En este estudio se evaluó la actividad antimicrobiana *in vitro* de 8 EBC y 2 soluciones de NaHCO₃ de diferentes marcas diluido en agua, sobre el crecimiento de *S. mutans* UA130.

Se estandarizó el proceso de preparación de dos soluciones madre de NaHCO₃ de dos marcas: Arm & Hammer Essentials (A&H, producto comercial) y Control Técnico y Representaciones (CTR, grado laboratorio) a concentración de 2.5 g/mL, las cuales fueron puestas a las mismas pruebas que 8 EBC, se realizaron ensayos de actividad antimicrobiana con la técnica de Sensibilidad en Disco (Método de Kirby-Bauer), Ensayos de Concentración Mínima inhibitoria (MIC), medición de pH, pruebas de Actividad Bactericida y Bacteriostática, diferenciación morfológica por medio de Tinción de Gram y Análisis *semicuantitativo* sobre el crecimiento bacteriano por medio de Microscopia confocal de fluorescencia.

Para el análisis estadístico se recurrió al programa R versión 4.2.1., y a los paquetes tidyverse (versión 2.0.0), ggplot2 (versión 3.4.2), y dplyr (versión 1.1.1).

Ambas marcas de NaHCO₃ (A&H y CTR) presentan una reducción bacteriana de *S. mutans* del 75% a partir de 250 mg/mL, llegando al 84% en concentraciones de 500 mg/mL. Respecto a los EBC, los resultados de la eficacia antibacteriana del NaHCO₃ en ambas marcas a partir de 250 mg/mL supera y por tanto compite con las marcas Listerine[®], Fluoxytil[®] y TheraBreath[®].

2.- Hipótesis

Las soluciones de bicarbonato de sodio de grado laboratorio (CTR) y comercial (A&H), tienen un efecto antimicrobiano similar a los enjuagues bucales comerciales en la proliferación de una cepa pura de *Streptococcus mutans* UA130, ATCC-700611.

3.- Objetivos

3.1- Objetivo General

Evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* de 2 soluciones de bicarbonato de sodio grado laboratorio (CTR) y comercial (A&H) preparados en agua sobre el crecimiento de *Streptococcus mutans* UA130.

3.2.- Objetivos específicos

- Estandarizar los parámetros de preparación de la solución del bicarbonato de sodio y evaluar la actividad antimicrobiana en distintas concentraciones.
- Identificar la actividad antimicrobiana de 8 enjuagues bucales comerciales.
- Comparar la eficiencia antimicrobiana de la solución de bicarbonato de sodio con los 8 enjuagues bucales comerciales.

4. Antecedentes

4.1 Caries dental

Las percepciones de la etiología de la caries dental han cambiado a lo largo del tiempo, al principio se le consideraba como una enfermedad iniciada por microorganismos, para luego como una enfermedad infecciosa ocasionada por bacterias específicas, llegando hasta el actual modelo que hace hincapié al enfoque bacteriano – ecológico mixto como responsable de los inicios de la lesión cariosa (Philip et al., 2018) y determinada por factores ambientales, biológicos, psicosociales y conductuales (Machiulskiene et al., 2020).

Es una de las enfermedades con mayor prevalencia a nivel global y las personas son susceptibles a ella durante todas las etapas de su vida (Selwitz et al., 2007; Zhu et al., 2021).

Entre los múltiples factores de riesgo asociados a la caries dental se encuentran la ingesta frecuente de alimentos con altos niveles de azúcar (Chi y Scott, 2019), una gran cantidad en el conteo de bacterias orales cariogénicas, flujo salival insuficiente, poca exposición al fluoruro, mala higiene bucal y nivel socioeconómico bajo (Kirthiga et al., 2019; Qu et al., 2022).

Es la consecuencia de un cambio perjudicial en la composición del biofilm dental donde se encuentran reducido el nivel de bacterias beneficiosas y domina una microbiota tolerante y productora de ácidos, por lo que las estrategias preventivas deben estar enfocadas en reducir la frecuencia de los períodos ácidos del pH buscando mantenerlo por

un mayor número de tiempo alrededor de la neutralidad para así apoyar a las comunidades de bacterias orales beneficiosas asociadas con la salud (Pitts et al., 2021).

Es una de las afecciones bucales más frecuentes en las personas por lo que demanda periodos de intervención temprana para su prevención, los organismos primarios que se encuentran en relación estrecha son *S. mutans* y *Lactobacillus* (Selvarajan et al., 2020).

Analizar y comprender la relación existente entre bacterias específicas presentes en la placa dentobacteriana durante un estado de salud y la enfermedad, es fundamental para prevenir y combatir la caries dental (Qudeimat et al., 2020).

4.2 Microbiota oral

Está compuesta por un grupo de organismos, estos incluyen arqueas, bacterias, hongos, protozoos y virus, estos pueden encontrarse suspendidos en la saliva como organismos de fase planctónica o adheridos a una estructura como las superficies orales como a la placa dental, la salud bucal del ser humano se relaciona directamente con la homeostasis existente en la biopelícula de la placa dental, un desequilibrio en ella puede conducir a enfermedades orales como la caries y enfermedad periodontal (Samaranayake y Matsubara, 2017).

La cavidad oral aloja el segundo microbioma más complejo del cuerpo, seguido del intestino, pero a diferencia de éste, puede variar dependiendo de la higiene oral que mantenga el individuo, acciones como el cepillado dental, limpieza de la lengua, uso de hilo dental y enjuagues bucales pueden reducir la formación de biopelículas y así tener un impacto en la colonización de bacterias en boca (Marsh, 1994; Kilian et al., 2016).

Las bacterias presentes en la placa dentobacteriana se encuentran como una comunidad organizada, compiten y cooperan entre ellas por diferentes mecanismos, lo cual da como resultado cambios en la estructura y función de la biopelícula (Struzycka, 2014).

Cuando la saliva es producida por las glándulas salivales se encuentra libre de bacterias, pero en el momento en que entra en contacto con la cavidad oral se adicionan varias sustancias provenientes de la placa, cálculo dental, exudados inflamatorios y otros productos, todos estos agregan contenido bacteriano a la saliva, por eso parece existir una relación directa entre la higiene bucal del individuo y las bacterias presentes en boca (Oyetola et al., 2019).

Los microbiomas presentes en el cuerpo humano interactúan con diversas señales en respuesta a condiciones fisiológicas, el microbioma salival se ve regulado por señales relacionadas con el individuo, los *Streptococcus* spp., *Gemella* spp., y *Prevotella* spp., muestran una alta asociación con la oscilación circadiana la cual enriquece las funciones de las respuestas ambientales como sistemas reguladores de dos componentes por la noche y biosíntesis de vitaminas y ácidos grasos por la mañana (Takayasu et al., 2017).

Una alta cantidad de bacterias presentes en la cavidad oral se asocia significativamente con una higiene bucal deficiente (Yamashita y Takeshita, 2017).

El metabolismo de los azúcares por los microorganismos de la placa dental resulta en formación de ácido, mismo que propicia una disminución en el pH de la superficie dental (Chifor et al., 2014).

4.2.1 *Streptococcus mutans*

Fue descrito por primera vez por Clarke en 1924, en su estudio aisló microorganismos presentes en piezas extraídas que mostraban caries dental y observó la presencia de un

organismo que crecía en colonias de color blanco grisáceo opaco, concluyó que era un *Streptococcus* spp., señaló que era un productor de ácido considerablemente activo el cual se aislaba con una alta frecuencia en los dientes examinados desde las primeras etapas de caries dental y en su artículo propuso el nombre de *Streptococcus mutans* (Clarke, 1924; Edwardsson, 1968).

Es la bacteria clave en el desarrollo del proceso carioso, sin embargo, otras especies bacterianas contribuyen también en el desarrollo de la caries dental (Eriksson et al., 2018).

Los estudios de esta bacteria van enfocados en analizar los mecanismos moleculares que usa para la formar biopelículas en la superficie dental, metabolizar de manera rápida los carbohidratos que obtiene por medio del huésped y la capacidad de subsistir durante los cambios y desafíos ambientales en la placa dentobacteriana (Lemos et al., 2019).

La presencia de *S. mutans* y la levadura *Candida albicans* en la placa dentobacteriana supragingival de los niños con caries temprana de la infancia, aumenta cuando se eleva la proporción de lesiones cariosas activas y la gravedad de ellas, la higiene bucal deficiente pueden llevar al aumento de lesiones cariosas activas y al mismo tiempo elevar la carga microbiana de *S. mutans* y *C. albicans* (Sridhar et al., 2020).

Esta especie bacteriana es propicia a desarrollarse cuando existe presencia de residuos alimentarios en la cavidad bucal ya que metaboliza carbohidratos como la sacarosa para iniciar la formación de la biopelícula y como efecto produce ácido láctico, el cual degrada la superficie dental y acidifica el medio ambiente, su persistencia en la cavidad oral por tiempos prolongados puede provocar caries (García et al., 2017).

4.3 Generalidades de los enjuagues bucales

Nada puede reemplazar a la limpieza dental mecánica que se logra por medio de un cepillado dental, pero como uso complementario se recomiendan los enjuagues bucales, los cuales cuentan con diferentes fórmulas e ingredientes activos antimicrobianos. Aunque existen pocos reportes de efectos adversos, entre ellos se encuentran; irritación en mucosas, cambio de color en superficies dentales o lengua, sensación de ardor y resequedad en la boca (Okano et al., 1989; Pucher y Daniel., 1992; Wang et al., 2009; Tartaglia et al., 2019), por lo que se encuentra en aumento la búsqueda de alternativas de enjuagues bucales que contengan sustancias naturales con efectos antibacterianos contra bacterias causantes de enfermedades orales (Gunsolley, 2010; Kim y Nam, 2022).

De ahí es que se han desarrollado propuestas de enjuagues bucales con ingredientes activos naturales, ejemplo de ello el estudio realizado por Malvania y col. de un enjuague a base de raíces de regaliz, cuyos resultados son prometedores y plantearon la necesidad de llevar a cabo más investigaciones que demuestren la eficacia y los protocolos clínicos ideales que sustenten su uso en una formulación en gel o enjuague bucal (Malvania et al., 2019).

Los enjuagues bucales representan una manera eficiente de disminución en los recuentos de *Streptococcus mutans*, el cual es uno de los agentes principales en el proceso de la caries dental, cuando se comparan los componentes de estos enjuagues, se observa que todos presentan una clara disminución en el recuento de *S. mutans*, pero las reducciones son estadísticamente significativas en los que contienen clorhexidina considerada el “estándar de oro” de los antisépticos orales, o flúor en comparación con los enjuagues a base de hierbas (Puig-Silla et al., 2008; Sharma et al., 2018).

Los enjuagues bucales no solo son eficaces para la prevención o control de las enfermedades bucodentales, también eliminan el mal aliento; por lo que el interés de los consumidores de utilizar los enjuagues bucales se encuentra en un aumento gradual (Lee, 2011; Kim y Nam, 2022).

4.3.1 Clorhexidina

La clorhexidina es un antiséptico que se usa en diversas áreas de la medicina debido a su espectro de acción antibacteriana, su forma más utilizada es en digluconato (Lim y Kam, 2008; Coelho et al., 2017), tiene efectos bacteriostáticos y bactericidas reportados tanto en bacterias Gram positivas como negativas (Davies, 1973; Haydari et al., 2017).

Actuando como bacteriostático a concentraciones bajas y como bactericida en concentraciones altas, es más eficaz en pH alcalino que en ácido y su actividad se reduce en presencia de materia orgánica, para las esporas bacterianas es *esporostática*, pero no esporicida y tiene actividad antifúngica (Russell, 1986).

Entre todos los desinfectantes actuales es una de las opciones más favorables, ya que se ha reportado que es eficaz para la prevención y control de enfermedades infecciosas de la cavidad oral al eliminar bacterias presentes en saliva y lengua (McBain et al., 2003; Cheung et al., 2012).

Utilizado como complemento para la salud oral brinda beneficios en el área periodontal para la profilaxis y en procedimientos quirúrgicos orales como en implantología (Poppolo y Ouanounou, 2022).

Durante años los enjuagues bucales con clorhexidina han contenido alcohol, sin embargo, algunas marcas lo han eliminado de su formulación debido a los efectos negativos de este agente (Ennibi et al., 2013) y que a excepción de su uso como solvente

no aporta un mayor efecto al enjuague ya que se requeriría de una concentración del 50% al 70% para que pudiera ejercer efecto antiséptico (Schepman, 2001; Kulkarni et al., 2017).

Jayaprakash y col. en 2010 realizaron un estudio para comparar la eficacia de diferentes concentraciones de enjuagues bucales de clorhexidina en la reducción de *S. mutans* presentes en saliva, reportando que es capaz de reducir los conteos de *S. mutans* en saliva incluso desde concentraciones bajas como 0.02% y 0.06%, ayudando así a disminuir la aparición de efectos secundarios, entre los cuales se encuentran tinción extrínseca en órganos dentales, acumulación de cálculo dental, alteraciones en el gusto y efectos sobre la mucosa oral, los cuales se observan a redor de las 4 semanas continuas de uso (James et al., 2017).

La tinción extrínseca es el efecto secundario más común asociado a su uso, tal tinción es el resultado de una reacción de precipitación local entre la clorhexidina adherida a los dientes y los cromógenos que se encuentran en los alimentos y bebidas (Jones, 1997).

Existen reportes donde se demostró la toxicidad de la clorhexidina puede variar de acuerdo con la concentración y el tiempo de exposición (Escamilla-García, 2017), como ejemplo, reportes han sugerido efectos tóxicos en los fibroblastos gingivales cuando se utiliza en sitios quirúrgicos antes del cierre de la herida, lo cual afecta negativamente la cicatrización (Mariotti y Rumpf, 1999).

4.3.2 Fluoruro de sodio

Es el más simple de los compuestos de fluoruro y se encuentra en la mayoría de los productos de higiene oral, tiene un efecto bacteriostático (Gehring, 1983; Rajendiran et al., 2021) y se le considera un complemento eficaz de la limpieza mecánica (Perala y

Bhupathiraju, 2016), por eso durante muchos años ha sido utilizado principalmente como agente anticaries utilizado en la fluoración del agua, en pastas dentales y enjuagues bucales (Thurnheer y Belibasakis, 2018).

Es efectivo en el control de caries porque actúa de diferentes maneras, cuando está presente en el biofilm y en la saliva retrasa la desmineralización y promueve la remineralización de las lesiones incipientes del esmalte, también interfiere con la glucólisis, el cual es el proceso por el cual las bacterias cariogénicas metabolizan los azúcares y producen ácido, en concentraciones altas tiene acción bactericida (Hardwick et al., 1982; O'Mullane et al., 2016).

Su uso regular en niños bajo supervisión da como resultado una gran reducción de lesiones cariosas en dientes permanentes con pocos reportes en la literatura sobre sus posibles efectos adversos (Marinho et al., 2016), también ha demostrado efectividad en la prevención de erosión en pacientes de alto riesgo, al fortalecer la superficie del esmalte dental y evitar el desgaste erosivo de los dientes (Bejoy et al., 2020).

Incrementa la resistencia al ataque ácido de la estructura de la apatita del esmalte y tiene propiedades antibacterianas (Shah, 2016; Naumova et al., 2019).

El fluoruro es un agente eficaz y no invasivo para el tratamiento de la caries dental, por lo cual es comúnmente incorporado a las intervenciones de salud pública para reducir la prevalencia de caries dental por medio de la fluoración del agua y del uso de pasta, gel y enjuagues bucales con fluoruro (Muñoz-Millán et al., 2018; Shen et al., 2021).

Tratamientos que involucren fluoruro de sodio inhiben significativamente el crecimiento de biofilm de *S. mutans* en etapas tempranas de su formación, dando mejores resultados que al utilizarse en la etapa madura, al controlar el desarrollo de biofilm ayuda a prevenir la caries dental (Han, 2021).

En un estudio realizado por Parkinson y col. (2018) demostraron que un enjuague bucal con 220 ppm de fluoruro de sodio proporciona beneficios anticaries similares a los de una pasta dental con 1150 ppm y que el régimen combinado de pasta dental y enjuague bucal proporciona beneficios adicionales, aunque no significativos en cuanto a la remineralización de la lesión (Parkinson et al., 2018).

4.3.3 Xilitol

Es un polialcohol con propiedades que disminuyen los niveles de *S. mutans* en la placa dentobacteriana y la saliva, se puede utilizar como un agente de prevención de caries de aplicación autónoma (Janakiram et al., 2017).

Es un sustituto del azúcar con un dulzor similar al del azúcar de mesa, se produce comercialmente a partir de árboles de abedul y otras maderas que contienen xilano (Lynch y Milgrom, 2003; Aluckal y Ankola, 2018), cuando se hace esta sustitución en la dieta ofrece beneficios para la salud oral, como la reducción del riesgo de caries dental (Salli et al., 2019; Janket et al., 2019).

Se utiliza ampliamente en un gran número de productos sin azúcar, particularmente en chicles, pastillas (Arunakul et al., 2011), pastas dentales y enjuagues bucales, actúa de manera que previene la proliferación y el metabolismo de *S. mutans*, por lo tanto, disminuye sus conteos en la cavidad bucal (Köhler, 2007; Zajkani et al., 2018).

Entre los efectos adversos que puede producir esta sustancia se encuentran las aftas bucales, estreñimiento, flatulencias, heces blandas y diarrea (Riley et al., 2015), según lo informado en estudios estos efectos se asocian al consumo de grandes cantidades de xilitol (ElSalhy et al., 2012; Krupa et al., 2022).

Ha sido utilizado a gran escala por industrias alimentarias, médicas, farmacéuticas y dentales, además ha mostrado actividad contra biofilms en heridas (Ammons et al., 2011; Mota et al., 2015).

4.3.4 Cloruro de Cetilpiridinio

Es un compuesto de amonio cuaternario que consta de nitrógeno cuaternario conectado con una o más cadenas laterales hidrofóbicas (Gilbert y Moore, 2005; Mao et al., 2020), funciona como antiséptico, tiene una elevada afinidad por las bacterias Gram positivas como *S. mutans* (Ayad et al., 2011; Evans et al., 2015) y cuenta con una larga historia de uso seguro y efectivo al ser incluido en productos para el cuidado bucal (Haps et al., 2008, Sreenivasan et al., 2013).

Ha sido empleado como agente antiséptico en productos de higiene bucal durante los últimos 50 años (Witt et al., 2006; Rajendiran et al., 2021).

En comparación con otros ingredientes de enjuagues bucales como la povidona yodada y la clorhexidina, es insípido e inodoro por lo que tiene amplia variedad de aplicaciones en productos para el cuidado bucal (Seneviratne et al., 2021; Takeda et al., 2022).

El uso de productos en la cavidad oral que contienen cloruro de cetilpiridinio ayuda a prevenir enfermedades orales como caries dental, gingivitis y periodontitis ya que limita la formación de biofilm y la adhesión bacteriana en las superficies dentales (Ramalingam et al., 2012; So Yeon y Si Young, 2018).

Estudios clínicos respaldan la eficacia de reducir la formación de biofilm e inflamación gingival en una concentración de 0.075% al usarse durante 6 meses sin reportar efectos secundarios clínicos graves (Costa et al., 2013; Van Leeuwen et al., 2015; Miranda et al., 2020), por lo que el cloruro de cetilpiridinio puede ser adecuado para tratamientos de

mantenimiento de buena higiene oral a largo plazo (Tartaglia et al., 2017; LeBel et al., 2020).

4.4 Bicarbonato de sodio (NaHCO_3)

Es un compuesto químico común, versátil y de fácil obtención ya que es un artículo que usualmente se encuentra en la mayoría de los hogares, entre sus características se encuentran que es un material seguro y con un nivel de abrasión mínimo, además cuenta con propiedades bactericidas, a esto se le suma de la posibilidad de usarlo a largo plazo por ser prácticamente libre de efectos secundarios, lo que lo hace un material compatible con el ser humano (Madeswaran y Jayachandran, 2018). Su peso molecular es de 84.007 g/mol (Akanji et al., 2021).

Se ha hecho uso de sales como el bicarbonato y cloruro de sodio para profilaxis dental debido a su facilidad de adquisición y bajo costo, presentan características como alta solubilidad, baja agresividad y compatibilidad con el flúor, en altas concentraciones funciona como bactericida contra patógenos periodontales, como desventaja se encuentra su sabor salado y (Newbrun, 1997). Se considera un ingrediente seguro de utilizar en pastas dentales ya que tiene un potencial abrasivo relativamente bajo en relación con las estructuras dentales y una alta compatibilidad (Hara y Turssi, 2017).

El NaHCO_3 es de bajo precio por su abundancia, al utilizarse como ingrediente pastas dentales cuenta con propiedades antibacterianas hacia los microorganismos de la cavidad oral, además de ser efectivo en la remoción de la placa dental al aplicar fuerzas mecánicas con un cepillo dental (Myneni, 2017).

Puede revertir la caída en el pH de la placa dentobacteriana después del metabolismo del azúcar, por lo que entre más rápido se emplee mayor será su beneficio de prevenir la

disminución abrupta y sostenida del pH de la placa y la consecuente desmineralización, existen pastas dentales con este ingrediente que amortiguan los ácidos de la biopelícula (Zero, 2017).

En un estudio realizado *in vitro*, el NaHCO_3 previene el crecimiento bacteriano de *S. mutans*, los resultados obtenidos muestran que este compuesto tiene la capacidad de detener la proliferación de esta bacteria por lo que usar productos que lo contienen puede ser conveniente para las personas propensas a la caries dental (Silhacek y Taake, 2005).

Al utilizar un enjuague oral con NaHCO_3 , el pH salival incrementa en todos los casos por encima del nivel necesario para prevenir la desmineralización del esmalte y mejorar la remineralización, además de disminuir el número de unidades formadoras de colonia por mililitro de bacterias (UFC/mL), en particular *Streptococcus viridans* y especies de *Moraxella*, no se asocia a efectos secundarios y puede ser utilizado por personas que vivan en lugares remotos donde la disponibilidad de EBC es limitada o nula (Chandel et al., 2017).

En un estudio realizado en 2018 por Cabrera-Jaime et al., compararon el uso de un enjuague de NaHCO_3 contra otros dos para el tratamiento de mucositis oral en pacientes con cáncer, como resultado, los pacientes que utilizaron este enjuague tuvieron un menor tiempo de recuperación, este hallazgo, respalda el uso de productos alcalinos para el cuidado oral con enfoque terapéutico basado en evidencia, en ese caso para prevenir y tratar la mucositis (Cabrera-Jaime et al., 2018).

5. Métodos

Por ser un estudio *in vitro* todas las actividades se realizaron en el Laboratorio de Biotecnología Microbiana (LBM) del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud (CIDICS) de la UANL, siguiendo los lineamientos y códigos de investigación, de bioseguridad y de ética del centro de investigación.

5.1 Conservación y activación de material biológico

Los medios de cultivo utilizados y las condiciones de crecimiento de *Streptococcus mutans* UA130 (ATCC700611), se basaron en los procedimientos indicados por la American Type Culture Collection (ATCC). Se tomó un criotubo resguardado a -80 °C en ultracongelador que contiene una suspensión de *S. mutans*, medio de cultivo Trypticaseína de Soya (TS) y solución de criopreservación (solución salina de Cloruro de Sodio (NaCl) al 0.9% con 30% glicerol).

El procedimiento para activar la bacteria *S. mutans* se realizó en condiciones de asepsia en una Cabina de Bioseguridad Clase II (A2, Labconco, modelo Logic 3440801), con limpieza previa de alcohol al 70% junto con una gasa estéril, y expuesta 15 min a la luz UV para asegurar la esterilidad. Todas las soluciones, medios de cultivo y material requeridos fueron esterilizados previamente 15 min a 120 °C (All-American, Hillsville, USA). A continuación, se describen los pasos:

- a) *Activación*: a partir de un criotubo previamente descongelado (-80 °C, ultracongelador), se tomaron 100 µL de suspensión bacteriana de *S. mutans* UA130 para inocular 10 mL de caldo Infusión Cerebro Corazón (37 g/L, BD BACTO™) y ser incubado a 37 °C por 24 h.

b) Del inóculo obtenido en la activación, las células se concentraron por centrifugación a 4,000 rpm, 5 min (Eppendorf, modelo 5810-R) y se realizó un lavado con solución salina al 0.9% w/v de NaCl estéril, para eliminar residuos metabólicos del crecimiento. De la biomasa obtenida, se tomó una alícuota para sembrar por estría simple sobre 15-20 mL de agar TS (30 g/L de caldo TS BD BACTO™ y 15 g de agar base, BD Bioxon™) en cajas Petri, y con ayuda de un hisopo estéril. Se incubaron a 37 °C por 48 h.

Con el resto de la biomasa celular, se dispuso una parte en 20 mL de caldo Infusión Cerebro Corazón (ICC) (37 g/L, BD BACTO™) a una concentración conocida ($1.53 \times 10^8 \pm 0.18$ células/mL) en una Absorbancia con longitud de onda de 600nm (Abs600nm=0.2) en la escala de McFarland. Para los ensayos, se utilizó *S. mutans* en fase logarítmica de crecimiento (5 h). La masa celular restante se reservó para crio preservación.

5.2 Estandarización de la solución de bicarbonato de sodio

Al no existir evidencia clara de soluciones de NaHCO₃ y resultados concisos en la literatura, se procedió a realizar distintos ensayos independientes variando parámetros para asegurar una mejor disolución e impacto en la actividad biológica buscada. Entre ellos se incluye: preparación de soluciones madre en distintas concentraciones, tipo de agua (destilada o ultrapura Milli-Q), con/sin esterilización previa a su uso, filtración (membrana 0.2 µm PES, Nalgene filtro estéril para jeringa, Thermo Scientific), tiempo de agitación en el vórtex, con/sin calentamiento en placa de calentamiento (Barnstead Thermolyne Cimarec, modelo SP131320-33) (280 °C, 5 min), con/sin sonicación (temperatura a 40 °C o 20 °C, duración de 25 o 15 min).

Se utilizaron dos marcas de NaHCO_3 , uno de grado laboratorio (CTR) con datos de la ficha técnica descritos en la tabla I y el otro de Arm & Hammer (A&H, marca comercial).

Las condiciones óptimas y estandarizadas quedaron como sigue: una solución madre a concentración de 2.5 g/mL, pesando el NaHCO_3 en una báscula (A&D, modelo GR-200) y utilizando como base agua destilada estéril con agitación en vórtex (DLAB, modelo MXS) 2 min. Posteriormente se sonicó por 15 min, a 20 °C (Branson, modelo 5800, (Laboratorio de Infectología, torre de Alta especialidad y Medicina Avanzada (AEMA), Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”, Monterrey, N.L.) previo a pasar la solución por un filtro estéril para jeringa y separar los componentes sólidos no disueltos de NaHCO_3 . A partir de la solución madre, se utilizaron concentraciones de 10, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 450 y 500 mg/mL para los ensayos de actividad antimicrobiana.

Tabla I. Bicarbonato de sodio marca CTR (grado laboratorio).

Nombre	Bicarbonato de sodio
Fórmula	NaHCO_3
Solubilidad	210 g/l en agua a 20 °C
Peso molecular	84.007 g/mol
pH	11.5 (50g/L)
Apariencia	Sólido blanco
Punto de fusión	851 °C

5.3 Actividad antimicrobiana del bicarbonato de sodio

5.3.1 Método de Difusión en Disco

La susceptibilidad del patógeno *Streptococcus mutans* UA130, a desarrollarse en presencia de una sustancia activa (solución de NaHCO_3 y enjuagues bucales), se determinó utilizando la técnica de difusión en disco y siguiendo el método de Kirby-Bauer (Bauer et al., 1966), así como las Normas de rendimiento para las pruebas antimicrobianas de susceptibilidad al disco (CLSI, 2022). Dentro de la cabina de bioseguridad se vertieron 15 mL de agar TS (30 g/L del medio de cultivo BD BACTO™ y 15 g de agar base, BD Bioxon™) estéril en cajas Petri. Una vez solidificadas y expuestas a la Luz UV durante 15 min para asegurar la asepsia se sembraron con un hisopo estéril sobre la superficie del agar y con estría simple, 150 μL de *S. mutans* en fase logarítmica de crecimiento a una concentración de $1.53 \times 10^8 \pm 0.18$ Células/mL (Densidad Óptica_{600nm}=0.2 en la escala de McFarland). Se cerró con la tapa y se mantuvo por 15 min para iniciar la difusión del cultivo en el agar. A partir de la solución madre de 2.5 g/mL de NaHCO_3 (CTR y A&H) se realizaron diluciones seriadas con agua destilada estéril en tubos Eppendorf de 1.5 mL para obtener concentraciones de 10, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 450 y 500 mg/mL. Estas concentraciones expresadas en unidades molares equivalen a un rango de 0.119 mM a 5.95 mM.

Con la ayuda de una pinza de acero inoxidable, se tomó un disco de papel filtro (6 mm de diámetro) ambos estériles y se impregnó con 12 μL de la solución de NaHCO_3 para enseguida colocarse sobre el agar. Por cada caja Petri se colocaron 5 concentraciones distintas de NaHCO_3 y un disco adicional impregnado con agua destilada estéril como control de prueba negativo. Los EBC descritos en la tabla II fueron utilizados como controles de prueba positivo, en la tabla III se colocaron las fórmulas estructurales de los

compuestos activos presentes en los EBC y los preparados con NaHCO_3 . Cada caja Petri conteniendo los discos antes mencionados se mantuvieron en la Cabina de Bioseguridad durante 15 min para asegurar el inicio de la difusión del NaHCO_3 hacia el interior del agar.

Finalmente, las cajas fueron introducidas a la incubadora estática (Thermo Scientific, modelo Series 8000 WJ) con la tapa hacia arriba y se mantuvieron por 15 min antes de voltearlas (tapa hacia abajo) y mantenerlas por 48-72 horas a 37 °C. Los ensayos de cada caja Petri se realizaron por duplicado. Transcurrido el tiempo, se retiraron de la incubadora y se tomaron fotografías para evidenciar cualitativamente las áreas o halos de inhibición.

Mientras que el resultado *cuantitativo* se registró el diámetro en unidades de milímetros (mm) con la ayuda de un Vernier digital (Allnice). Si por alguna razón el disco se desplazó al invertir la caja en la incubadora, se realizaron dos medidas (largo/ancho) y se reportó el promedio. Se realizó una base de datos en Excel con el diámetro obtenido para cada concentración y tipo de NaHCO_3 , y de EBC, y se restó el diámetro del disco de papel filtro.

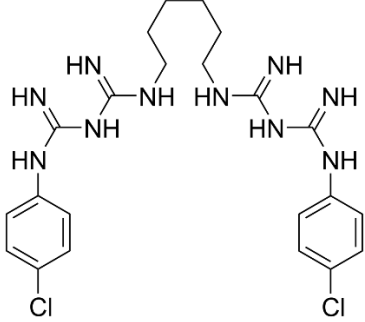
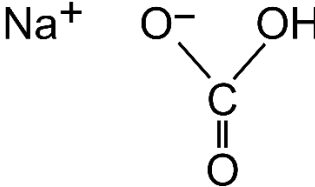
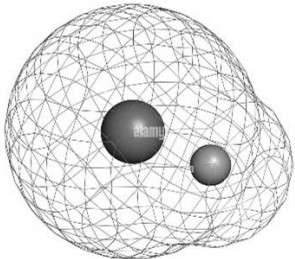
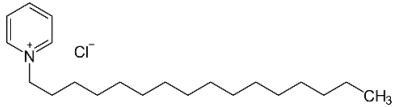
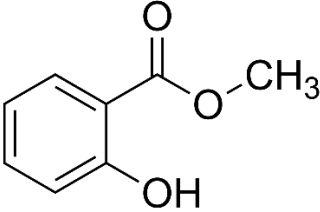
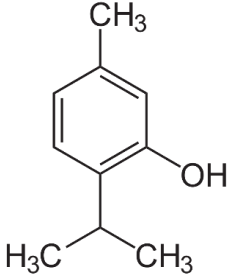
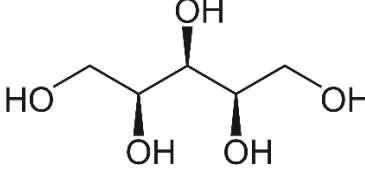
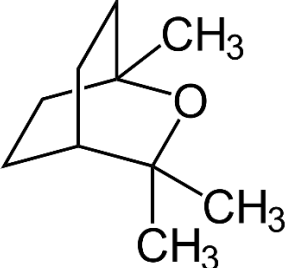
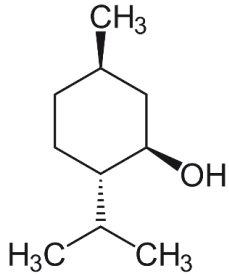
Los resultados de los halos o zonas de inhibición se reportaron como el valor promedio de las réplicas (mm) y desviación estándar SD (\pm), considerando un valor de significancia de $p < 0.05$.

Tabla II. Características generales de los EBC incluidos en el estudio como parte de los controles recomendados para la eliminación bacteriana: Colgate® Plax KIDS (Colgate®), Fluoxytil®, Listerine® Cool Mint Zero alcohol (Listerine®), Organic Fresh Tea Tree, Dental Kids PJ Masks (PJ Masks), TheraBreath® for Kids (TheraBreath®), Organic Fresh Carbón Activado, Perioxidín®. Especificaciones de ingredientes (sustancia activa y de formulación), recomendación de uso (edad).

Nombre de enjuague	Ingredientes activos y otros	Recomendación de uso	Modo de empleo
Colgate® Plax KIDS	Fluoruro de sodio 0.05% (225 ppm de flúor), Cloruro de cetilpiridinio 0.075% Agua, glicerina, propilenglicol, sorbitol, poloxámero 407, poloxámero 338, aroma/sabor, PEG 40 aceite de ricino hidrogenado, cloruro de cetilpiridinio, sorbato de potasio, fluoruro de sodio, sacarina sódica, ácido cítrico, azul ácido 3 (CI42051), dipenteno.	Mayores de 6 años	Enjuagar con 20 mL/30 s. <i>Frecuencia:</i> 2x/día.
Fluoxytil®	Xilitol, Fluoruro de sodio Agua, sacarina de sodio, propilenglicol, sorbato de potasio, aroma, metilparabeno sódico, ácido cítrico, EDTA disódico, CI 16185, CI 15985.	No especifica	Enjuagar con 10 mL/1-2 min. <i>Frecuencia:</i> 1x/día. No comer o beber en 15 min.
Listerine® Cool Mint Zero alcohol	Aceites esenciales (timol, eucaliptol, mentol, salicilato de metilo Agua, sorbitol, propilenglicol, laurilsulfato de sodio, polaxómero 407, ácido benzoico, benzoato de sodio, sacarina de sodio, sabor (d-limoneno), sucralosa, CI 42053.	No usar en niños menores de 6 años	De 6 a 12 años: Enjuagar con 10 mL/30 s. <i>Frecuencia:</i> mañana/noche sin diluir. Mayores de 12 años: 20 mL.
Organic Fresh Tea Tree	Xilitol, bicarbonato de sodio Agua, glicerina vegetal, sorbitol, lauril sarcosinato de sodio, polisorbato 80, aceite de coco (cocos nucifera), aceite esencial de árbol de té (melaleuca alternifolia), aceite esencial de manzanilla (chamaemelum nobile), mentol, glucósidos de steviol, ácido cítrico.	No especifica	Enjuagar con 20 mL/30 s. <i>Frecuencia:</i> Utilizarlo junto con rutina de limpieza dental.
Dental Kids PJ Masks	Fluoruro de sodio 0.05%, Cloruro de cetilpiridinio Agua purificada, sorbitol, PEG 40, sabor, metilparabeno de sodio, propilparabeno de sodio, alantoina, ácido cítrico, antioxidante, sacarina de sodio, CI 160035.	Niños menores de 2 años: consultar con odontólogo	Menores de 6 años: Enjuagar con 20 mL/30 s. sin diluir. Mayores de 6: 2x/día.
TheraBreath® for Kids	Fluoruro de sodio 0.05% (0.02% p/v iones de flúor) Agua, glicerina, benzonato de sodio, sabor (orgánico), xilitol, ácido cítrico, sucralosa, citrato de sodio.	Mayores de 6 años	Enjuagar con 10 mL/1 min. <i>Frecuencia:</i> 1x/ día. No escupir, no enjuagar, no comer en 30 min.

<p>Organic Fresh Carbón Activado</p>	<p>Xilitol, bicarbonato de sodio Agua, glicerina vegetal, sorbitol, lauril sarcosinato de sodio, sabor, polisorbato 80, aceite de coco (cocos nucifera), aceite esencial de árbol de té (melaleuca alternifolia), aceite esencial de manzanilla (chamaemelum nobile), mentol, glucósidos de steviol, carbón activado, ácido cítrico.</p>	<p>No especifica</p>	<p>Enjuagar con 20 mL/30s. <i>Frecuencia:</i> utilizarlo junto con rutina de limpieza dental.</p>
<p>Perioxidin®</p>	<p>Digluconato de Clorhexidina 0.12%, xilitol Agua, glicerina, propilenglicol, PEG 40 aceite de ricino hidrogenado, polaxómero 407, sacarina de sodio, acesulfamo de potasio, neohesperidina dihidrocalcona, salicilato de metilo, ácido láctico, mentol, sabor, limoneno, CI 16185, CI15985.</p>	<p>Adultos y mayores de 6 años</p>	<p>Realizar enjuague bucal después del cepillado con 15 mL/1 min sin diluir.</p>

Tabla III. Fórmulas estructurales de los compuestos activos presentes en los EBC y NaHCO_3 , utilizados en el estudio.

 <p>Gluconato de Clorhexidina</p>	 <p>Bicarbonato de sodio</p>	 <p>Fluoruro de sodio</p>
 <p>Cloruro de cetilpiridinio</p>	 <p>Salicilato de metilo</p>	 <p>Timol</p>
 <p>Xilitol</p>	 <p>Eucaliptol</p>	 <p>Mentol</p>

5.3.2 Concentración Mínima Inhibitoria y pH

Este ensayo es considerado el Estándar de Oro, siendo un soporte para conocer la concentración mínima de una sustancia con características antimicrobianas, a la que un microorganismo es sensible y se logra inhibir su proliferación (Andrews, 2001). Con ambas marcas de NaHCO_3 (CTR y A&H) se utilizaron tubos de ensayo (tapados con

torundas de algodón con gasa o taparrosca), estériles de 6 mL con 1 mL de volumen de trabajo y por triplicado para cada condición El contenido y distribución para cada tubo fue de la siguiente manera: (ver tabla IV).

Tabla IV. Distribución de contenidos de muestras para el ensayo de Concentración Mínima Inhibitoria

Muestra	Caldo ICC	<i>S. mutans</i> UA130	Otro
Control de Crecimiento	✓	✓	X
Control Negativo	X	✓	Solución NaCl (0.9%)
Experimentales	✓	✓	Solución de NaHCO ₃

Como se utilizó una solución madre de 2.5 g/mL, para las concentraciones de 10, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 450 y 500 mg/mL, se colocó en cada tubo la cantidad de 4, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200 μ L respectivamente, conservando así la proporción de la concentración, el inóculo se tomó en la fase logarítmica de crecimiento a una concentración de $1.53 \times 10^8 \pm 0.18$ Células/mL (Densidad Óptica_{600nm}=0.2 en la escala de McFarland) y se hicieron cálculos para determinar la cantidad de Caldo ICC que requeriría cada tubo y colocarlo antes del inóculo, al terminar se mezclaron los tubos en el vórtex por 2 s y se introdujeron en la incubadora durante 24 horas a 37 °C, al pasar el tiempo se sacaron los tubos, se les tomó fotografías para evidenciar cualitativamente la turbidez, y dentro de la cabina de bioseguridad se extrajeron 110 μ L de manera superficial (sin agitar) los cuales fueron posteriormente requeridos para el conteo de UFC y la tinción de Gram, una vez hecho esto se realizó la medición de la absorbancia por medio de un espectrofotómetro (BIO RAD, modelo SmartSpec Plus), posteriormente se midió el pH con un potenciómetro (Apera Instruments, modelo pH/Conductivity Meter PC820), también se realizó el ensayo de MIC con los EBC, con la diferencia que se colocaron 100

μL de los EBC sin realizar diluciones (tal como se indica en las instrucciones de uso por sus fabricantes), el inóculo se tomó en la fase logarítmica de crecimiento a una concentración de $1.53 \times 10^8 \pm 0.18$ Células/mL (Densidad Óptica_{600nm}=0.2 en la escala de McFarland), todos los datos obtenidos se colocaron en hojas de Excel y se obtuvieron los valores promedios y la desviación estándar SD (\pm).

5.4 Actividad bactericida y bacteriostática

Para este experimento se resembraron los cultivos provenientes de cada solución a diferentes concentraciones usadas en la MIC, sobre agar de TS (30 g/L del medio de cultivo BD BACTO™ y 15 g de agar base, BD Bioxon™), en Cajas Petri para identificar si las soluciones de NaHCO_3 manifestaban Unidades Formadoras de Colonia (UFC).

Primero se realizaron diluciones seriadas con agua destilada de las muestras obtenidas previamente de la MIC, se realizaron 2 experimentos individuales por cada marca de NaHCO_3 para encontrar las diluciones que se tenían que hacer, las diluciones podían variar de 1×10^4 a 1×10^6 según la concentración del NaHCO_3 , dependiendo de resultados previos, todo esto por triplicado.

Una vez solidificado el agar de las cajas Petri, se dispusieron 100 μL de las diluciones, mismo volumen que fue sembrado por estría cerrada con un hisopo estéril (1 por caja). Al terminar se esperó 15 min para luego invertirse las cajas y se dejaron en la incubadora a 37 °C por 48 horas.

Se realizó el mismo procedimiento para los EBC por triplicado, en los cuales se utilizaron los tubos de la MIC con dilución de 1:10,000 y 1:100,000 en los de Fluoxetyl®, Organic Fresh (Tea Tree y carbón) y TheraBreath®. 1:100 en los de Listerine® y sembrado directo del tubo (1:1) en Colgate®, PJ Masks y Peroxidín®.

Una vez pasado el tiempo se sacaron las cajas Petri de la incubadora, se tomaron fotografías y se contaron las UFC con ayuda de un marcador permanente, en casos donde estas colonias eran muy pequeñas se utilizó un contador de colonias EASI-GRID™ (Jencons). Con los datos obtenidos se sacó promedio y desviación estándar SD (\pm).

5.5 Tinción de Gram

Se realizó con las muestras obtenidas por los tubos de los ensayos de MIC, para ello se tomaron 3 concentraciones de NaHCO₃ representativas de ambas marcas (50, 250, 500 mg/mL), las muestras de todos los EBC y del control de crecimiento.

Cerca de una llama y con una pipeta estéril se tomaron 30 μ L previamente mezclados dentro del tubo Eppendorf y se colocó sobre un portaobjetos, luego se hizo movimiento de barrido y se fijó al pasarlo por el fuego, una vez fijado se realizó el proceso de la tinción de Gram, colocando los líquidos (BD BBL™) y retirándolos con agua destilada, en el siguiente orden: cristal violeta por 1 min; iodine por 1 min; decolorante por 15 s y por último safranina por 1 min antes de enjuagar y dejar secar, una vez completamente seco se le colocaron dos gotas de un medio de montaje rápido (entellán) y encima el cubreobjetos, cuidando que no quedaran burbujas de aire.

5.5.1 Diferenciación morfológica

Para visualizar las tinciones se utilizó un microscopio invertido Axio Observer con la técnica Bright-Field con el objetivo Plan-Apochromat 100x/1.40 Oil (Carl Zeiss) y para las fotografías se tomaron 5 campos aleatorios de cada laminilla.

5.6 Análisis semicuantitativo del efecto de los diferentes enjuagues sobre el crecimiento bacteriano por medio de Microscopia confocal de fluorescencia (intensidad de fluorescencia).

Después del periodo de incubación de la MIC (18 – 24 h en incubadora) dentro de la cabina de seguridad se homogenizaron los cultivos líquidos en el vórtex por 5 s, se tomaron muestras de 2 μ L de cada uno y se colocaron sobre portaobjetos añadiendo 2 μ L de DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) cubriéndolos con el cubreobjetos. De cada tubo se sacaron 3 muestras, las cuales se analizaron por medio de microscopia confocal monofotónica en el microscopio Axio Observer con el objetivo Plan-Apochromat 100x/1.40 Oil y un láser de 405nm (Carl Zeiss). Sobre el campo de visión se eligieron de manera aleatoria 5 áreas, las cuales se documentaron. De la imagen confocal resultante de cada área seleccionada se obtuvo la intensidad de fluorescencia para posteriormente efectuar el análisis estadístico de esta última.

5.7 Análisis estadístico

Los datos obtenidos en los experimentos se vaciaron en hojas de datos de Microsoft Excel donde se obtuvieron medias y desviaciones estándar (SD). Para el análisis estadístico se usó el programa R versión 4.2.1., y los paquetes tidyverse (versión 2.0.0), ggplot2 (versión 3.4.2), y dplyr (versión 1.1.1).

6. Resultados

6.1 Estandarización

De acuerdo con los objetivos establecidos en este proyecto, se inició con una estandarización en la preparación de la solución de NaHCO_3 , para enseguida evaluar la actividad antimicrobiana en el desarrollo del patógeno cariogénico *S. mutans* UA130. Se procedió como sigue:

- Después de distintos ensayos individuales variando la cantidad de NaHCO_3 en agua, se optó por realizar una solución madre a concentración de 2.5 g/mL utilizando como base agua destilada estéril. La mezcla contenida en un tubo falcon de 15 mL estéril, se cubrió con papel parafilm y se pasó por el vórtex 2 min, antes de sonicarse por 15 min, a 20 °C. A partir de este punto, se realizaron los ensayos de actividad antimicrobiana en concentraciones de 10, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 450 y 500 mg/mL (equivalente a un rango de 0.119 mM a 5.95 mM).

6.2 Actividad antimicrobiana

6.2.1 Susceptibilidad en Disco

Los halos formados e identificados como zona de inhibición (mm), fueron determinados en cultivo de Agar de TS utilizando cajas Petri por el método de Kirby-Bauer. En particular *S. mutans* no mostró susceptibilidad a la presencia de NaHCO_3 (*datos no mostrados*). Este resultado fue independiente a la concentración y a las marcas de NaHCO_3 , Figura 1.

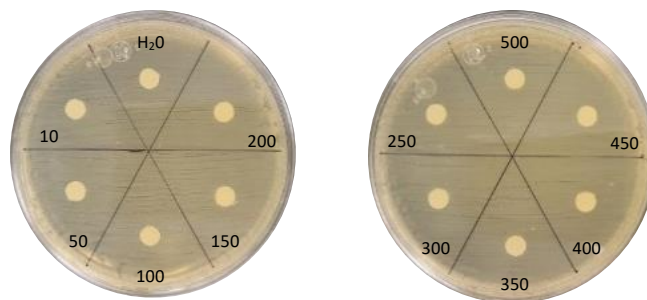


Figura 1. Imágenes representativas de la ausencia de halos de inhibición a la presencia de NaHCO_3 en concentraciones de 10-500 (mg/mL) de las marcas CTR y A&H. Se utilizó como control negativo agua destilada estéril (H_2O).

En la Tabla V se muestra la susceptibilidad representativa de *S. mutans* a los distintos EBC utilizados en este proyecto. Cabe recordar que cada enjuague fue añadido de forma directa al disco de papel filtro, y conforme a las indicaciones de uso del fabricante. El resultado mostrado en la tabla es la medida promedio con su desviación estándar ($\text{SD} \pm$) eliminando el diámetro del disco (6 mm).

El EBC al que fue más susceptible *S. mutans* fue Perioxidin[®] ($7.11 \text{ mm} \pm 0.21$), seguido de Colgate[®] ($6.38 \text{ mm} \pm 0.72$), PJ Masks ($5.98 \text{ mm} \pm 0.04$) y Listerine[®] ($2.28 \text{ mm} \pm 0.16$). En el caso de las marcas Organic Fresh (Tea Tree y Carbón), solo se formó una leve marca con forma de anillo en la periferia del disco, lo cual se toma como resultado negativo (0mm). En TheraBreath[®] y Fluoxytil[®] *S. mutans* no presentó sensibilidad a su presencia, es decir no hubo formación de halo de inhibición (0 mm).

6.2.2 Ensayo de Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)

Para conocer si el NaHCO_3 tiene la capacidad de inhibir la actividad de desarrollo de *S. mutans*, se realizó el ensayo de MIC, utilizando el mismo rango de concentraciones establecidas en la estandarización (10 - 500 mg/mL). El cultivo de *S. mutans* UA130 para este ensayo, se tomó en la fase logarítmica de crecimiento a una concentración de $1.53 \times 10^8 \pm 0.18$ células/mL (Densidad Óptica_{600nm}=0.2 en la escala de McFarland).

El NaHCO_3 marca CTR es de grado laboratorio y es con el que se obtuvo resultados más favorecedores, alcanzando porcentajes de reducción celular relevantes. De forma cualitativa, para la marca CTR a partir de 250 mg/mL se observa una disminución evidente en la turbidez (Figura 2). Mientras que con la marca comercial A&H, a partir de 150 mg/mL, sin embargo, ésta es menos traslucida en comparación con el ensayo de NaHCO_3 de CTR (Figura 3).

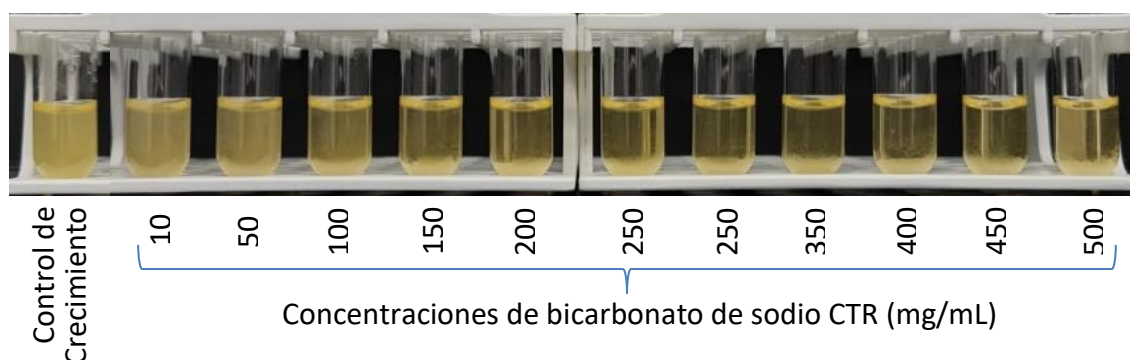


Figura 2. Representación cualitativa de la MIC de NaHCO_3 , marca CTR, donde se muestran el control de crecimiento (cultivo de *S. mutans*) y las concentraciones utilizadas de 10 a 500 mg/mL.

En ambas marcas de NaHCO_3 se observa una disminución en la turbidez proporcional al incremento en la concentración con respecto al control de crecimiento de *S. mutans*. (Figura 2 y Figura 3).

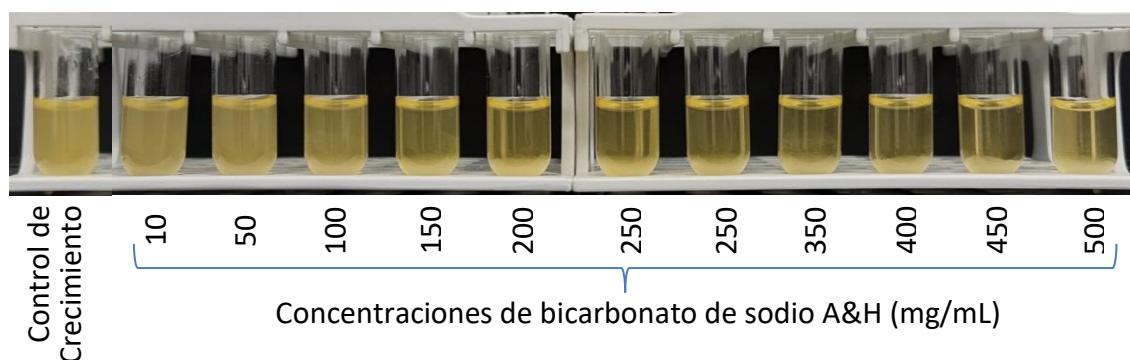


Figura 3. Representación cualitativa de la MIC de NaHCO_3 , marca A&H, donde se muestran el control de crecimiento (cultivo de *S. mutans*) y las concentraciones utilizadas de 10 a 500 mg/mL.

De forma cuantitativa, para ambas marcas de NaHCO_3 (A&H y CTR) hubo una inhibición en el crecimiento microbiano evidente a partir de 100 mg/mL, en el cual la marca comercial (A&H) mostró una reducción celular del 35% con una SD (\pm) de 0.47.

Mientras que el de CTR (grado laboratorio) del 56% \pm 0.31. La MIC para la marca CTR fue de 250 mg/mL, mientras que para la marca A&H fue de 300 mg/mL, con una reducción celular o inhibición bacteriana de 80.45% \pm 0.43 y 74.41% \pm 0.70, respectivamente (Figura 4).

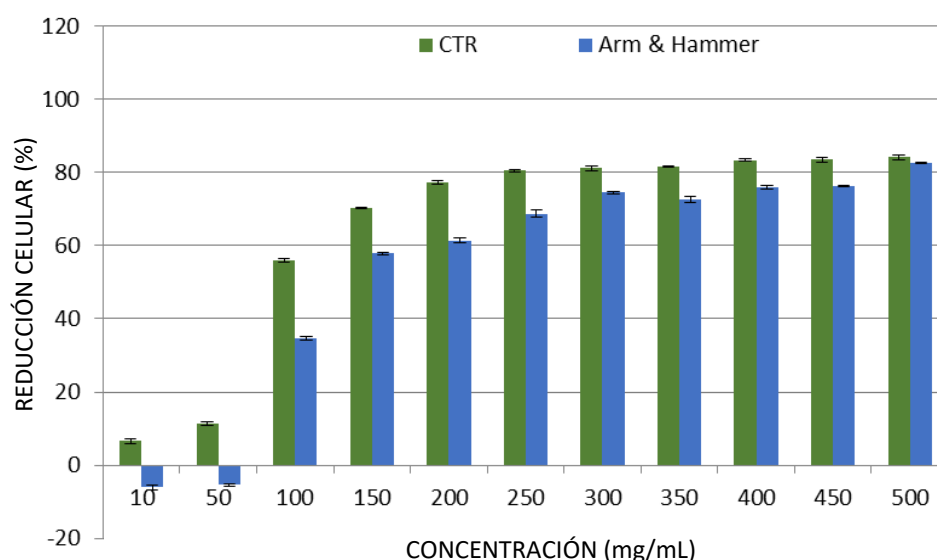


Figura 4. Reducción celular basada en la MIC de NaHCO_3 con concentraciones utilizadas de 10 a 500 mg/mL de las marcas CTR y A&H.

A concentraciones de entre 250 a 500 mg/mL de NaHCO_3 CTR el promedio en la reducción celular de *S. mutans* se mantuvo alrededor de 82.34% \pm 1.48, mientras que con la marca A&H fue de 73.53% \pm 3.06 en el rango de 250 a 450 mg/mL. Ambas marcas, en su máxima concentración (500 mg/mL) tuvieron una reducción celular similar que oscila entre 84% \pm 0.70 con la marca CTR y de 83% \pm 0.65 con A&H (Figura 4).

Respecto a los 8 EBC evaluados en tanto que controles positivos, todos presentaron actividad antimicrobiana frente al crecimiento de *S. mutans*, tal y como se muestra en la Figura 5.

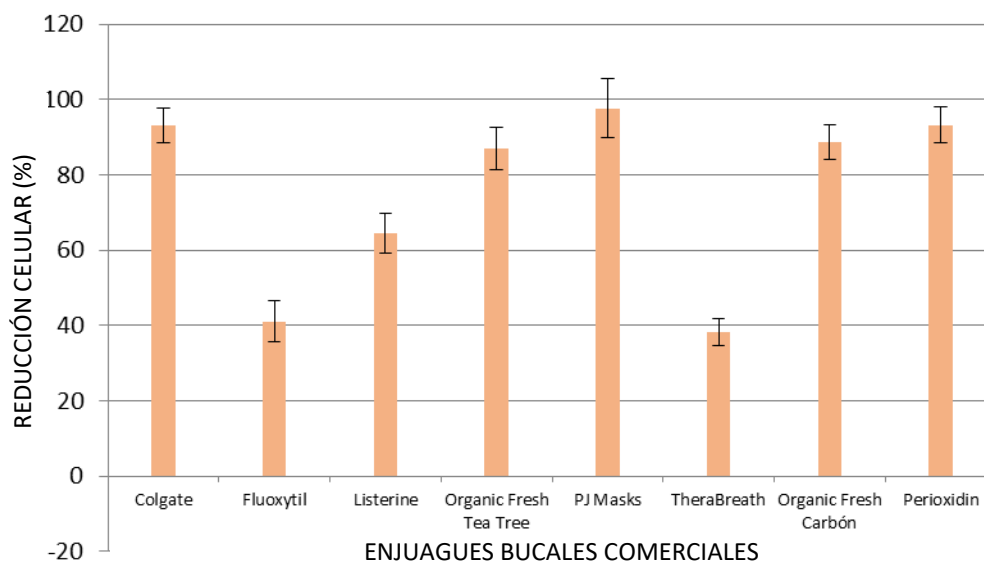


Figura 5. Reducción celular de la bacteria *S. mutans* (%) en presencia de distintos EBC utilizados como control positivo en el ensayo de MIC.

De forma cualitativa los EBC que presentaron menor turbidez fueron Peroxidín[®], Colgate[®] y PJ Masks, seguidos de Listerine[®] y ambas de presentaciones de Organic Fresh (Tea Tree y Carbón), por último, los que se veían más turbios eran Fluoxetyl[®] y TheraBreath[®] (Figura 6).

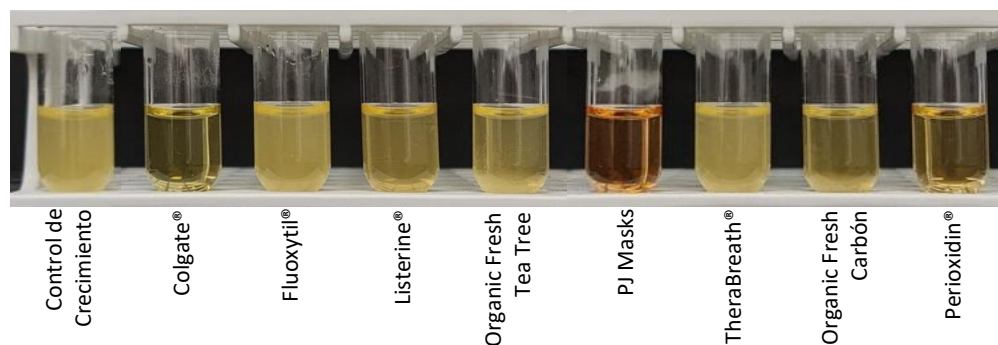


Figura 6. Representación cualitativa de la MIC de los EBC, donde se muestran los tubos que contienen el control de crecimiento (cultivo de *S. mutans*) y los EBC de las marcas Colgate[®], Fluoxetyl[®], Listerine[®], Organic Fresh Tea Tree, PJ Masks, TheraBreath[®], Organic Fresh Carbón, Peroxidín[®].

Los EBC que tuvieron una mayor reducción celular fueron PJ Masks con $97.7\% \pm 7.77$, Peroxidín[®] y Colgate[®] con $93.3\% \pm 4.83$ y $93\% \pm 4.64$ respectivamente, tal y como se muestra en la Figura 6. Organic Fresh en su presentación de Carbón alcanzó el $88.6\% \pm 4.69$ así como $87\% \pm 5.60$ en la de Tea Tree.

Mientras que los EBC de Listerine[®], Fluoxetyl[®] y TheraBreath[®] redujeron la población celular de *S. mutans* en un $64.4\% \pm 5.38$, $41\% \pm 5.55$ y $38\% \pm 3.58$, respectivamente (Figura 6).

6.2.3 Estadísticos descriptivos de los conteos celulares de *S. mutans* UA130 por tipo de tratamiento.

En el estadístico descriptivo del conteo celular por mililitro (CC) de *S. mutans* (expresado en porcentaje) por tipo de enjuague, se observó en la figura 7.A de caja a la variable dicotómica “Bicarbonato” responder a la pregunta *¿el tratamiento implicó una solución que contuviera bicarbonato de sodio?* Se observó que los EBC (caja con la etiqueta “No”) tienen la media (la línea negra) un poco debajo del 0.2 (es decir, sólo se conservó el 20 % del valor CC para esa corrida), mientras que la media de las soluciones de NaHCO₃ está casi en 0.3 (30%). Los valores atípicos en las soluciones de NaHCO₃ estuvieron casi todos por encima del 0.9 (el conteo celular fue el 90% o más). Sin embargo, la media de las soluciones de bicarbonato queda dentro del rango intercuartiles de los EBC.

Al considerar la variable “*Tipo de solución*” que distingue entre los dos tipos de solución de NaHCO₃ de las marcas CTR y A&H, percibió que todos los valores atípicos están en el Bicarbonato 1 (CTR). Mientras que la solución de Bicarbonato 2 (A&H) fue menos sensible a los cambios de concentración (figura 7.B).

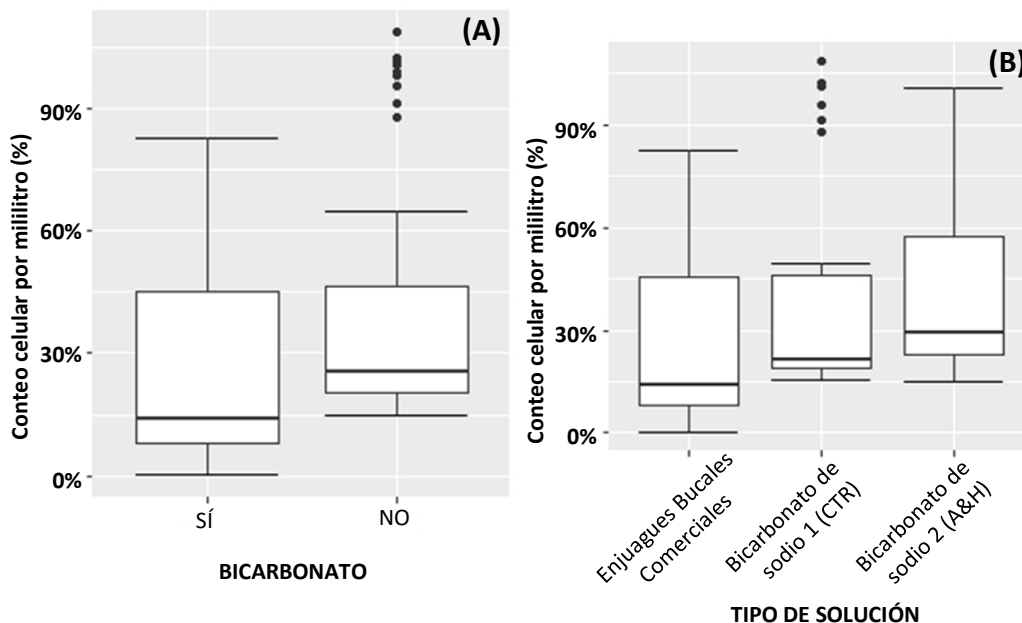


Figura 7. Estadísticos descriptivos representados en gráfica de caja, de los conteos celulares por mililitro (expresado en %) de la bacteria cariogénica *S. mutans UA130* por Tipo de Tratamiento conteniendo o no NaHCO_3 (A), y Tipo de Solución (B): EBC, NaHCO_3 CTR y NaHCO_3 A&H.

En cuanto a los EBC, PJ Masks es claramente el mejor (2.7%), seguido de Peroxidín® (7.5%), Colgate® (7.9%), Organic Fresh Carbón (13%), Organic Fresh Tea Tree (14.4%), Listerine® (39.1%), Fluoxytíl® (67.3%), y finalmente TheraBreath® (69.2%).

Finalmente, se puede observar que las concentraciones de las soluciones de NaHCO_3 muestran una tendencia muy clara, especialmente a partir de 250 mg/mL mientras que los EBC tuvieron rendimientos diversos (figura 8). Dicha distribución es exponencial al considerar la dilución o concentración. Al realizar un análisis de ANOVA de 1 y 2 colas, se detectaron diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, el tamaño del Error cuadrático medio (Mean Squarer Error: función de riesgo, correspondiente al valor esperado de la pérdida del error al cuadrado), denuncia que las diferencias en el efecto debidas a las dos soluciones de NaHCO_3 (CTR y A&H), son pequeñas.

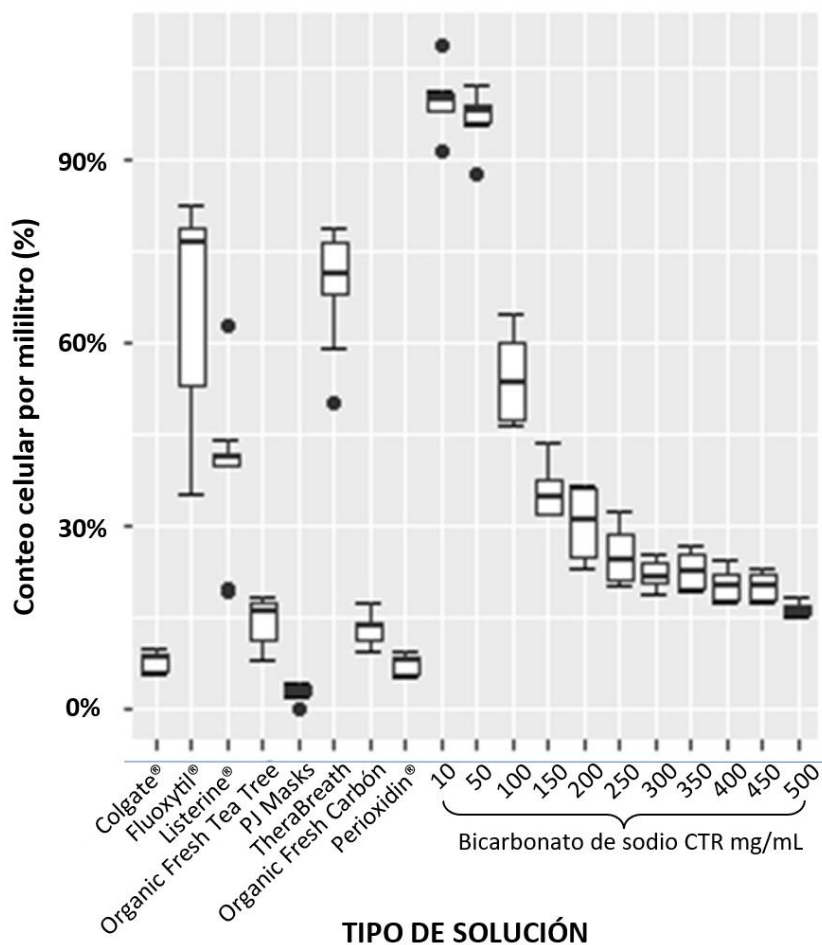





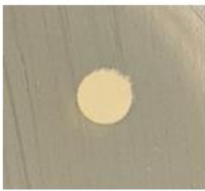

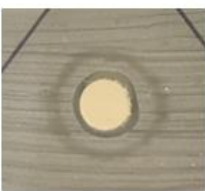

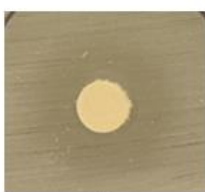
Figura 8. Estadísticos descriptivos representados en gráfica de caja, de los conteos celulares de la bacteria cariogénica *S. mutans UA130* por Tipo de EBC y soluciones de NaHCO_3 (CTR) a diferentes concentraciones.


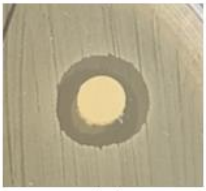

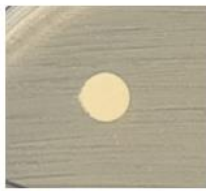

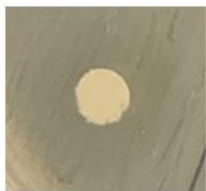

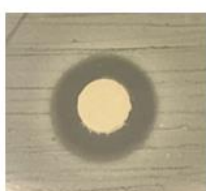
6.2.4 Actividad bactericida y bacteriostática

El procedimiento para saber si una solución tiene capacidad Bactericida (matar o destruir las bacterias en crecimiento) o Bacteriostática (detener o inhibir el crecimiento bacteriano y su multiplicación), es resemebrando los cultivos provenientes de cada concentración usada en la MIC, sobre agar en Cajas Petri. De manifestarse un desarrollo de Unidades Formadoras de Colonia (UFC) significa que la solución que contiene el principio activo de interés (NaHCO_3 o EBC), tiene una actividad Bacteriostática, de lo contrario, si hay ausencia de colonias, la actividad es Bactericida.

Conforme a la MIC de los EBC, los que no desarrollaron UFC sobre el agar (0 UFC/mL) fueron Perioxidín[®], Colgate[®] y PJ Masks; es decir su actividad es bactericida, *ver* Tabla V. Los que si desarrollaron UFC fueron Listerine[®] (3.36×10^3 UFC/mL \pm 0.55), Organic Fresh en sus presentaciones de Carbón (4.98×10^5 UFC/mL \pm 0.65) y Tea Tree (5.4×10^5 UFC/mL \pm 1.34), TheraBreath[®] (2.68×10^7 UFC/mL \pm 0.79) y Fluoxetyl[®] (2.53×10^7 UFC/mL \pm 0.46). *ver* tabla V.

Tabla V. Desarrollo promedio de Unidades Formadoras de Colonia (expresado en UFC/mL) de EBC y medidas de halo de inhibición por método Kirby-Bauer con imagen representativa.

Marca de EBC	Promedio de UFC/mL	Desarrollo de colonias y dilución	Diámetro de halo de inhibición (mm) sin contar disco de papel filtro (6mm)	Halo de inhibición y dilución
Colgate®	0	 1:1	6.38 ± 0.72	 1:1
Fluoxetil®	$2.53 \times 10^7 \pm 0.46$	 1:100,000	0	 1:1
Listerine®	$3.36 \times 10^3 \pm 0.55$	 1:100	2.28 ± 0.16	 1:1
Organic Fresh Tea Tree	$5.4 \times 10^5 \pm 1.34$	 1:100,000	0	 1:1







PJ Masks	0	 1:1	5.98 ± 0.04	 1:1
TheraBreath®	$2.68 \times 10^7 \pm 0.79$	 1:100,000	0	 1:1
Organic Fresh Carbón	$4.98 \times 10^5 \pm 0.65$	 1:100,000	0	 1:1
Peroxidin®	0	 1:1	7.11 ± 0.21	 1:1






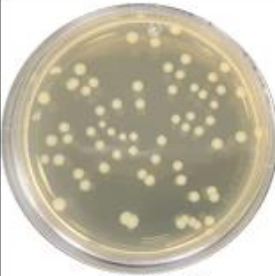




Al realizarse lo anterior con las soluciones de NaHCO_3 e independiente a la marca, hubo desarrollo de UFC/mL en sobre el agar de TS de las cajas Petri. En ambos casos, hubo una disminución de las UFC/mL a mayor concentración de la solución con NaHCO_3 .

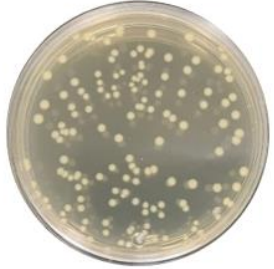





A una concentración mínima de 10 mg/mL de la marca CTR, se desarrolló 6.57×10^7 UFC/mL ± 1.29) y con la marca A&H 7.71×10^7 UFC/mL ± 0.28 . Mientras que a la

concentración mayor (500 mg/mL) hubo un menor desarrollo de UFC/mL tanto con la marca CTR ($0.21 \times 10^7 \pm 0.072$) como A&H ($0.41 \times 10^7 \pm 0.065$), el NaHCO_3 de CTR mostró un menor desarrollo de UFC respecto al de A&H. Ver tabla VI.

Tabla VI. Comparación cuantitativa y cualitativa del desarrollo promedio de Unidades Formadoras de Colonia (expresado en UFC/mL) entre el NaHCO_3 de la marca CTR y A&H, en un rango de concentraciones de 10 a 500 mg/mL.

Concentración (mg/mL)	Bicarbonato de sodio – CTR		Bicarbonato de sodio – A&H	
	Promedio de UFC/mL	Desarrollo de colonias y dilución	Promedio de UFC/mL	Desarrollo de colonias y dilución
500	$0.21 \times 10^7 \pm 0.072$	 1:100,000	$0.41 \times 10^7 \pm 0.065$	 1:100,000
450	$4.38 \times 10^6 \pm 0.79$	 1:100,000	$4 \times 10^6 \pm 1.53$	 1:100,000
400	$3.07 \times 10^6 \pm 1.37$	 1:100,000	$5.4 \times 10^6 \pm 1.08$	 1:100,000

350	$7.48 \times 10^6 \pm 2.65$	 1:100,000	$6.71 \times 10^6 \pm 0.72$	 1:100,000
300	$3.3 \times 10^6 \pm 0.22$	 1:100,000	$5.94 \times 10^6 \pm 1.62$	 1:100,000
250	$7.58 \times 10^6 \pm 0.91$	 1:100,000	$8.98 \times 10^6 \pm 2.2$	 1:100,000
200	$1.48 \times 10^7 \pm 0.25$	 1:100,000	$1.61 \times 10^7 \pm 0.53$	 1:100,000
150	$1.63 \times 10^7 \pm 0.10$	 1:100,000	$1.84 \times 10^7 \pm 0.5$	 1:100,000

100	$2.63 \times 10^7 \pm 0.49$	 1:100,000	$4.84 \times 10^7 \pm 1.08$	 1:100,000
50	$5.97 \times 10^7 \pm 8.55$	 1:100,000	$6.21 \times 10^7 \pm 1.17$	 1:100,000
10	$6.57 \times 10^7 \pm 1.29$	 1:100,000	$7.71 \times 10^7 \pm 0.03$	 1:100,000

6.3 pH

El pH promedio de un cultivo normal de *S. mutans* es de 5.5 ± 0.15 , valor que denota el uso de glucosa contenido en el medio de cultivo, como fuente de carbono y misma que es transformada en compuestos ácidos, de ahí el grado de acidez predominante. En ambas marcas de NaHCO_3 (CTR y A&H), la adición de concentraciones ≥ 50 mg/mL al cultivo de *S. mutans*, mantuvo un nivel alcalino de pH, es decir ≥ 7 .

A mayor concentración de las soluciones de NaHCO_3 , el pH fue elevándose de forma proporcional y exponencial, llegando hasta un valor máximo de 9.9 ± 0.05 con la marca CTR y de 9.8 ± 0.04 con A&H, tal y como se observa en la Figura 9. La concentración más baja de NaHCO_3 (10 mg/L) mantuvo un pH muy cercano al neutro $\text{pH } 6.06 \pm 0.01$ (CTR) y de 5.98 ± 0.06 (A&H) respectivamente.

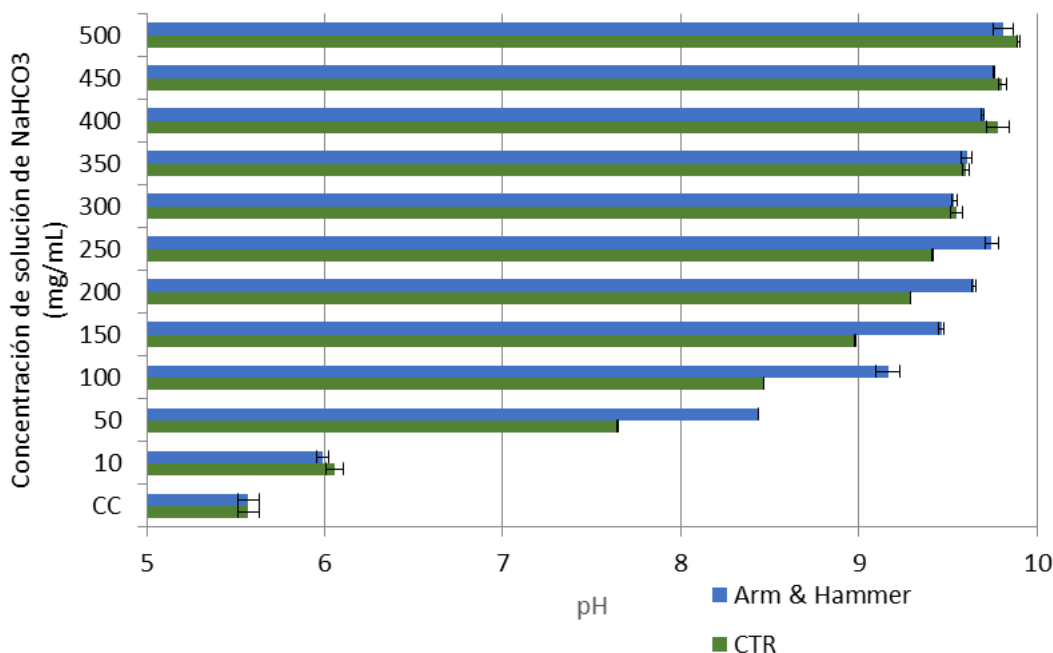


Figura 9. Valores de pH de la MIC de *S. mutans* con soluciones de NaHCO_3 marcas A&H y CTR en un rango de concentraciones de 10 a 500 mg/mL. Los valores fueron medidos después de transcurrir 18-24 horas a 37 °C.

En la Figura 10, se pueden apreciar el pH y su desviación estándar alcanzado con cada uno de los distintos EBC utilizados en el estudio. De forma global, los EBC que alcanzaron un pH ligeramente alcalino en presencia de *S. mutans* fueron Colgate® (7.3 ± 0.08), Peroxidín® (7.3 ± 0.06) y PJ Masks (7.2 ± 0.03). El resto de los 5 EBC presentaron un nivel más ácido, siendo TheraBreath® (5.3 ± 0.03) y Fluoxytil® (5.5 ± 0.05) los que tuvieron los valores más bajos.

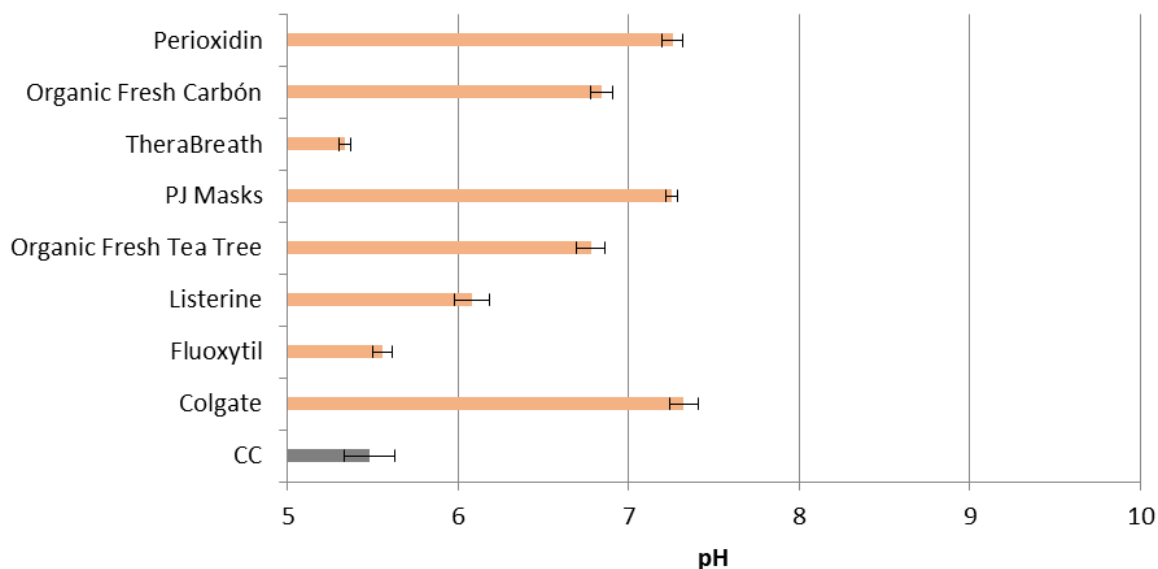


Figura 10. Valores de pH de la MIC de *S. mutans* con EBC. El pH fue medido después de transcurrir 18-24 horas a 37 °C.

6.4 Diferenciación morfológica

Además de las UFC/mL de *S. mutans* UA130 identificadas, cuantificadas y reportadas con anterioridad provenientes de la MIC, se recurrió a una segunda técnica *cualitativa* de diferenciación morfológica de la bacteria de interés, utilizando la técnica de tinción diferencial de Gram (imagen del control de crecimiento, Figura 11). Se establecieron 50, 250 y 500 mg/mL de NaHCO₃ de ambas marcas (CTR y A&H) como concentraciones representativas. En todas las laminillas se observó la presencia de cocos de *S. mutans*, y en ambas marcas se apreció una disminución en la cantidad de la bacteria a mayor concentración de la solución de NaHCO₃, siendo las concentraciones de 50 mg/mL las que presentaron mayor cantidad y las de 500 mg/mL un menor número.

En cuanto a marcas se refiere, en las muestras que contenían NaHCO₃ de CTR se observaron menos bacterias, con respecto a las de A&H (Figura 12).

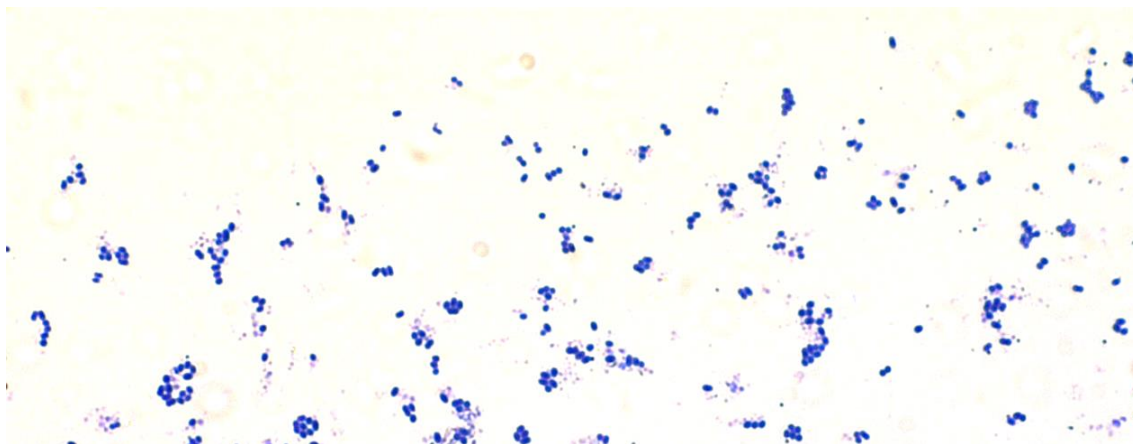


Figura 11. Imagen representativa de la morfología de *S. mutans* UA130 (Gram+) tomada de un cultivo puro (Control de Crecimiento), y realizada por la técnica de Tinción diferencial de Gram. Uso de microscopía invertida Axio Observer, Objetivo: Plan-Apochromat 100x/1.40 Oil.

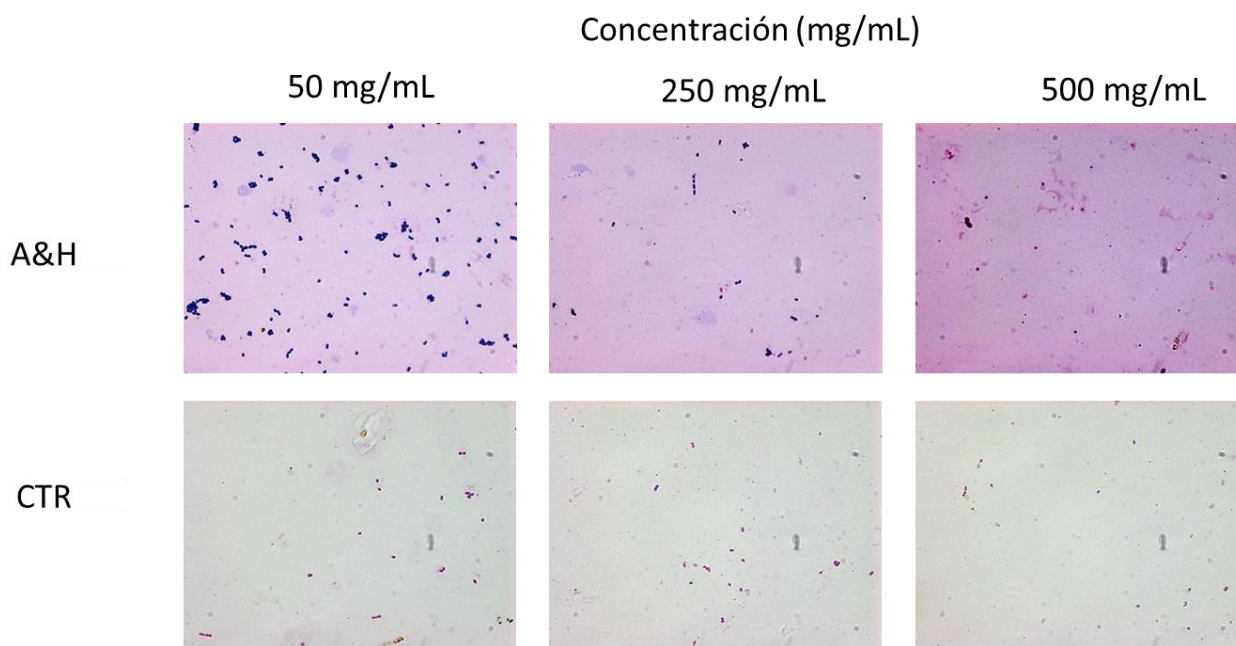


Figura 12. Diferencia cualitativa de *S. mutans* UA130 al término del ensayo de la MIC a 50, 250 y 500 mg/mL de NaHCO₃ marca A&H y CTR. Técnica de Tinción diferencial de Gram. Uso de microscopía invertida Axio Observer, Objetivo: Plan-Apochromat 100x/1.40 Oil.

En las tinciones de Gram realizadas a partir de la MIC de los EBC también se observó la presencia de *S. mutans*, pero en una cantidad inferior con respecto al control de crecimiento (Figura 13).

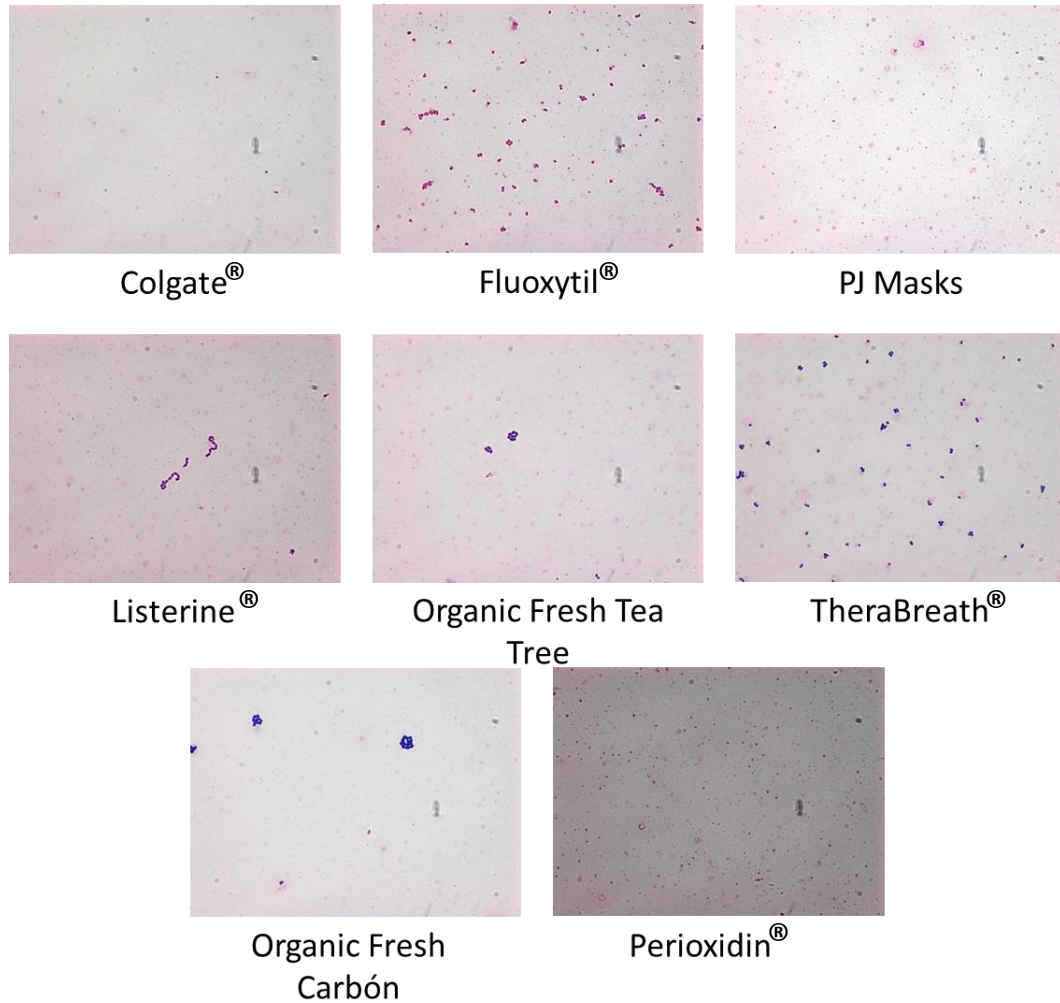


Figura 13. Diferencia cualitativa de *S. mutans UA130* al término del ensayo de la MIC entre los distintos EBC utilizados en el estudio. Técnica de Tinción diferencial de Gram. Uso de microscopía invertida Axio Observer, Objetivo: Plan-Apochromat 100x/1.40 Oil.

6.5 Análisis semicuantitativo del efecto de los diferentes EBC sobre el crecimiento bacteriano por medio de Microscopia confocal de fluorescencia (intensidad de fluorescencia).

En este apartado se muestra mediante análisis *semicuantitativo* la presencia de células de *S. mutans* vivas posterior al tiempo de experimentación de la MIC, dicho análisis se realizó añadiendo DAPI el cual dio una fluorescencia, la cual se interpreta como Unidad de Índice de Fluorescencia (UIF). A continuación, se describen las UIF de todas las muestras incluidas para el estudio.

En primera instancia el control de crecimiento tuvo una fluorescencia promedio de 26.36 y una SD de ± 10.24 UIF, mientras que en el control negativo que contenía solución salina al 0.9% y cultivo se detectó 16.85 ± 5.42 UIF.

En un segundo punto la intensidad de fluorescencia detectada en los EBC fue como se describe a continuación: se observó que el enjuague comercial Colgate® tuvo un valor de 11.02 ± 2.31 UIF siendo el que mostró un menor índice de fluorescencia, lo que significa menor cantidad de células vivas en comparación con el resto de los EBC. El uso del enjuague Listerine® en el cultivo de *S. mutans* mostró 14.77 ± 3.52 UIF, Peroxidín® tuvo un valor de 15.60 ± 2.69 UIF. Para el resto de los enjuagues TheraBreath®, PJ Masks, Fluoxetyl®, Organic Fresh Tea Tree, Carbón, la abundante presencia de células bacterianas se manifestó con un alto valor de fluorescencia siendo 23.37 ± 12.06 UIF, 23.62 ± 10.50 UIF, 24.52 ± 13.78 UIF, 26.72 ± 13.86 UIF y 29.82 ± 5.71 UIF respectivamente (Figura 14).

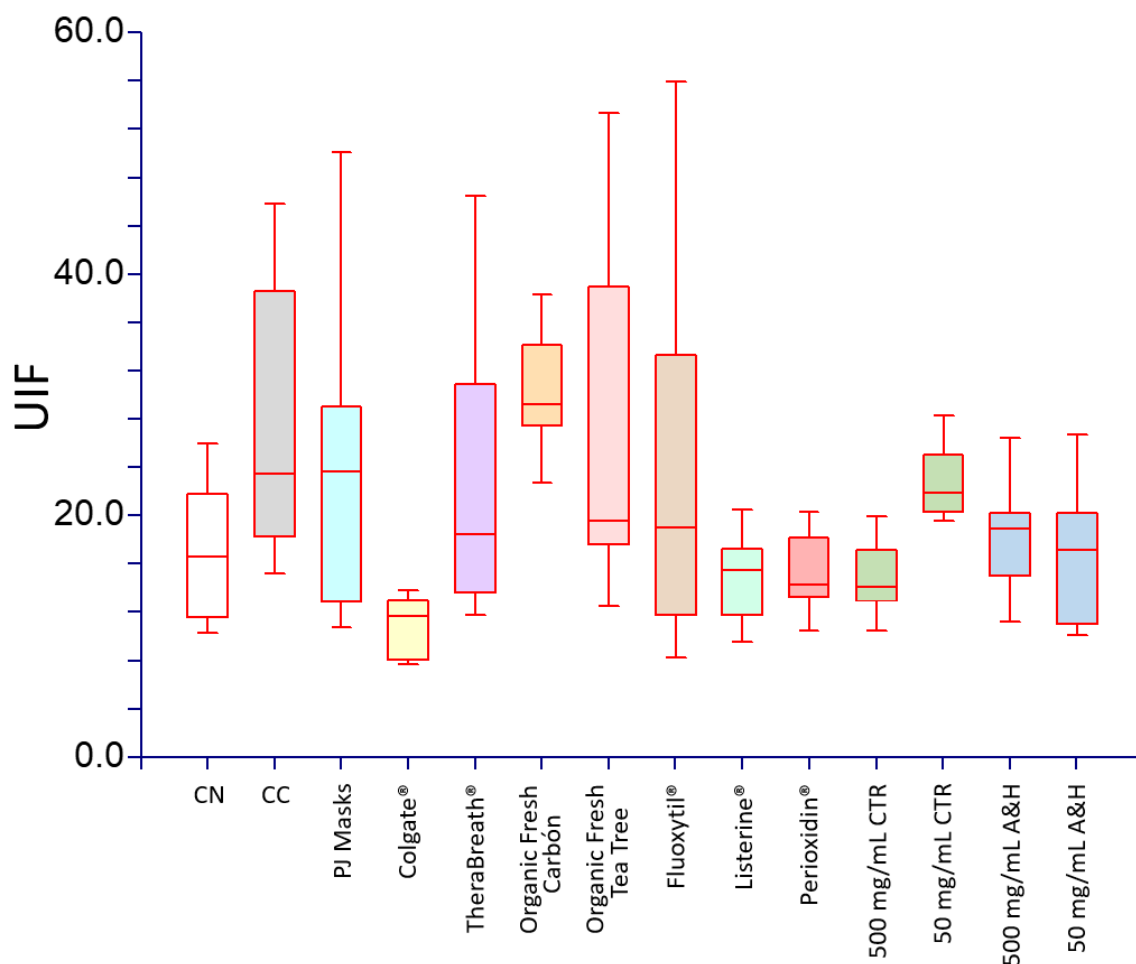


Figura 14. Representación de intensidad de fluorescencia de las soluciones de EBC en contraste con el control negativo (solución NaCL 0.9%) y el control de crecimiento (inóculo *S. mutans*).

El potencial antimicrobiano de la solución de NaHCO_3 de la marca se contrastó con la marca A&H. Considerando las UIF promedio y SD para las concentraciones de 50 mg/mL con A&H (16.35 ± 5.35 UIF) y de 500 mg/mL de ambas marcas (14.92 ± 2.65 UIF CTR y 17.70 ± 3.35 A&H) el valor de significancia fue $p < 0.05$, por tanto, la efectividad antimicrobiana es buena bajo dichos parámetros de concentraciones. En el caso de la marca CTR a concentración de 50 mg/mL la UIF fue de 23.22 ± 3.74 con un valor de $p > 0.05$ (se acepta la hipótesis nula), lo que indica que la actividad antimicrobiana no es efectiva y el valor es muy cercano al emitido por la muestra del control de crecimiento (CC) 26.36 ± 10.24 UIF (Figura 15.A).

Comparando la efectividad de las soluciones propuestas de NaHCO_3 de grado laboratorio (CTR) y comercial (A&H) a 50 y 500 mg/mL, con respecto a los EBC más efectivos, la marca Colgate[®] tuvo una eficiencia antimicrobiana superior con 11.02 ± 2.31 UIF y un valor de $p < 0.05$ por lo cual se rechaza la hipótesis nula, por tanto, este EBC mostró más eficacia que las soluciones de NaHCO_3 de ambas marcas (figura 15.B).

Listerine[®] es el segundo EBC más eficiente, se contrastó el resultado (14.77 ± 3.52 UIF) con las soluciones propuestas de NaHCO_3 de ambas marcas. De acuerdo con la UIF a la concentración de 50 mg/mL de CTR (23.22 ± 3.74 UIF) se rechaza la hipótesis nula ($p < 0.05$) siendo este enjuague comercial más efectivo, mientras que en ambas concentraciones de A&H (500 y 50 mg/mL) y en 500 mg/mL de CTR el resultado de las UIF fue de 17.70 ± 3.35 UIF, 16.35 ± 5.35 UIF, 14.92 ± 2.65 UIF, respectivamente, se aceptó la hipótesis nula ($p > 0.05$) dando como resultado un efecto similar al de Listerine[®], mostrando así una buena actividad antimicrobiana comparable a la del EBC (Figura 15.C).

Al contrastar las soluciones de NaHCO_3 con el enjuague Periooxidin[®] (15.60 ± 2.69 UIF) a concentraciones de 50 mg/mL de CTR y de 500 mg/mL de A&H se rechazó la hipótesis nula ($p < 0.05$), resultando más efectivo el EBC. En las concentraciones de 500 mg/mL (CTR) y 50 mg/mL (A&H) se aceptó la hipótesis nula $p > 0.05$, obteniendo valores de 14.92 ± 2.65 UIF y de 16.35 ± 5.35 UIF respectivamente, mostrando un efecto antimicrobiano bueno, similar a la del EBC (Figura 15.D).

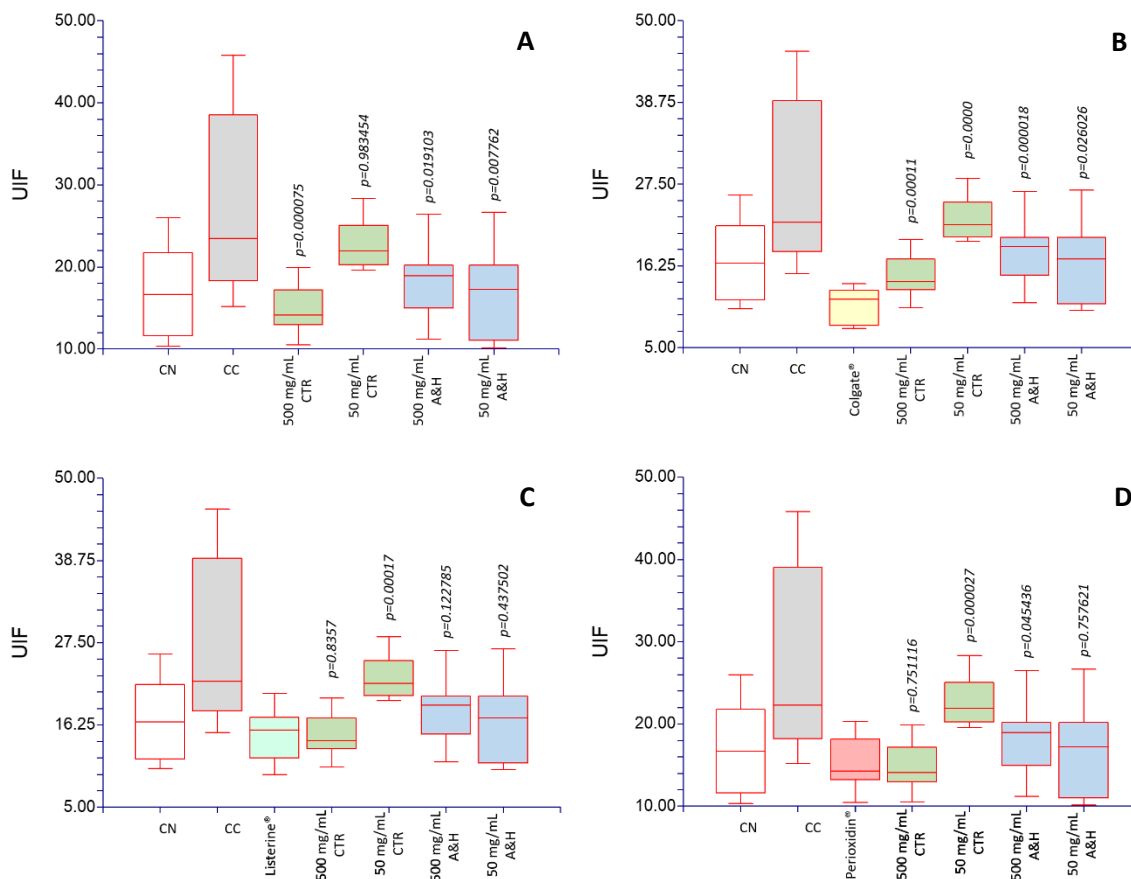


Figura 15. Representación en *Box Plot* de las Unidades de Intensidad de Fluorescencia (UIF) de: (A) *S. mutans* UA130 como control de crecimiento (CC), y en presencia de soluciones de NaHCO₃ a 500 y 50 mg/mL con las marcas CTR y A&H, utilizando solución NaCl 0.9% como control negativo (CN); existe diferencia significativa en el NaHCO₃ de CTR (500 mg/mL) y el de A&H (500 y 50 mg/mL) ($p < 0.05$) con la bacteria *S. mutans*. En las UIF de *S. mutans* en presencia de (B) Colgate®: existe diferencia significativa entre las dos concentraciones (500 y 50 mg/mL) de ambas marcas de NaHCO₃ (CTR y A&H) y el enjuague bucal ($p < 0.05$); (C) Listerine®: existe diferencia significativa entre NaHCO₃ de CTR a 50 mg/mL y el enjuague ($p < 0.05$) a excepción de las soluciones de CTR y A&H a 500 mg/mL y A&H a 50 mg/mL ($p > 0.05$); (D) Peroxidid®: existe diferencia significativa entre NaHCO₃ de CTR a 50 mg/mL y A&H a 500 mg/mL con el enjuague ($p < 0.05$), mientras que con las soluciones de CTR a 500 mg/mL y A&H a 50 mg/mL no hubo diferencia significativa ($p > 0.05$).

7. Discusión

Existen diversos artículos acerca del uso y aplicaciones del NaHCO_3 , entre ellas se encuentra el estudio realizado por Cabrea-Jaime y col. (2017), en el cual respaldan el uso de productos alcalinos para el cuidado de higiene bucal. En el presente estudio se determinó la actividad antimicrobiana del NaHCO_3 frente a *S. mutans* como uno de los patógenos etiológicos de la caries dental.

En 2015 Hashemi y col., realizaron una revisión sistemática de enjuagues con diferentes formulaciones para la prevención de mucositis oral inducida por quimioterapias, entre los cuales se encontraba el NaHCO_3 , junto con otros principios activos como la clorhexidina, bencidamina, sucralfato, resaltando que el NaHCO_3 brinda beneficios para el mantenimiento de la higiene bucal y es inofensivo. Recientemente Mohammadi y col. (2022), utilizaron un enjuague de NaHCO_3 a 50 mg/mL para reducir la severidad de la mucositis oral en pacientes con cáncer y bajo tratamiento de quimioterapia. Los resultados fueron favorables, reportando que este tipo de enjuagues ayudan a reducir la severidad de la mucositis oral, razón por la cual los pacientes referían una disminución del dolor acompañado de un mayor deseo del apetito y capacidad de comer.

En el estudio aquí presentado, primero se estandarizó la solución madre de NaHCO_3 , tomando en cuenta la concentración necesaria a la cual el NaHCO_3 fuese una solución isotónica. Los valores encontrados en la literatura fueron de 10 mg/mL, (Madeswaran y Jayachandran, 2018) y de 50 mg/mL usado por Cabrera-Jaime y col. (2018) y Mohammadi y col. (2022). Siendo dichos valores las concentraciones más bajas hasta llegar a la

solubilidad de la marca CTR (210 mg/mL). Se tomó como concentración más alta la de 500 mg/ mL para contar con un rango más amplio. A partir de estos parámetros mínimo y máximo, se establecieron diferentes rangos de concentración para estudiar un mismo principio activo natural, como los estudios realizados por Enciso y col. (2020), Loyola y col. (2020) y Mehdipour y col. (2022).

Entre los métodos *in vitro* para evaluar la actividad antimicrobiana de una sustancia, se encuentra el método de difusión con discos (Método Kirby-Bauer) (Bauer et al., 1966) y el de difusión en pozos de agar. Con ambas técnicas se mide el diámetro de la zona de inhibición desarrollado, la primera técnica es la más utilizada y reconocida a nivel mundial entre los laboratorios de microbiología y el ámbito clínico hospitalario para realizar pruebas de susceptibilidad de ciertas bacterias, entre ellas los *Streptococcus* spp., (Balouiri et al., 2016).

No existen datos reportados en la literatura sobre la medición de la actividad antimicrobiana del NaHCO_3 por medio de ensayo de difusión de discos, en este estudio *S. mutans* no mostró susceptibilidad a la presencia de NaHCO_3 , por el contrario, en la MIC se observó una reducción bacteriana, lo cual lleva a pensar que la actividad antimicrobiana recae en la capacidad buffer, resultados similares se observaron en un estudio realizado por Chandel y col. en el que reportaron que si bien el recuento de bacterias disminuyó después del uso del enjuague de NaHCO_3 , esta reducción no fue estadísticamente significativa, a diferencia del aumento del pH salival, el cual, si fue significativo (Chandel et al., 2017).

Para la prueba de difusión en agar todos los EBC se usaron a dilución 1:1, al igual que en el estudio de Guven y col. en 2019.

Los EBC que tampoco presentaron halos de inhibición fueron ambas marcas de Organic Fresh (Tea Tree y Carbón), TheraBreath[®] y Fluoxytil[®], en el caso de Listerine[®] cuyos principios activos son aceites esenciales, presentó un halo de 2.28 mm \pm 0.16, resultado diferente al que obtuvieron Evans y col. en 2015, donde reportaron que dicho EBC no presentó zona de inhibición en los pozos de agar.

El EBC al que fue más susceptible a *S. mutans* en el ensayo de sensibilidad en disco fue Perioxidin[®] el cual tiene como ingrediente activo el Digluconato de Clorhexidina al 0.12%, mostrando en promedio un halo de inhibición de 7.11 mm \pm 0.21, siendo éste el de mayor diámetro de todos los EBC. Éste es un resultado similar al obtenido por Loyola y col. en 2020, donde compararon extractos naturales a diferentes concentraciones contra *S. mutans* y el halo de inhibición mayor lo presentó la clorhexidina (0.12%) 14.2 mm \pm 0.7, sin embargo, no se reporta si el diámetro incluye el disco. A pesar de contar con una actividad antimicrobiana frente a *S. mutans* (Evans et al., 2015), se ha reportado que cuenta con efectos secundarios cuando no se utiliza adecuadamente, como la pigmentación dental y alteración del gusto (Okano et al., 1989; Escamilla-García et al., 2017).

Los valores de la MIC para la marca CTR fue de 250 mg/mL y el de A&H de 300mg/mL, alcanzando una reducción celular de 80.45% \pm 0.43 y 74.41% \pm 0.70 respectivamente, llegando a la misma conclusión de Ciancio en 2017; quien menciona que los formulados que incluyen NaHCO₃, tienen actividad bactericida contra patógenos orales (Sabharwal y Scannapieco, 2017; Ciancio, 2017).

Como se esperaba por los resultados previos del método de difusión de discos los EBC con menores conteos celulares por mililitro fueron Colgate[®] (7.9%), Perioxidin[®] (7.5%) y PJ Masks (2.7%) y los de mayor fueron Fluoxytil[®] y TheraBreath[®], resultado que

concuenda al experimento previo, ya que estos enjuagues no presentaron halos de inhibición en discos.

A partir de la concentración de 250 mg/mL, ambas marcas de las soluciones de NaHCO_3 (CTR y A&H) obtuvieron una reducción de *S. mutans* mayor al 75%, resultando tener una mayor actividad antimicrobiana que estos dos (Fluoxetyl® y TheraBreath®) cuyas reducciones celulares fueron inferiores al 50%. Los resultados obtenidos de la actividad antimicrobiana realizados con el ensayo de la MIC fueron confirmados con un segundo análisis *semicuantitativo* del efecto de los distintos enjuagues bucales, sobre el crecimiento de *S. mutans* a través de Microscopía confocal de fluorescencia, obteniendo datos de UIF, generados por el DAPI en el material genético de la bacteria en cuestión y estableciendo un valor de $p > 0.05$, para determinar la significancia en actividad antimicrobiana.

Algunos reportes en la literatura, como los hechos por Luoma y Luoma (1967, 1968) y Goldberg et al., (1990) sugieren que la principal acción del NaHCO_3 se encuentra en su habilidad de incrementar el pH salival y de esta manera crear un ambiente hostil para el crecimiento de bacterias acidúricas (Legier-Vargas et al., 1995), es decir, el pH se vuelve alcalino.

En cuanto a la modificación en el gradiente de pH durante los ensayos de la MIC, los enjuagues que contenían NaHCO_3 incrementaron el valor de pH a alcalino a pesar de la presencia de *S. mutans*, quien durante su desarrollo secreta compuestos ácidos como parte de su metabolismo en presencia de fuentes de energía (glucosa, sacarosa...); razón por la cual desempeña un rol importante en el desarrollo de caries dental (Hamza et al., 2020). A diferencia de los resultados obtenidos por las soluciones elaboradas de NaHCO_3 , solo los enjuagues Colgate® (7.3 ± 0.08), Perioxidín® (7.3 ± 0.06) y PJ Masks (7.2 ± 0.03),

alcanzaron un nivel dentro de lo neutro (pH 6.5-7.5). Estos niveles de pH fueron superados por las soluciones de NaHCO_3 de ambas marcas a concentraciones por encima de 50mg/mL; con pH de 7.65 ± 0.023 y de 8.43 ± 0.006 con CTR y A&H respectivamente.

Mientras que en la concentración mayor evaluada en este estudio (500 mg/mL), se alcanzaron valores muy alcalinos de pH= 9.9 ± 0.05 (CTR) y 9.8 ± 0.035 (A&H).

Resultados similares fueron obtenidos por Chandel y col. en 2017, donde concluyeron que un enjuague bucal a base de NaHCO_3 es capaz de incrementar el pH salival por encima de los niveles necesarios para prevenir la desmineralización del esmalte y mejorar el proceso de remineralización, dichos valores son los que se encuentran por encima del pH crítico, el cual es de 5.5 (Dawes, 2003; Harper et al., 2021), lo cual concuerda con Zero (2017) que menciona que el NaHCO_3 al tratarse de un agente alcalinizante o amortiguador, puede revertir de manera rápida la disminución del pH del biofilm después del contacto con el azúcar. En la diferencia en la actividad antimicrobiana y el pH amortiguado en los ensayos entre las dos marcas de NaHCO_3 preparadas a distintas concentraciones para esta investigación, y de acuerdo con el análisis de Anova de 1 y 2 colas, se detectaron diferencias estadísticas significativas, pero que, conforme al tamaño del Error cuadrático medio, se establecen dichas diferencias como pequeñas.

8. Conclusiones y recomendaciones

Las soluciones de NaHCO_3 de ambas marcas (A&H y CTR) tienen una reducción bacteriana de *S. mutans* del 75% a partir de 250 mg/mL y hasta el 84% en concentraciones de 500 mg/mL. La actividad antibacteriana se le asocia por su capacidad buffer, amortiguadora o alcalinizante para elevar el pH del medio donde se encuentra, contrastando y dificultando así las condiciones ambientales de proliferación de la bacteria cariogénica *S. mutans*, la cual requiere de un ambiente ácido (pH 5.5). Respecto a los EBC, los resultados de la eficacia antibacteriana del NaHCO_3 de las marcas A&H y CTR supera y por tanto compite con las marcas Listerine[®], Fluoxetyl[®] y TheraBreath[®].

Considerando los resultados de este estudio y la naturaleza (origen mineral) del NaHCO_3 , se recomienda: (a) Continuar caracterizando sus propiedades biológicas para descartar efectos citotóxicos o secundarios en mucosas y tejidos blandos de la cavidad oral, a manera de poder en algún momento recomendar al paciente la dosis de un preparado de NaHCO_3 que sea parte de una rutina de higiene bucal como enjuague bucal, de esta manera se obtienen los beneficios del NaHCO_3 sin ocasionar la abrasión dental que ocasiona al ser utilizada en conjunto con la pasta dental. (b) Especificada la dosis, se recomendaría llevar a cabo estudios *in vivo* donde se pueda medir la disminución de bacterias en pacientes después de la utilización de enjuagatorios de NaHCO_3 en un periodo de tiempo de estudio determinado.

9. Literatura citada

1. Akanji LT, Rehman R, Onyemara CC, Ebel R, Jamal A. A novel technique for interface analysis: Behaviour of sophorolipids biosurfactant obtained from *Meyerozyma* spp. MF138126 during low-salinity heavy-crude experiments. *Fuel*. 2021;1-38.
2. Aluckal E, Ankola AV. Effectiveness of xylitol and polyol chewing gum on salivary streptococcus mutans in children: A randomized controlled trial. *Indian J Dent Res*. 2018;29(4):445-449.
3. Ammons MC, Ward LS, James GA. Anti-biofilm efficacy of a lactoferrin/xylitol wound hydrogel used in combination with silver wound dressings. *Int Wound J*. 2011;8(3):268-73.
4. Andrews JM. Determination of minimum inhibitory concentrations. *J Antimicrob Chemother*. 2001;48 Suppl 1:5-16.
5. Arunakul M, Thaweboon B, Thaweboon S, Asvanund Y, Charoenchaikorn K. Efficacy of xylitol and fluoride mouthrinses on salivary Mutans streptococci. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2011;1(6):488-90.
6. Ayad F, Prado R, Mateo LR, Stewart B, Szewczyk G, Arvanitidou E, Panagakos FS. A comparative investigation to evaluate the clinical efficacy of an alcohol-free CPC-containing mouthwash as compared to a control mouthwash in controlling dental plaque and gingivitis: a six-month clinical study on adults in San Jose, Costa Rica. *J Clin Dent*. 2011;22(6):204-12.

7. Balouiri M, Sadiki M, Ibensouda SK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J Pharm Anal.* 2016;6(2):71-79.
8. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Tech Bull Regist Med Technol.* 1966;36(3):49-52.
9. Bejoy BM, Sruthi MS, George L, Mathew J, Vineet RP, Joy A. Comparative Evaluation of Casein Phosphopeptide-Amorphous Calcium Phosphate-Fluoride Paste and Sodium Fluoride Mouthwash in the Prevention of Dental Erosion: An *In Vitro* Study. *J Contemp Dent Pract.* 2020;21(3):267-270.
10. Cabrera-Jaime S, Martínez C, Ferro-García T, Giner-Boya P, Icart-Isern T, Estrada-Masllorens JM, Fernández-Ortega P. Efficacy of Plantago major, chlorhexidine 0.12% and sodium bicarbonate 5% solution in the treatment of oral mucositis in cancer patients with solid tumour: A feasibility randomised triple-blind phase III clinical trial. *Eur J Oncol Nurs.* 2018;32:40-47.
11. Chandel S, Khan MA, Singh N, Agrawal A, Khare V. The effect of sodium bicarbonate oral rinse on salivary pH and oral microflora: A prospective cohort study. *Natl J Maxillofac Surg.* 2017;8(2):106-109.
12. Cheung HY, Wong MM, Cheung SH, Liang LY, Lam YW, Chiu SK. Differential actions of chlorhexidine on the cell wall of *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *PLoS One.* 2012;7(5):e36659.
13. Chi DL, Scott JM. Added Sugar and Dental Caries in Children: A Scientific Update and Future Steps. *Dent Clin North Am.* 2019;63(1):17-33.

14. Chifor I, Badea I, Chifor R, Popa D, Staniste L, Tarmure D, Avram R. Saliva characteristics, diet and carioreceptivity in dental students. *Clujul Med.* 2014;87(1):34-9.
15. Ciancio SG. Baking soda dentifrices and oral health. *J Am Dent Assoc.* 2017;148(11S):S1-S3.
16. Clarke, JK. On the bacterial factor in the aetiology of dental caries. *Br J Exp Pathol.* 1924;5,141-147.
17. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 32nd ed. CLSI supplement M100. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2022.
18. Coelho ASEC, Paula ABP, Carrilho TMP, da Silva MJRF, Botelho MFRR, Carrilho EVVF. Chlorhexidine mouthwash as an anticaries agent: A systematic review. *Quintessence Int.* 2017;48(7):585-591.
19. Costa X, Laguna E, Herrera D, Serrano J, Alonso B, Sanz M. Efficacy of a new mouth rinse formulation based on 0.07% cetylpyridinium chloride in the control of plaque and gingivitis: a 6-month randomized clinical trial. *J Clin Periodontol* 2013;40:1007-1015.
20. Davies A. The mode of action of chlorhexidine. *J Periodontal Res Suppl.* 1973;12:68-75.
21. Dawes C. What is the critical pH and why does a tooth dissolve in acid? *J Can Dent Assoc.* 2003;69(11):722-4.
22. Edwardsson S. Characteristics of caries-inducing human streptococci resembling *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol.* 1968;13(6):637-46.
23. ElSalhy M, Sayed Zahid I, Honkala E. Effects of xylitol mouthrinse on *Streptococcus mutans*. *J Dent.* 2012;40(12):1151-4.

24. Enciso S, Medina J, Mauricio F, Mauricio-Vilchez C, Alvitez-Temoche D, Vilchez L, Mayta-Tovalino F. Antibacterial Effectiveness of Four Concentrations of the Hydroalcoholic Extract of *Solanum tuberosum* (Tocosh) against *Streptococcus mutans* ATCC 25175TM: A Comparative In Vitro Study. *Int J Dent*. 2020;2020:8856382.
25. Ennibi O, Lakhdar L, Bouziane A, Bensouda Y, Abouqal R. Chlorhexidine alcohol base mouthrinse versus Chlorhexidine formaldehyde base mouthrinse efficacy on plaque control: double blind, randomized clinical trials. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2013;18(1):e135-9.
26. Eriksson L, Lif Holgerson P, Esberg A, Johansson I. Microbial Complexes and Caries in 17-Year-Olds with and without *Streptococcus mutans*. *J Dent Res*. 2018;97(3):275-282.
27. Escamilla-García E, Alcázar-Pizaña AG, Segoviano-Ramírez JC, Del Angel-Mosqueda C, López-Lozano AP, Cárdenas-Estrada E, De La Garza-Ramos MA, Medina-De La Garza CE, Márquez M. Antimicrobial Activity of a Cationic Guanidine Compound against Two Pathogenic Oral Bacteria. *Int J Microbiol*. 2017;2017:5924717.
28. Evans A, Leishman SJ, Walsh LJ, Seow WK. Inhibitory effects of antiseptic mouthrinses on *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis* and *Lactobacillus acidophilus*. *Aust Dent J*. 2015;60(2):247-54.
29. Garcia SS, Blackledge MS, Michalek S, Su L, Ptacek T, Eipers P, Morrow C, Lefkowitz EJ, Melander C, Wu H. Targeting of *Streptococcus mutans* Biofilms by a Novel Small Molecule Prevents Dental Caries and Preserves the Oral Microbiome. *J Dent Res*. 2017;96(7):807-814.

30. Gehring F. Wirkung von Aminfluorid und Natriumfluorid auf Keime der Plaqueflora [Effect of amine fluoride and sodium fluoride on the germs of plaque flora]. *Dtsch Zahnarztl Z.* 1983;38 Suppl 1:S36-40.
31. Gilbert P, Moore LE. Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. *J Appl Microbiol.* 2005;99(4):703-15.
32. Goldberg M, Apap M, Le Denmat D. Calcium and phosphate uptake of human dental enamel treated with sodium bicarbonate. *J Biol Buccale.* 1990;18(1):55-8.
33. Gunsolley JC. Clinical efficacy of antimicrobial mouthrinses. *J Dent.* 2010;38 Suppl 1:S6-10.
34. Guven Y, Ustun N, Tuna EB, Aktoren O. Antimicrobial Effect of Newly Formulated Toothpastes and a Mouthrinse on Specific Microorganisms: An In Vitro Study. *Eur J Dent.* 2019;13(2):172-177.
35. Hamza SA, Wahid A, Afzal N, Asif S, Imran MF, Khurshid Z, Bokhari SAH. Effect of Sodium Bicarbonate Mouth Wash on Salivary pH and Interleukin-1 β Levels among Smokers. *Eur J Dent.* 2020;14(2):260-267.
36. Han Y. Effects of brief sodium fluoride treatments on the growth of early and mature cariogenic biofilms. *Sci Rep.* 2021;11(1):18290.
37. Haps S, Slot DE, Berchier CE, Van der Weijden GA. The effect of cetylpyridinium chloride-containing mouth rinses as adjuncts to toothbrushing on plaque and parameters of gingival inflammation: a systematic review. *Int J Dent Hyg.* 2008;6(4):290-303.
38. Hara AT, Turssi CP. Baking soda as an abrasive in toothpastes: Mechanism of action and safety and effectiveness considerations. *J Am Dent Assoc.* 2017;148(11S):S27-S33.

39. Hardwick JL, Teasdale J, Bloodworth G. Caries increments over 4 years in children aged 12 at the start of water fluoridation. *Br Dent J.* 1982;153(6):217-22.
40. Harper RA, Shelton RM, James JD, Salvati E, Besnard C, Korsunsky AM, Landini G. Acid-induced demineralisation of human enamel as a function of time and pH observed using X-ray and polarised light imaging. *Acta Biomater.* 2021;120:240-248.
41. Hashemi A, Bahrololoumi Z, Khaksar Y, Saffarzadeh N, Neamatzade H, Foroughi E. Mouth-rinses for the prevention of chemotherapy induced oral mucositis in children: a systematic review. *Iran J Ped Hematol Oncol.* 2015;5(2):106-12.
42. Haydari M, Bardakci AG, Koldslund OC, Aass AM, Sandvik L, Preus HR. Comparing the effect of 0.06% -, 0.12% and 0.2% Chlorhexidine on plaque, bleeding and side effects in an experimental gingivitis model: a parallel group, double masked randomized clinical trial. *BMC Oral Health.* 2017;17(1):118.
43. James P, Worthington HV, Parnell C, Harding M, Lamont T, Cheung A, Whelton H, Riley P. Chlorhexidine mouthrinse as an adjunctive treatment for gingival health. *Cochrane Database Syst Rev.* 2017;3(3):CD008676.
44. Janakiram C, Deepan Kumar CV, Joseph J. Xylitol in preventing dental caries: A systematic review and meta-analyses. *J Nat Sci Biol Med.* 2017;8(1):16-21.
45. Janket SJ, Benwait J, Isaac P, Ackerson LK, Meurman JH. Oral and Systemic Effects of Xylitol Consumption. *Caries Res.* 2019;53(5):491-501.
46. Jones CG. Chlorhexidine: is it still the gold standard? *Periodontol* 2000. 1997;15:55-62.

47. Kilian M, Chapple IL, Hannig M, Marsh PD, Meuric V, Pedersen AM, Tonetti MS, Wade WG, Zaura E. The oral microbiome - an update for oral healthcare professionals. *Br Dent J*. 2016;221(10):657-666.
48. Kim YR, Nam SH. Anti-Caries Effect of a Mouthwash Containing *Sambucus williamsii* var. *coreana* Extract: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Clinical Trial. *Antibiotics (Basel)*. 2022;11(4):488.
49. Kim YR, Nam SH. Effects of a mouthwash containing *Lespedeza cuneata* extract on risk of dental caries: a randomized, placebo-controlled clinical trial. *Sci Rep*. 2022;12(1):20761.
50. Kirthiga M, Murugan M, Saikia A, Kirubakaran R. Risk Factors for Early Childhood Caries: A Systematic Review and Meta-Analysis of Case Control and Cohort Studies. *Pediatr Dent*. 2019;41(2):95-112.
51. Köhler W. The present state of species within the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Int J Med Microbiol*. 2007;297(3):133-50.
52. Krupa NC, Thippeswamy HM, Chandrashekar BR. Antimicrobial efficacy of Xylitol, Probiotic and Chlorhexidine mouth rinses among children and elderly population at high risk for dental caries - A Randomized Controlled Trial. *J Prev Med Hyg*. 2022;63(2):E282-E287.
53. Kulkarni P, Singh DK, Jalaluddin M, Mandal A. Comparative Evaluation of Antiplaque Efficacy between Essential Oils with Alcohol-Based and Chlorhexidine with Nonalcohol-Based Mouthrinses. *J Int Soc Prev Community Dent*. 2017;7(Suppl 1):S36-S41.
54. LeBel G, Vaillancourt K, Morin MP, Grenier D. Antimicrobial Activity, Biocompatibility and Anti-inflammatory Properties of Cetylpyridinium Chloride-

- based Mouthwash Containing Sodium Fluoride and Xylitol: An In Vitro Study. *Oral Health Prev Dent.* 2020;18(1):1069-1076.
55. Lee ES. Inhibitory effects of several commercial oral rinses on *Streptococcus mutans* biofilm formation. *J. Korean Acad. Dent.* 2011;35, 289–296.
56. Legier-Vargas K, Mundorff-Shrestha SA, Featherstone JD, Gwinner LM. Effects of sodium bicarbonate dentifrices on the levels of cariogenic bacteria in human saliva. *Caries Res.* 1995;29(2):143-7.
57. Lemos JA, Palmer SR, Zeng L, Wen ZT, Kajfasz JK, Freires IA, Abranches J, Brady LJ. The Biology of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Spectr.* 2019;7(1):10.1128/microbiolspec.GPP3-0051-2018.
58. Lim KS, Kam PC. Chlorhexidine--pharmacology and clinical applications. *Anaesth Intensive Care.* 2008;36(4):502-12.
59. Loyola D, Mendoza R, Chiong L, Rueda M, Alvítez-Temoche D, Gallo W, Mayta-Tovalino F. Ethanol extract of *Schinus molle* L. (Molle) and *Erythroxyllum coca* Lam (Coca): Antibacterial Properties at Different Concentrations against *Streptococcus mutans*: An In Vitro Study. *J Int Soc Prev Community Dent.* 2020;10(5):579-584.
60. Luoma H, Luoma AR. Influences of sucrose and buffer additives on plaque and 32P of the enamel. *J Dent Res.* 1967;46(6):1392-1399.
61. Luoma H, Luoma AR. Modification of the pH of human plaque by sucrose and bicarbonate-phosphate additives. *Caries Res.* 1968;2(1):27-37.
62. Lynch H, Milgrom P. Xylitol and dental caries: an overview for clinicians. *J Calif Dent Assoc.* 2003;31(3):205-9.

63. Machiulskiene V, Campus G, Carvalho JC, Dige I, Ekstrand KR, Jablonski-Momeni A, Maltz M, Manton DJ, Martignon S, Martinez-Mier EA, Pitts NB, Schulte AG, Splieth CH, Tenuta LMA, Ferreira Zandona A, Nyvad B. Terminology of Dental Caries and Dental Caries Management: Consensus Report of a Workshop Organized by ORCA and Cariology Research Group of IADR. *Caries Res.* 2020;54(1):7-14.
64. Madeswaran S, Jayachandran S. Sodium bicarbonate: A review and its uses in dentistry. *Indian J Dent Res.* 2018;29(5):672-677.
65. Malvania EA, Sharma AS, Sheth SA, Rathod S, Chovatia NR, Kachwala MS. In Vitro Analysis of Licorice (*Glycyrrhiza glabra*) Root Extract Activity on *Streptococcus mutans* in Comparison to Chlorhexidine and Fluoride Mouthwash. *J Contemp Dent Pract.* 2019;20(12):1389-1394.
66. Mao X, Auer DL, Buchalla W, Hiller KA, Maisch T, Hellwig E, Al-Ahmad A, Cieplik F. Cetylpyridinium Chloride: Mechanism of Action, Antimicrobial Efficacy in Biofilms, and Potential Risks of Resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2020;64(8):e00576-20.
67. Marinho VC, Chong LY, Worthington HV, Walsh T. Fluoride mouthrinses for preventing dental caries in children and adolescents. *Cochrane Database Syst Rev.* 2016;7(7):CD002284.
68. Mariotti AJ, Rumpf DA. Chlorhexidine-induced changes to human gingival fibroblast collagen and non-collagen protein production. *J Periodontol.* 1999;70(12):1443-8.
69. Marsh PD. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res.* 1994;8(2):263-71.

70. McBain AJ, Bartolo RG, Catrenich CE, Charbonneau D, Ledder RG, Gilbert P. Effects of a chlorhexidine gluconate-containing mouthwash on the vitality and antimicrobial susceptibility of in vitro oral bacterial ecosystems. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69(8):4770-6.
71. Mehdipour A, Ehsani A, Samadi N, Ehsani M, Sharifinejad N. The antimicrobial and antibiofilm effects of three herbal extracts on *Streptococcus mutans* compared with Chlorhexidine 0.2% (in vitro study). *J Med Life.* 2022;15(4):526-532.
72. Mohammadi F, Oshvandi K, Kamallan SR, Khazaei S, Ranjbar H, Ahmadi-Motamayel F, Gillespie M, Jenabi E, Vafaei SY. Effectiveness of sodium bicarbonate and zinc chloride mouthwashes in the treatment of oral mucositis and quality of life in patients with cancer under chemotherapy. *Nurs Open.* 2022;9(3):1602-1611.
73. Mota Vde S, Turrini RN, Poveda Vde B. Atividade antimicrobiana do óleo de *Eucalyptus globulus*, xilitol e papaína: estudo piloto [Antimicrobial activity of *Eucalyptus globulus* oil, xylitol and papain: a pilot study]. *Rev Esc Enferm USP.* 2015;49(2):216-20.
74. Muñoz-Millán P, Zaror C, Espinoza-Espinoza G, Vergara-Gonzalez C, Muñoz S, Atala-Acevedo C, Martínez-Zapata MJ. Effectiveness of fluoride varnish in preventing early childhood caries in rural areas without access to fluoridated drinking water: A randomized control trial. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2018;46(1):63-69.
75. Myneni SR. Effect of baking soda in dentifrices on plaque removal. *J Am Dent Assoc.* 2017;148(11S):S4-S9.

76. Naumova EA, Staiger M, Kouji O, Modric J, Pierchalla T, Rybka M, Hill RG, Arnold WH. Randomized investigation of the bioavailability of fluoride in saliva after administration of sodium fluoride, amine fluoride and fluoride containing bioactive glass dentifrices. *BMC Oral Health*. 2019;19(1):119.
77. Newbrun E. The use of sodium bicarbonate in oral hygiene products and practice. *Compend Contin Educ Dent Suppl*. 1997;18(21):S2-7.
78. Okano M, Nomura M, Hata S, Okada N, Sato K, Kitano Y, Tashiro M, Yoshimoto Y, Hama R, Aoki T. Anaphylactic symptoms due to chlorhexidine gluconate. *Arch Dermatol*. 1989;125(1):50-2.
79. O'Mullane DM, Baez RJ, Jones S, Lennon MA, Petersen PE, Rugg-Gunn AJ, Whelton H, Whitford GM. Fluoride and Oral Health. *Community Dent Health*. 2016;33(2):69-99.
80. Oyetola EO, Awosusi OO, Agho ET, Abdullahi MA, Suleiman IK, Egunjobi S. Salivary Bacterial Count and its Implications on the Prevalence of Oral Conditions. *J Contemp Dent Pract*. 2019;20(2):184-189.
81. Parkinson CR, Hara AT, Nehme M, Lippert F, Zero DT. A randomised clinical evaluation of a fluoride mouthrinse and dentifrice in an in situ caries model. *J Dent*. 2018;70:59-66.
82. Perala SR, Bhupathiraju P. Efficacy of Four Fluoride Mouth Rinses on *Streptococcus mutans* in High Caries Risk Children - A Randomized Controlled Trial. *J Clin Diagn Res*. 2016;10(9):ZC56-ZC60.
83. Philip N, Suneja B, Walsh L. Beyond *Streptococcus mutans*: clinical implications of the evolving dental caries aetiological paradigms and its associated microbiome. *Br Dent J*. 2018;224(4):219-225.

84. Pitts NB, Twetman S, Fisher J, Marsh PD. Understanding dental caries as a non-communicable disease. *Br Dent J.* 2021;231(12):749-753.
85. Poppolo Deus F, Ouanounou A. Chlorhexidine in Dentistry: Pharmacology, Uses, and Adverse Effects. *Int Dent J.* 2022;72(3):269-277.
86. Pucher JJ, Daniel JC. The effects of chlorhexidine digluconate on human fibroblasts in vitro. *J Periodontol.* 1992;63(6):526-32.
87. Puig-Silla M, Montiel Company JM, Almerich Silla JM. Use of chlorhexidine varnishes in preventing and treating periodontal disease. A review of the literature. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2008;13(4):E257-60.
88. Qu X, Houser SH, Tian M, Zhang Q, Pan J, Zhang W. Effects of early preventive dental visits and its associations with dental caries experience: a cross-sectional study. *BMC Oral Health.* 2022;22(1):150.
89. Qudeimat MA, Alyahya A, Karched M, Behbehani J, Salako NO. Dental plaque microbiota profiles of children with caries-free and caries-active dentition. *J Dent.* 2020;104:103539.
90. Rajendiran M, Trivedi HM, Chen D, Gajendrareddy P, Chen L. Recent Development of Active Ingredients in Mouthwashes and Toothpastes for Periodontal Diseases. *Molecules.* 2021;26(7):2001.
91. Ramalingam K, Amaechi BT, Ralph RH, Lee VA. Antimicrobial activity of nanoemulsion on cariogenic planktonic and biofilm organisms. *Arch Oral Biol.* 2012;57(1):15-22.
92. Riley P, Moore D, Ahmed F, Sharif MO, Worthington HV. Xylitol-containing products for preventing dental caries in children and adults. *Cochrane Database Syst Rev.* 2015;(3):CD010743.

93. Russell AD. Chlorhexidine: antibacterial action and bacterial resistance. *Infection*. 1986;14(5):212-5.
94. Sabharwal A, Scannapieco FA. Baking soda dentifrice and periodontal health: A review of the literature. *J Am Dent Assoc*. 2017;148(11S):S15-S19.
95. Salli K, Lehtinen MJ, Tiihonen K, Ouwehand AC. Xylitol's Health Benefits beyond Dental Health: A Comprehensive Review. *Nutrients*. 2019;11(8):1813.
96. Samaranayake L, Matsubara VH. Normal Oral Flora and the Oral Ecosystem. *Dent Clin North Am*. 2017;61(2):199-215.
97. Schepman KP. Is een mondspoelmiddel met alcohol een risicofactor voor mondkanker? [Is an alcohol-based mouthwash a risk factor for oral cancer?]. *Ned Tijdschr Tandheelkd*. 2001;108(5):196.
98. Selvarajan NB, Krishnan R, Kumar S. Effect of Dental Health Education on the Knowledge and Attitude Among Expectant Mothers: A Questionnaire Study. *J Pharm Bioallied Sci*. 2019;11(2):S194-S197.
99. Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB. Dental caries. *Lancet*. 2007;369(9555):51-9.
100. Seneviratne CJ, Balan P, Ko KKK, Udawatte NS, Lai D, Ng DHL, Venkatachalam I, Lim KS, Ling ML, Oon L, Goh BT, Sim XYJ. Efficacy of commercial mouth-rinses on SARS-CoV-2 viral load in saliva: randomized control trial in Singapore. *Infection*. 2021;49(2):305-311.
101. Shah FA. Fluoride-containing bioactive glasses: Glass design, structure, bioactivity, cellular interactions, and recent developments. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2016;58:1279-89.

102. Sharma A, Agarwal N, Anand A, Jabin Z. To compare the effectiveness of different mouthrinses on *Streptococcus mutans* count in caries active children. J Oral Biol Craniofac Res. 2018;8(2):113-117.
103. Shen A, Bernabé E, Sabbah W. Systematic Review of Intervention Studies Aiming at Reducing Inequality in Dental Caries among Children. Int J Environ Res Public Health. 2021;18(3):1300.
104. Silhacek KJ, Taake KR. Sodium bicarbonate and hydrogen peroxide: the effect on the growth of *Streptococcus mutans*. J Dent Hyg. 2005;79(4):7.
105. So Yeon L, Si Young L. Susceptibility of Oral Streptococci to Chlorhexidine and Cetylpyridinium Chloride. Biocontrol Sci. 2019;24(1):13-21.
106. Sreenivasan PK, Haraszthy VI, Zambon JJ. Antimicrobial efficacy of 0.05% cetylpyridinium chloride mouthrinses. Lett Appl Microbiol. 2013;56(1):14-20.
107. Sridhar S, Suprabha BS, Shenoy R, Suman E, Rao A. Association of *Streptococcus mutans*, *Candida albicans* and Oral Health Practices with Activity Status of Caries Lesions Among 5-Year-Old Children with Early Childhood Caries. Oral Health Prev Dent. 2020;18(1):911-919.
108. Struzycka I. The oral microbiome in dental caries. Pol J Microbiol. 2014;63(2):127-35.
109. Takayasu L, Suda W, Takanashi K, Iioka E, Kurokawa R, Shindo C, Hattori Y, Yamashita N, Nishijima S, Oshima K, Hattori M. Circadian oscillations of microbial and functional composition in the human salivary microbiome. DNA Res. 2017;24(3):261-270.

110. Takeda R, Sawa H, Sasaki M, Orba Y, Maishi N, Tsumita T, Ushijima N, Hida Y, Sano H, Kitagawa Y, Hida K. Antiviral effect of cetylpyridinium chloride in mouthwash on SARS-CoV-2. *Sci Rep.* 2022;12(1):14050.
111. Tartaglia GM, Kumar S, Fornari CD, Corti E, Connelly ST. Mouthwashes in the 21st century: a narrative review about active molecules and effectiveness on the periodontal outcomes. *Expert Opin Drug Deliv.* 2017;14(8):973-982.
112. Tartaglia GM, Tadakamadla SK, Connelly ST, Sforza C, Martín C. Adverse events associated with home use of mouthrinses: a systematic review. *Ther Adv Drug Saf.* 2019;10:2042098619854881.
113. Thurnheer T, Belibasakis GN. Effect of sodium fluoride on oral biofilm microbiota and enamel demineralization. *Arch Oral Biol.* 2018;89:77-83.
114. Van Leeuwen MP, Rosema NA, Versteeg PA, Slot DE, Van Winkelhoff AJ, Van der Weijden GA. Long-term efficacy of a 0.07% cetylpyridinium chloride mouth rinse in relation to plaque and gingivitis: a 6-month randomized, vehicle-controlled clinical trial. *Int J Dent Hyg.* 2015;13(2):93-103.
115. Wang MF, Marks LE, Frank ME. Taste coding after selective inhibition by chlorhexidine. *Chem Senses.* 2009;34(8):653-66.
116. Witt J, Bsoul S, He T, Gibb R, Dunavent J, Hamilton A. The effect of toothbrushing regimens on the plaque inhibitory properties of an experimental cetylpyridinium chloride mouthrinse. *J Clin Periodontol.* 2006;33(10):737-42.
117. Yamashita Y, Takeshita T. The oral microbiome and human health. *J Oral Sci.* 2017;59(2):201-206.
118. Zajkani E, Norian O, Haghi F, Faghihzadeh S, Gholami N. Comparison of the Effect Of 0.2% Chlorhexidine and Xylitol Plus 920 Ppm Fluoride

Mouthwashes on Count of Salivary Streptococcus Mutants, a Pilot Study. *J Dent (Shiraz)*. 2018;19(4):301-304.

119. Zero DT. Evidence for biofilm acid neutralization by baking soda. *J Am Dent Assoc*. 2017;148(11S):S10-S14.
120. Zhu F, Chen Y, Yu Y, Xie Y, Zhu H, Wang H. Caries prevalence of the first permanent molars in 6-8 years old children. *PLoS One*. 2021;16(1):e0245345.

ANEXOS

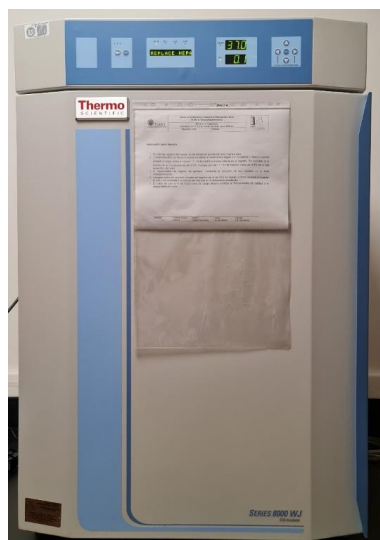


Figura 17. Incubadora estática (Thermo Scientific, modelo Series 8000 WJ).



Figura 18. Sonicador (Branson, modelo 5800).

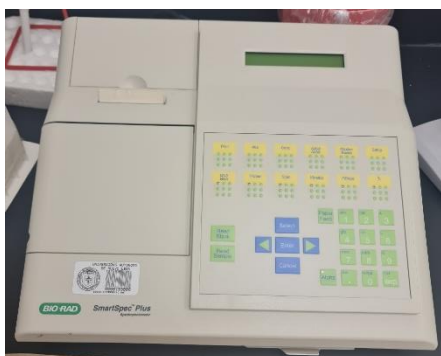


Figura 19. Espectrofotómetro (BIO RAD, modelo SmartSpec Plus).



Figura 20. Centrífuga (Eppendorf, modelo 5810-R)

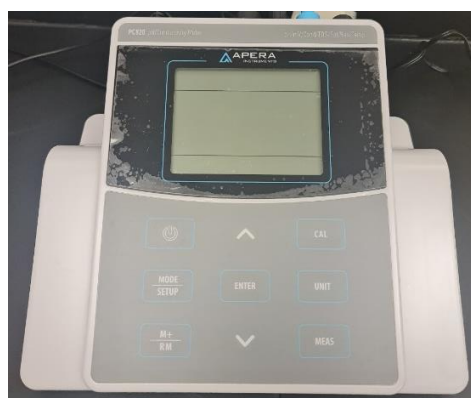


Figura 21. Potenciómetro (Apera Instruments, modelo pH / Conductivity Meter PC820).



Figura 22. Vórtex (DLAB, modelo MXS), báscula (A&D, modelo GR-200).

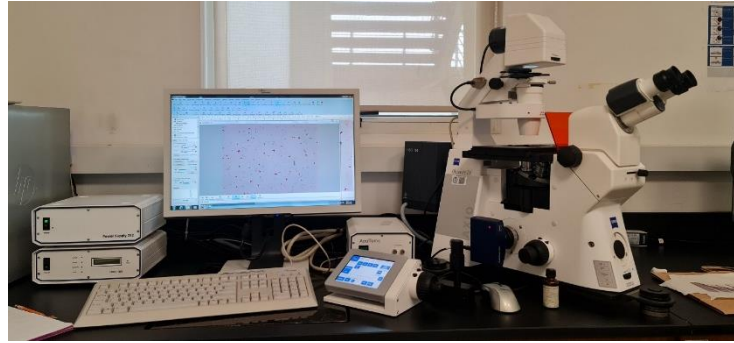


Figura 23. Microscopio invertido Axio Observer.

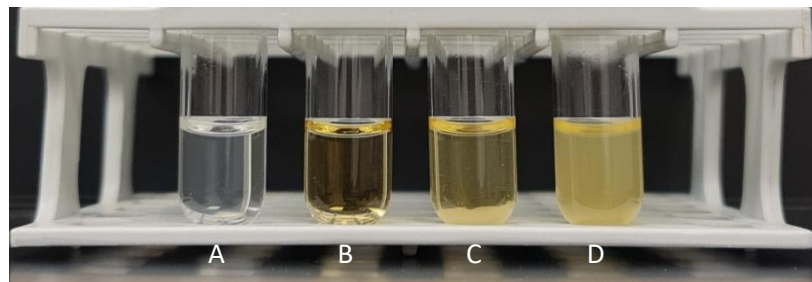


Figura 24. Comparación cualitativa de la turbidez en los diferentes tubos del ensayo de la MIC:
A) Control negativo: agua destilada estéril + *S. mutans*, B) Caldo ICC estéril, C) Solución de NaHCO_3 marca CTR (500 mg/mL) + caldo ICC + *S. mutans*, D) Control de crecimiento: caldo ICC + *S. mutans*.

RESUMEN BIOGRÁFICO

Briana Yarely Medina Lizárraga
Candidata para el Grado de
Maestra en Ciencias Odontológicas en el Área de Odontopediatría

Proyecto de Tesis: “EFICIENCIA EN LA INHIBICIÓN DE *Streptococcus mutans* ENTRE UNA SOLUCIÓN DE BICARBONATO DE SODIO Y ENJUAGUES BUCALES COMERCIALES: ESTUDIO COMPARATIVO *IN VITRO*”.

Campo de Estudio: Ciencias de la Salud

Datos Personales: Nacida en Mazatlán, Sinaloa el 25 de julio de 1995, hija de Trudy Lizárraga Valdez.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Sinaloa, grado obtenido Cirujana Dentista en 2020 con mención honorífica y primer lugar en la generación.

PUBLICACIONES:

Medina-Lizárraga BY, Rocha-Gómez M, Benítez-Pascual J, Lizárraga-Rodríguez D, Arreguin-Ceniceros FG, Nakagoshi-Cepeda SE, Martínez-Rodríguez LE, Solis-Soto JM. Rapid maxillary expansion in children, an update. *Int. J. Appl. Dent. Sci.* 2022;8(2):32-35.

Lizárraga-Rodríguez D, Medina-Lizárraga BY, Salazar-Navarro, LA, Vázquez-Sánchez ME, Moreno-Terrazas E, Benítez-Pascual J. Rehabilitación protésica oral en paciente con labio y paladar hendido, caso clínico. *Rev Mex Med Forense.* 2019;4(1):13-15.

PARTICIPACIONES EN CONGRESOS:

2021. XIII Encuentro internacional de Cuerpos Académicos y grupos de Investigación en Odontología. Participación: **Ponente de Investigación educativa:** “Enseñanza de

medidas de higiene oral a padres de niños preescolares (una herramienta audiovisual) ”.

Facultad de Odontología, Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, N. L.

2019. Curso de Actualización en Investigación Odontológica en el Marco del XI Encuentro Internacional de Cuerpos Académicos y Grupos de Investigación Odontológica. Participación: **Ponente de Caso Clínico:** “*Rehabilitación protésica oral en paciente con labio y paladar hendido*”. Consejo Nacional de Cuerpos Académicos en Odontología. Facultad de odontología, Universidad Veracruzana. Boca del Río, Veracruz.

2018. X Congreso Internacional de cuerpos académicos y grupos de investigación en odontología. Participación: **Ponente de Caso Clínico:** “*Quiste radicular, eliminación y regeneración ósea guiada mediante plasma rico en plaquetas*”. Facultad de Odontología, Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, N. L.

2017. VII Encuentro internacional de grupos de investigación odontológica. IX Encuentro nacional de cuerpos académicos de odontología. II Encuentro de jóvenes investigadores en odontología. Participación: **Ponente de Caso Clínico** “*Reacción liquenoide producida por galvanismo de amalgama*”. Facultad de Odontología, Universidad Autónoma de Tlaxcala.