



Universidad de Valparaíso
Facultad de Odontología
Escuela de Odontología
Cátedra de Microbiología

Efecto de diferentes dentífricos sobre el crecimiento de *Streptococcus mutans*

Trabajo de Investigación
Requisito para optar al
Título de Cirujano Dentista

Alumnos: Marcela Campusano Pozo
Ruth Candia Contreras
Mauricio Gálvez Villalobos

Profesora Guía: Dra. Jenny Llanos Villarreal

Valparaíso
2005

DEDICATORIA

Dedico este Seminario de Tesis a mis padres, Ruth y Joel, por su inmenso apoyo, comprensión, ayuda, paciencia, dedicación, compañía, entrega y sobretodo por su incondicional amor. A mis amados hermanos Joel y Alfredo, por ayudarme y acompañarme siempre que lo necesité, por todo lo que hacen por mí. A Bequi, “*mi amiga*”, por escucharme, darme ánimo en todo momento, por su amistad inigualable y verdadera. A mi familia, por confiar en mí y preocuparse de mi bienestar. A mis compañeros de tesis, Marcela y Mauricio, por su compañía y gran paciencia. Y principalmente a Dios, por su amor y vida, que me han guiado por el camino verdadero hacia Él.

Ruth Noemí

Deseo agradecer a Dios y a la Mater por permitirme estar presente y vivir este momento, a mis queridos abuelitos quienes aún siguen presentes en todas las decisiones que tomo, a mi madre y a mi padre, los cuales cada uno a su manera me mostraron la belleza y nobleza de la profesión de odontólogo, a mi amado esposo Carlos quien me apoya y me anima a superarme, a mi adorada Daniela, que desde que nació ha sido la luz de nuestras vidas. También quiero agradecer a mi hermano y a mi querida familia y amigos que de una u otra forma me apoyaron. Finalmente quiero agradecer a mis amigos y compañeros de tesis Ruth y Mauricio sin cuya comprensión y apoyo no podría haber llegado al final.

Marcela Julieta

Dedico este trabajo de investigación, el cual expresa la culminación de una gran etapa en mi vida, a Dios primeramente por confiarme en su voluntad esta bendición, a mis padres Hernán y Milca, quienes permitieron mi educación durante estos años y facilitaron el estudio, apoyándome en todo. A mis hermanos Hernán, Paula y Rodrigo por acompañarme siempre, siendo uno más de ellos. A mi familia, por el constante interés y buen deseo de lograr mis metas, en especial a mi tío Patricio Gálvez quien procuró que mis estudios siguieran sin interrupción. A mis amigos, quienes alegraron cada momento difícil, y festejaron cada logro alcanzado. A todos los hermanos de la iglesia que se preocuparon, mediante la oración, de allanar el camino para llegar a la meta. A mis compañeras de Tesis: Marcela y Ruth, ¡Dios las bendiga!.

Mauricio

AGRADECIMIENTOS

No podemos dejar pasar este momento para agradecer a las personas que permitieron que nuestro trabajo sea una realidad:

- Dra. Jenny Llanos Villarreal por ayudarnos, guiarnos y apoyarnos durante el proceso de desarrollo del trabajo.
- Dra. Ema Navarrete Borgoño, jefa departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina, por facilitarnos el acceso y uso de las dependencias y materiales del laboratorio de microbiología.
- Dr. Eduardo Piontelli, Sr. Antonio Bastías, Srta. Pamela Faúndez, Sra. Cindy Peña, Sra. María Salce y Sra. Patricia Carvajal por facilitarnos los instrumentos requeridos.
- Srta. Cecilia Levipán por ayudarnos en la determinación de *S.mutans*.

Sr. Luis Donoso, Sr. Manuel Véliz, Sr. Esteban Bravo y Sra. Inelia Bustamante por su importante ayuda en los procedimientos de laboratorio.

-

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
MARCO TEÓRICO	2
1. BIOFILM.....	2
1.1 <i>Formación del Biofilm</i>	2
2. GRUPO <i>STREPTOCOCCUS VIRIDANS</i>	4
2.1 <i>Streptococcus mutans</i>	6
3. CARIES DENTAL	9
3.1 <i>Definición</i>	9
3.2 <i>Etiología</i>	9
3.3 <i>Patocronia</i>	10
4. COMPONENTES DE LOS DENTÍFRICOS Y SUS FUNCIONES.....	13
4.1 <i>Sustancias utilizadas como agentes antiplaca bacteriana</i>	16
PRESENTACIÓN DEL TRABAJO.....	20
OBJETIVO GENERAL.....	20
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
DEFINICIONES OPERACIONALES.....	21
MATERIAL Y MÉTODOS	22
RESULTADOS	26
DISCUSIÓN	32
CONCLUSIONES.....	36
LIMITANTES	37
SUGERENCIAS.....	38
RESUMEN.....	39
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
ANEXO I.....	46
ANEXO II	48
ANEXO III	51
ANEXO IV.....	52
ANEXO V	53

INTRODUCCIÓN

La caries dental es una de las enfermedades con mayor prevalencia en la población mundial. Esta patología de origen infeccioso, al igual que otras enfermedades, no ha podido ser eliminada o llevada a cifras menores. Por ello, como medida de Salud Pública, la prevención de esta enfermedad ocupa un lugar importante, enfocándose fundamentalmente a la eliminación de los microorganismos causales, o bien, a mantenerlos a niveles compatibles con la salud oral.

Streptococcus mutans ha sido identificado como uno de los principales patógenos responsables en la etiología de la caries dental. Esta bacteria forma parte de la microbiota presente en la cavidad oral y participa en la formación del biofilm. Esta organización microbiana perdura en el tiempo sobre las superficies dentarias, ya que aunque se elimine temporalmente, los microorganismos no desaparecen del todo, volviendo a colonizar dichas superficies.

El uso masivo de dentífricos, aplicados como complemento a la técnica de cepillado dental, se ha asociado al control de la placa bacteriana, incluyendo *S. mutans*. Conocido es el efecto cariostático y antibacteriano de la mayoría de los componentes que forman los dentífricos. Sin embargo, una situación es conocer el efecto de un determinado componente sobre el biofilm o sobre una bacteria específica, y otra es considerar el efecto del mismo componente incluido dentro del dentífrico. Lo anterior, lleva necesariamente a considerar que la acción de un compuesto con reconocido efecto cariostático y antibacteriano, se vea modificada cuando dicho elemento forma parte de la composición de un dentífrico. Por esta razón, el resultado que se espera de un dentífrico, además de ser complemento del cepillado, no radica en la acción de un determinado componente, sino más bien en el dentífrico considerado en su totalidad.

El propósito de este estudio fue determinar y comparar el efecto de diferentes dentífricos de uso nacional, y de ciertos compuestos con conocida actividad bacteriostática, sobre el crecimiento de *S. mutans* aislado de la cavidad oral.

MARCO TEÓRICO

1. Biofilm

Desde el nacimiento la cavidad bucal se encuentra expuesta a numerosos microorganismos presentes en el medio ambiente local (Hamada y Slade, 1980; Brown *et al.*, 1991). Estos microorganismos comienzan a establecerse en la cavidad bucal favorecidos por las condiciones nutricionales y fisiológicas allí presentes. Esta colonización incluye las superficies blandas (mucosa oral) y los tejidos duros (dientes). Sin embargo, las condiciones bucales varían en las diversas regiones anatómicas: algunas superficies protegen a los microorganismos de la fricción y fluidos salivales; otras presentan diferencias en la tensión de oxígeno y nutrientes. Debido a esto, hay distintas condiciones ecológicas en la cavidad oral. Esta propiedad del hábitat determina una diversidad en el crecimiento, desarrollo y localización de las bacterias como sucede en lengua, crévice y superficies dentarias. Incluso, en la misma superficie dentaria varían las propiedades biológicas, resultando en diferentes poblaciones de microorganismos (Brown *et al.*, 1991; Marsh, 2003).

La microbiota bucal que coloniza a la superficie dentaria se denomina Placa Bacteriana o Biofilm (Brown *et al.*, 1991). La Organización Mundial de la Salud (O.M.S.) define Placa Bacteriana como:

Una entidad bacteriana proliferante, enzimáticamente activa, que se adhiere firmemente a la superficie dentaria y que por su actividad bioquímica metabólica, ha sido propuesta como el agente etiológico principal en el desarrollo de caries y periodonciopatías (O.M.S., citado en Brown et al., 1991).

En esencia, el Biofilm corresponde a una compleja agregación de múltiples bacterias pertenecientes a diferentes especies que se encuentran inmersas en una matriz extracelular compuesta fundamentalmente de polisacáridos. Se sabe que diversos microorganismos de este ecosistema microscópico tienen la capacidad de producir dextranos extracelulares que actúan como mediadores en los mecanismos de fijación, favoreciendo la adhesión y establecimiento en la superficie de los dientes, especialmente en las zonas difíciles de higienizar. El número de bacterias en el biofilm puede llegar a 10^8 / mg (p/p) (Hamada y Slade, 1980; Brown *et al.*, 1991; Alcaide, 2002).

1.1 Formación del Biofilm

La formación del Biofilm involucra un ordenado patrón de colonización bacteriana. Además depende de una compleja interacción entre las propiedades microbianas, las características físicoquímicas de la saliva y la superficie dentaria. Tan pronto como erupcionan los dientes o éstos son limpiados, comienza la formación del Biofilm. Clásicamente, se describen tres diferentes etapas: Película adquirida, Colonización primaria y Colonización secundaria (Brown *et al.*, 1991; Marsh, 2003).

- 1.1.1. La película adquirida es de origen salival, y consiste en la aposición de una capa orgánica acelular, que se forma gracias a fenómenos de adsorción selectiva de glucoproteínas específicas y degradación bacteriana sobre la superficie dentaria. La película adquirida se compone principalmente de aminoácidos y glucoproteínas salivales, que se depositan sobre la superficie dentaria, y en ella se identifican tres capas (Hamada y Slade, 1980; Brown *et al.*, 1991):
- i) Cutícula sub-superficial: es una red de fibrillas de 2 a 3 μm de espesor que se extienden al interior del esmalte.
 - ii) Cutícula superficial: material amorfo de 0,2 a 5 μm o más, que recubre la superficie del esmalte.
 - iii) Película manchada: es una capa lisa pardusca que ha incorporado pigmentos, de 1 a 10 μm de grosor, que puede ser parte externa de la cutícula.
- 1.1.2. La Colonización Primaria es llevada a cabo por bacterias que en las primeras 24 a 48 horas se compone principalmente de formas cocáceas pertenecientes al género *Streptococcus*, en especial *Streptococcus mutans*, el cual se ve ayudado en este proceso por su propia producción de polisacáridos extracelulares, factor que contribuye a la virulencia de este microorganismo. La adherencia de las bacterias es glucano-dependiente, y junto a la acumulación de *Streptococcus* cariogénicos son procesos críticos en el desarrollo del Biofilm patogénico (Brown *et al.*, 1991; Schilling y Bowen, 1992). Esta colonización modifica las condiciones del ambiente, proporcionando sitios más apropiados para especies aún más patógenas (Marsh, 2003).
- 1.1.3. La Colonización Secundaria es un proceso progresivo de agregación bacteriana, mediante los mismos mecanismos de adhesión de la colonización primaria. Los microorganismos van ocupando los nichos ecológicos disponibles, lo cual da como resultado la formación del Biofilm. Si bien las bacterias que componen el Biofilm varían de un individuo a otro dependiendo del tiempo y de la región que se analice, existe una composición microbiológica común, la cual se resume en la tabla I (Hamada y Slade, 1980; Brown *et al.*, 1991, Marsh, 2003). Aunque 200 a 300 especies bacterianas han sido asociadas al Biofilm dental, sólo la presencia de *S. mutans* es vinculado directamente a la formación de caries dental (Ajdic, 2002).

Tabla I: Grupos de bacterias predominantes de la superficie dentaria (Adaptado de Marsh, 2003)

	Porcentajes de viables		
	Fisuras	Superficies Proximales	Crévice
Bacteria			
<i>Streptococcus</i>	8 – 86	< 1 – 70	2 – 73
<i>Actinomices</i>	0- 46	4 – 81	10 – 63
GPR ¹	0 – 21	0 – 6	0 – 37
<i>Neisseria</i>	+ ²	0 – 44	0 – 2
<i>Veillonella</i>	0 – 44	0 – 59	0 – 5
GNR ¹	+ ²	0 – 66	8 – 20
<i>Treponema</i>	-	-	+ ²

1: GPR y GNR Bacilos estrictamente anaerobios Gram positivos y Gram negativos respectivamente.

2: ocasionalmente detectado.

2. Grupo *Streptococcus viridans*

Como se observa en la Tabla I, el mayor porcentaje de microorganismos constituyentes de la flora bacteriana oral normal corresponden a microorganismos pertenecientes al género *Streptococcus*, y más específicamente, estreptococos del grupo viridans, también llamados estreptococos orales (Liébana, 1995; Alcaide, 2002; University of New Castle, 2005a). Taxonómicamente, los *Streptococcus* pertenecen a la Familia *Streptococcaceae*, Orden *Lactobacillales*, Clase *Bacilli*, División *Firmicutes* (Madigan *et al.*, 2003; Swiss Institute of Bioinformatics, 2005). Los estreptococos de este grupo, poseen las características comunes del género *Streptococcus*. Por lo tanto, se trata de cocos Gram positivos, anaerobios facultativos, asociados en cadenas o parejas, que no producen catalasa y que fermentan la glucosa con producción de ácido láctico. El término viridans deriva del latín *viridis*, que significa verde, ya que producen, en su mayoría, unas colonias pequeñas en agar sangre rodeadas de un halo estrecho de hemólisis verde debido a una destrucción incompleta de los eritrocitos (hemólisis α). En este grupo de microorganismos se incluyen aquellos estreptococos que, sin ser β -hemolíticos (con algunas excepciones en *Streptococcus anginosus*), no poseen antígenos de pared de los grupos B o D, no crecen en caldo con 6,5% de cloruro de sodio y no son solubles en bilis ni inhibidos por la optoquina (Alcaide, 2002; Facklam, 2002; University of New Castle, 2005a).

Actualmente, este grupo heterogéneo de cocos Gram positivos, presenta dificultades para su identificación a nivel de especies. A finales de la década de los 60, se pasó de una denominación genérica de estreptococos “no hemolíticos” o “ α -hemolíticos” a esquemas taxonómicos en función de propiedades bioquímicas y fisiológicas, estudios de transformación y análisis de la pared bacteriana. Bajo estos criterios, diferentes sistemas de clasificación han sido propuestos en las últimas décadas (Tabla II). Sin embargo, en la década pasada con el desarrollo de las técnicas moleculares se llevaron a cabo estudios genéticos que provocaron cambios

importantes a nivel de taxonomía y nomenclatura del género *Streptococcus*. A pesar de esto, para los *Streptococcus* del grupo viridans, no se ha logrado un consenso general sobre la denominación de las especies que lo integran. Basándose en la definición genética y su correlación con las características fenotípicas útiles en las pruebas de laboratorio, Coykendall en 1989 propugnó una clasificación basada en 5 grupos (Tabla II). Esta clasificación incluye prácticamente todas las especies aisladas en las muestras clínicas y constituye un esquema de clasificación fácil para los microbiólogos. Posteriormente, en 1997, Bruckner y Colonna, en una actualización sobre nomenclatura, taxonomía y clasificación, persisten en el establecimiento de 5 subgrupos dentro de los *Streptococcus* viridans, cambiando sólo la denominación de *S. anginosus* por *S. milleri* (Tabla II; Alcaide, 2002; Facklam, 2002).

Dentro del grupo *Streptococcus mutans* se agrupan 6 especies (Tabla III), las cuales pueden identificarse rápidamente mediante técnicas de inmunodifusión en agar (Huerta, 1975). De estas especies, *S. mutans* es el agente más importante implicado en el desarrollo de la caries dental (Alcaide, 2002; Linossier *et al.*, 2003; Gamboa, 2004; Huerta, 1975; Michael, 2005).

Tabla II: Clasificaciones de los *Streptococcus* del grupo viridans (Alcaide, 2002)

Colman y Williams¹ (1972)	Flackman¹ (1977)	Coykendall¹ (1989)	Bruckner y Colonna¹ (1997)
<i>S. salivarius</i>	<i>S. salivarius</i>	<i>S. salivarius</i>	<i>S. salivarius</i>
<i>S. mitior</i>	<i>S. mitis</i> <i>S. sanguis II</i>	<i>S. mitis</i>	<i>S. mitis</i>
<i>S. sanguis</i>	<i>S. sanguis I</i>	<i>S. sanguis</i>	<i>S. sanguis</i>
<i>S. milleri</i>	<i>S. intermedius</i> <i>S. anginosus-constellatus</i>	<i>S. anginosus</i>	<i>S. milleri</i>
<i>S. mutans</i>	<i>S. mutans</i> <i>S. morbillorum</i> <i>S. acidominimus</i> <i>S. uberis</i>	<i>S. mutans</i>	<i>S. mutans</i>

¹ citados en Alcaide (2002).

Tabla III: Identificación bioquímica básica del grupo *Streptococcus viridans* (Alcaide, 2002):

Especies	Hemólisis	Pruebas bioquímicas ¹				
		VP	ARG	ESC	MAN	SOR
Grupo <i>Streptococcus mutans</i> <i>S. mutans</i> <i>S. rattus</i> <i>S. cricetus</i> <i>S. sobrinus</i> <i>S. ferus</i> <i>S. macacae</i>	α, γ	+	- ²	+	+	+
Grupo <i>Streptococcus salivarius</i> <i>S. salivarius</i> <i>S. thermophilus</i> <i>S. vestibularis</i>	α	+ ³	-	+	-	-
Grupo <i>Streptococcus sanguis</i> <i>S. sanguis I</i> <i>S. crista</i> <i>S. gordonii</i> <i>S. parasanguis</i>	α	-	+ ⁴	+	-	-
Grupo <i>Streptococcus mitis</i> <i>S. mitis</i> <i>S. oralis</i> <i>S. sanguis II</i>	α	-	-	-	-	-
Grupo <i>Streptococcus anginosus</i> (o <i>Streptococcus milleri</i>) <i>S. anginosus</i> <i>S. constellatus</i> <i>S. intermedius</i>	α, β, γ	+	+	+/-	+/-	-

¹VP: Voges-Proskauer; ARG: hidrólisis de la arginina; ESC: hidrólisis de la esculina; MAN: fermentación del manitol; SOR: fermentación del sorbitol.

²*S. rattus* es positivo para la arginina.

³*S. vestibularis* es variable para el VP.

⁴*S. crista* puede ser negativo para la arginina.

2.1 *Streptococcus mutans*

Streptococcus mutans, aislado desde una lesión cariosa, fue descrito por primera vez en 1924 por J.K. Clarke. Sin embargo sólo en 1960 se dio real interés a este microorganismo (Hamada y Slade, 1980; Loesche, 1986; University of New Castle, 2005b).

Estructuralmente no difieren del modelo general de todos los estreptococos, así se trata de cocos Gram positivos de 1 μm de diámetro, asociados en cadenas o parejas (Liébana, 1995; Alcaide, 2002).

Desde el punto de vista metabólico, son fundamentalmente anaerobios facultativos, α y γ hemolíticos, catalasa negativos. Su metabolismo es fermentativo con rápida producción de ácido láctico, proceso que lleva a un descenso en el pH del medio, originalmente de 7 hasta 4,2 (Hamada y Slade, 1980), lo cual es su principal característica (Liébana, 1995; Alcaide, 2002; Acta Odontológica Venezolana, 2003; University of New Castle, 2005b). Difiere del resto de los *Streptococcus* en que no presenta cápsula, polisacárido C (antígeno de superficie), ni complejos fibrilares, y las fimbrias si existen no son prominentes. En la pared destacan proteínas con diferentes funciones, y polisacáridos diferentes del C, en cuya composición hay glucosa, ramnosa y galactosa, las cuales tienen especificidades antigénicas que lo distinguen en ocho diferentes serotipos: a, b, c, d, e, f, g y h (Hamada y Slade, 1980; Loesche, 1986; Liébana, 1995), siendo el serotipo c el más prevalente en la población humana (Linossier *et al.*, 2003; Gamboa, 2004). Estos serotipos no tienen relación con el sistema de Lancefield¹, excepto el grupo e (Hirasawa y Takada, 2003; Palavecino, 2004; University of New Castle, 2005b).

Para *S. mutans*, el sustrato más importante en relación con su rol como agente etiológico de la caries, es la sacarosa, y de su metabolismo derivan la producción de ácidos y la síntesis de polisacáridos, siendo capaz de realizar las diversas funciones en condiciones de extrema acidez, por lo que es considerado el más cariogénico de todos los estreptococos orales (Liébana, 1995; Acta Odontológica Venezolana, 2003; Ajdic, 2002).

S. mutans emplea la mayor parte de la sacarosa como fuente de energía para su desarrollo. Para ello posee enzimas invertasas que originan fructosa y glucosa. Ambos azúcares entran a la vía glucolítica para producir fundamentalmente ácido láctico, pues esta bacteria es prácticamente homoláctica, aunque también produce pequeñas cantidades de formato, acetato y etanol (Liébana, 1995).

En cuanto a los polisacáridos de *S. mutans*, sólo una pequeña parte de la sacarosa es destinada a su producción. Estos polisacáridos se pueden clasificar en intra y extracelulares:

- Los polisacáridos intracelulares se encuentran localizados cerca de la membrana celular y provienen de la hidrólisis de la sacarosa. Estos polisacáridos, de color blanquecino, altamente solubles en agua y no susceptibles al ataque de enzimas extracelulares, corresponden a una forma de reserva de energía (Huerta, 1975). Las macromoléculas que forman los polisacáridos intracelulares son glicógeno y amilopectina. Al producirse el catabolismo de éstos, ocurren cambios en el pH, debido a la conversión de glicógeno en ácido láctico, lo que acidifica el medio. Se ha demostrado que la acumulación de polisacáridos intracelulares ocurre 3 minutos después de un enjuagatorio con solución de glucosa o sacarosa al 10% (Huerta, 1975; Acta Odontológica Venezolana, 2003), lo cual se relaciona con mayor riesgo de caries. Además, los polisacáridos intracelulares tienen ciertas propiedades, como la yodofilia, es decir, la capacidad de teñirse con soluciones de yodo o lugol. Esto

¹ Sistema de Lancefield: Clasificación de los estreptococos basada en el grupo serológico bacteriano. Considera la naturaleza antigénica de los carbohidratos de la pared celular (Polisacárido C). Este esquema se basa en reacciones de aglutinación de anticuerpos específicos de antígenos del Polisacárido C. Cada serotipo diferente es un grupo de Lancefield y se identifica por una letra, desde la A hasta la O.

demuestra la calidad de glicógeno y amilopectina de estos polisacáridos. De este modo, al agregar yodo a una colonia, los polisacáridos intracelulares y la misma colonia se tiñen de coloración rojiza café, típica de la reacción amilopeptínica con yodo.

- Los polisacáridos extracelulares también derivados de la sacarosa son el dextrano y el levano, los cuales son producidos por la acción de enzimas exógenas. El dextrano deriva de la fracción glucosa y el levano de la fracción fructosa. Para su formación se requiere el rompimiento del enlace glucosídico de la sacarosa, lo cual libera la energía necesaria para la síntesis de los polisacáridos extracelulares. Estos polisacáridos son fácilmente precipitados con etanol al 95%. Se ha considerado que la habilidad de formar dextrano es la que otorga primordialmente la característica cariogénica a *Streptococcus mutans* (Huerta, 1975). Estos polisacáridos son los mediadores en los mecanismos de fijación que favorecen el establecimiento de nichos en las superficies dentarias, debido a sus propiedades físicas tales como gran adhesividad (Alcaide, 2002).

2.1.1 Cultivo de *S. mutans*

Su temperatura óptima de desarrollo es $36 \pm 1^\circ\text{C}$. Debido a que genéticamente es una especie heterogénea las características morfológicas de sus colonias varían notablemente de un medio de cultivo a otro (Huerta, 1975; Hamada y Slade, 1980; Liébana, 1995). Aunque *S. mutans* puede multiplicarse en aerobiosis, se aconseja incubarlo en anaerobiosis por 24 horas y posteriormente otras 24 horas en aerobiosis (Hamada y Slade, 1980; Liébana, 1995).

Estas bacterias son nutricionalmente fastidiosas, ya que para su crecimiento necesitan de un medio con alta cantidad de nutrientes. Por esta razón, para su crecimiento se usa caldo cerebro-corazón (Anexo II), al cual se le puede agregar cierta cantidad de agar (Lenander *et al.*, 1997; Sasaki *et al.*, 2004; Takarada *et al.*, 2004; University of New Castle, 2005c).

Para su reconocimiento y como medio poco selectivo puede usarse Agar Mitis Salivarius (MSA), que contiene 5% de sacarosa, azul tripán, cristal violeta y telurito de potasio al 1% como sustancia inhibidora de otros microorganismos (Difco, 1978; Hamada y Slade, 1980; Liébana, 1995; Lenander *et al.*, 1997; Sasaki *et al.*, 2004).

Como medio más selectivo se utiliza habitualmente Mitis Salivarius Bacitracina (MSB), que es MSA más 0,2 U/mL de bacitracina y 15 gramos más de sacarosa por 100 ml de medio (Hamada y Slade, 1980; Loesche, 1986; Liébana, 1995).

Las colonias en MSA y MSB aparecen elevadas, convexas, onduladas, opacas, de color azul oscuro, con márgenes irregulares, superficie granular, más o menos adheridas y con una burbuja de color brillante rodeándolas cuando producen polisacáridos extracelulares (Liébana, 1995).

Se han desarrollado otros medios de cultivo para el reconocimiento de *S. mutans*, como el agar TYCSB, con tripticasa, extracto de levadura, cisteína, sacarosa y bacitracina (Loesche, 1986; Linossier y Pizarro, 1987; Linossier *et al.*, 2003; University of New Castle, 2005c). Este medio permite en anaerobiosis, un desarrollo de *S. mutans* 50% mayor que en MSA. En este medio, se producen formas coloniales diferenciables de otras bacterias, por ser: blancas, relativamente planas, de superficie brillante y redondas, con un contorno delgado de 1,5 mm de diámetro, radiadas y con líneas concéntricas (Huerta, 1975).

Sin embargo, y como ya se mencionara anteriormente, el aspecto de las colonias puede variar mucho no sólo entre la especie, sino también entre cepas de la misma especie, lo cual a menudo dificulta su reconocimiento.

3. Caries Dental

3.1 Definición

Se define caries dental como un proceso patológico infecto contagioso, multifactorial, localizado y comúnmente crónico, que causa la desmineralización del tejido duro del diente y finalmente su cavitación (Alcaide, 2002; Acta Odontológica Venezolana, 2003).

Su incidencia en la población mundial es de aproximadamente un 94% y en Chile de un 98% (Mariné *et al.*, 1997). Ecológicamente se considera que la caries es consecuencia de un desequilibrio en el ecosistema oral que lleva al predominio de una flora antes considerada normal en la cavidad oral y ahora convertida en patógena (Marsh, 2003; Gamboa *et al.*, 2004). Hasta hace pocos años, el manejo de esta patología era eminentemente curativa, casi sin considerar acciones preventivas. Sin embargo, los resultados de esta acción curativa en la disminución de los índices de la enfermedad eran poco alentadores. Así, la ciencia odontológica, desarrolló el concepto de prevención, y comenzó a enfocar su tratamiento mediante la intervención en la fase previa a la enfermedad o en sus fases iniciales (Mariné *et al.*, 1997).

3.2 Etiología

Su aparición depende de tres factores primarios (Triada de Keyes), interrelacionados en el tiempo (Brown *et al.*, 1991):

- i) 1.- El *huésped* representado por los dientes.
- ii) 2.- La *microbiota* de la región.
- iii) 3.- La *dieta* consumida.

Además existen factores secundarios tales como la saliva, la exposición al flúor, la higiene oral, entre otros.

La caries como enfermedad infecto contagiosa fue demostrada inicialmente por Keyes en 1960 (Brown *et al.*, 1991). El principal agente causal es *S. mutans*, cuya transmisión se realiza a través del intercambio de saliva (Hamada y Slade, 1980; Loesche, 1986; Ajdic, 2002; Hirasawa y Takada, 2003; Linossier *et al.*, 2003). La colonización temprana del *S. mutans* en la boca de los niños depende de la transmisión en las familias, siendo la principal de origen materno. Algunos estudios han demostrado cierto grado de relación entre la actividad cariogénica del niño y los niveles de *S. mutans* presentes en la saliva de sus madres. El contagio se produce cuando la madre besa en la boca a su hijo, limpia con su boca el chupete, prueba la temperatura del alimento o cuando traspasa algún dulce o alimento desde su boca a la del hijo (Caufield *et al.*, 1993).

Ya en 1960, Keyes (Brown *et al.*, 1991), observó que los miembros de una colonia de hámster sin caries, poseedores de una microbiota autóctona, sólo desarrollaban caries cuando eran contaminados por ciertos estreptococos específicos, provenientes de lesiones de caries activas de hámster.

La asociación de *S. mutans* con la caries se refleja en varios aspectos (Hamada y Slade, 1980; Mariné *et al.*, 1997):

- i) *S. mutans* necesita superficies dentarias para colonizar, por lo tanto no se encuentra antes de la erupción dentaria ni después de las exodocias.
- ii) El desarrollo de caries sobre superficies que antes estaban sanas, es siempre precedido por una elevación de los niveles de *S. mutans*.
- iii) El biofilm proveniente de áreas con caries, presenta una mayor concentración de *S. mutans* que en la placa bacteriana de áreas sin caries.
- iv) *S. mutans* es el principal productor de ácido *in vivo* cuando el pH es tamponado a niveles de acidez necesarios para iniciar la desmineralización del esmalte.
- v) *S. mutans* tolera el aumento de sacarosa (20 – 50%) y en estas condiciones produce altos niveles de ácido láctico

3.3 Patocronia

Para comprender de mejor manera el desarrollo del proceso infeccioso, es necesario conocer la estructura dentaria, la cual se resume en el Cuadro Explicativo 1.

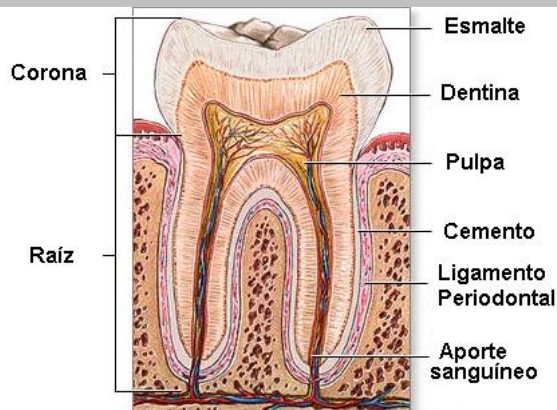
Durante el desarrollo del proceso infeccioso se pueden distinguir 2 fases: una subclínica y otra clínica.

- i) *Subclínica:*
 - Contagio con *S. mutans*
 - Pérdida de minerales a nivel molecular

- ii) *Clínica*
 - Lesión visible clínicamente
 - Formación de cavidad
 - Destrucción coronaria
 - Diseminación de la infección

Al administrar azúcares sobre el Biofilm, el pH de la cavidad bucal disminuye rápidamente, desde 7 hasta incluso bajo 5,5. Luego, a los 20 minutos, el pH se restablece. Esta disminución del pH se debe a la producción de ácido láctico, generado principalmente por la actividad fermentadora de *S. mutans*. Estos ácidos alcanzan la superficie dentaria, produciendo una desmineralización en el esmalte, lo cual se aprecia clínicamente como una mancha blanca en el diente, siendo ésta, la primera señal del proceso. En esta etapa, el esmalte dañado presenta 4 capas: Zona superficial de esmalte; cuerpo de la lesión; zona oscura; y zona translúcida (Fig. 1a). Estas zonas poseen diferentes porosidades, siendo la más permeable el cuerpo de la lesión, con gran pérdida de mineral, lo que llevará consecuentemente a la pérdida de estructura (cavitación). El diente será más resistente a esta desmineralización si posee en su estructura fluoruros, los cuales pueden ser incorporados a su porción inorgánica tanto en la odontogénesis como después de la erupción. También es posible que los ácidos producidos en la placa bacteriana penetren hasta la dentina descalcificándola antes que el esmalte se cavite. Estos ácidos llegan desde el esmalte y difunden por el LAD, propagándose y produciendo respuesta a nivel de tejido odontoblástico, el cual comienza a calcificar los túbulos dentinarios, liberándose Calcio, reteniendo así los ácidos y obliterando los túbulos. Se forma así la dentina esclerótica (Fig. 1b). Además, a nivel del cuerpo del odontoblasto, hay producción de dentina reparativa, y como consecuencia de esto hay una estrechez de la cámara pulpar. Cuando la superficie del esmalte se fractura, se produce la penetración de microorganismos, sobretodo *S. mutans* acidógenos (Munson *et al.*, 2004), los cuales se alojan en los túbulos dentinarios, alternando procesos de desmineralización y proteolíticos, afectando la porción inorgánica y orgánica respectivamente. Toda esta capa es la zona descalcificada e infectada (penetración bacteriana). De inmediato se encuentra la zona descalcificada pero no infectada; la dentina esclerótica; la dentina normal y finalmente la dentina reparativa.(Fig. 1b; Brown *et al.*, 1991).

Cuadro Explicativo 1: Estructura dentaria



Como muestra la figura superior, la estructura dentaria está compuesta por los siguientes tejidos: esmalte, dentina, órgano pulpar y cemento (Gómez de Ferraris, 1999).

Esmalte: Tejido acelular, avascular y aneural. Posee un 96% de sustancia inorgánica, un 2% de sustancia orgánica y un 2% de agua. La sustancia inorgánica está formada fundamentalmente por cristales de hidroxiapatita, constituidos de fosfato de calcio ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). Estos cristales están asociados formando los prismas del esmalte. Los prismas constituyen la unidad estructural del esmalte. Van desde el Límite Amelo-Dentinario (LAD) hasta la superficie del esmalte. La sustancia orgánica corresponde a la sustancia interprismática, de naturaleza esencialmente proteica, y rodea a los prismas. El agua le confiere al esmalte la capacidad de ser permeable a moléculas pequeñas.

Dentina: Tejido conjuntivo acelular y mineralizado, posee un 65% de sustancia inorgánica (principalmente hidroxiapatita), 22% sustancia orgánica (fundamentalmente colágeno) y 13% de agua. En la porción coronaria se haya recubierto de esmalte, y en la región radicular está tapizado por cemento. Internamente la dentina delimita con el órgano pulpar. Su formación y mantenimiento se debe a la secreción de las células mesenquimáticas altamente especializadas, llamadas odontoblastos, cuyo cuerpo celular se encuentra en el órgano pulpar. En la estructura dentinaria hay dos componentes básicos: la matriz mineralizada (producida por los odontoblastos) y los túbulos dentinarios que la atraviesan en todo su espesor, y que alojan a las prolongaciones citoplasmáticas de los odontoblastos. Los cuerpos de los odontoblastos están separados de la dentina mineralizada por una zona de matriz orgánica no mineralizada denominada predentina. Los túbulos van desde la unión odontoblasto-predentina hasta el LAD. Al interior de los túbulos está la dentina intertubular. Rodeándolos se encuentra la dentina peritubular, que es más mineralizada que la anterior. Estructural, embriológica y funcionalmente la dentina y el órgano pulpar conforman una unidad biológica llamada complejo dentino-pulpar, capaz de reaccionar en condiciones fisiológicas y patológicas.

Órgano Pulpar: Forma parte del complejo dentino-pulpar. Es el único tejido blando del diente. Se puede dividir en porción coronaria y porción radicular. Es un tejido conectivo ricamente vascularizado e inervado. En su periferia se ubican los cuerpos odontoblásticos. La pulpa está formada por un 75% de agua y 25% de materia orgánica, constituida por células y matriz extracelular.

Cemento: Tejido mesenquimático calcificado que cubre la raíz anatómica dentaria. No posee irrigación ni inervación. Dentro de sus principales funciones se destacan dar anclaje del diente a su alvéolo y mantener estable las relaciones interoclusales. Su composición es 45% materia inorgánica, 22% materia orgánica y 33% de agua.

Figura Superior modificada de <http://www.MedlinePlusEnciclopediaMédicaAnatomíadeldiente.htm>

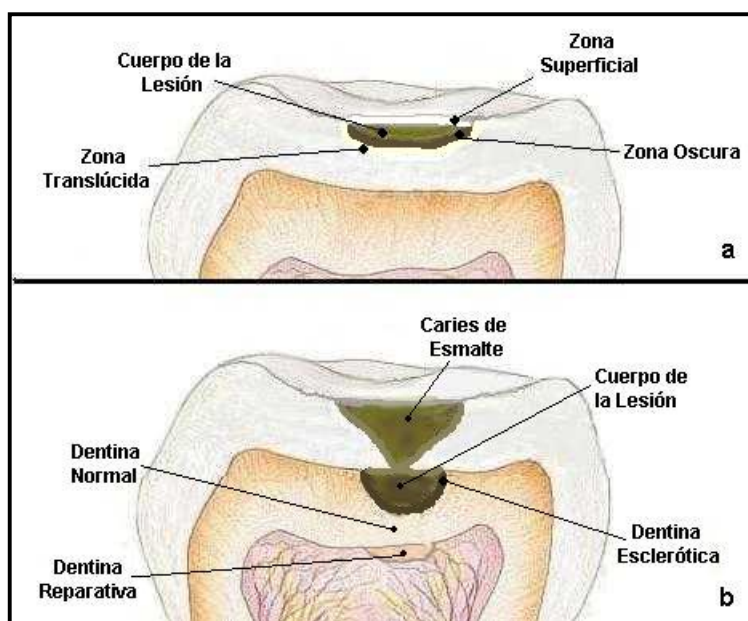


Figura 1: Caries de Esmalte (a); Caries dentinaria (b).

4. Componentes de los dentífricos y sus funciones

En la historia natural de las enfermedades, la prevención cumple una función muy importante, ya que evita la progresión de las mismas. Dentro de las medidas preventivas contra las patologías orales, la higiene bucal tiene un rol fundamental. Antiguamente los elementos utilizados para realizar esta higiene consistían en espinas, astillas, cenizas, piedra pómez, bicarbonato, cáscaras de huevo, orines, etc (Fischman, 1997).

Hoy en día, la tecnología entrega la posibilidad de utilizar, i) el cepillo dental con diversas formas, tamaños, conformaciones y durezas; ii) la seda dental en diferentes presentaciones, grosores y formas; iii) los colutorios y iv) los dentífricos (Reynolds, 1994). Estos últimos han evolucionado recientemente, cambiando su objetivo desde uno principalmente cosmético a uno terapéutico (Reynolds, 1994).

En relación a la salud pública los dentífricos, ya sea en forma de pastas o geles¹, se comportan como un medio masivo de prevención con grandes beneficios para la población mundial (Coppén, 1995). Su utilidad en el control de la caries dental ha sido extensamente

¹ A diferencia de las pastas dentales, los geles se caracterizan por ser menos espesos no hacer espuma y no llevar abrasivos, presentando una acción principalmente terapéutica y más prolongada.

documentada, reconociéndose como el método más simple y racional de aplicación en individuos de todas las edades (OMS, 1994; citado en Gómez *et al.*, 1991). Además, su capacidad de actuar contra la inflamación de las encías es innegable.

Los dentífricos (Triratana, 2002) presentan una formulación compleja, en la cual cada componente cumple una función específica. Como se observa en la tabla IV, algunos de estos compuestos tienen un rol netamente estructural, destinado a darle al dentífrico estabilidad, textura, sabor, durabilidad, entre otros. En esta categoría se encuentran los conservantes, anticorrosivos, humectantes (o humidificantes), saborizantes, aromatizantes, edulcorantes, conservantes, colorantes y anticorrosivos del tubo. Por el contrario, componentes como abrasivos, surfactantes (o detergentes), compuestos fluorurados, antiinflamatorios o epitelizante, cumplen una función tanto preventiva como terapéutica, ya sea favoreciendo una mejor higiene bucal (abrasivos, detergentes), inhibiendo la formación del biofilm o fortaleciendo la estructura dentaria para impedir la formación de caries.

Los *abrasivos* son componentes necesarios para una mayor eficiencia del dentífrico. Ellos tienen como función eliminar, durante el cepillado, los depósitos acumulados sobre los dientes y las manchas; para esto su dureza varía entre la de la dentina y la del esmalte, es decir, va de 50 a 200 RDA (Abrasión de la Dentina Radioactiva; Odontocat, 2001).

Los *desensibilizantes* combaten la excesiva sensibilidad dentinaria, llamada también hiperestesia dentinaria (dientes sensibles), que es el aumento de esta frente a los cambios térmicos (frío y caliente), a los ácidos (naranjas, limones, vinagres, etc.), a los dulces o al simple efecto mecánico de roce sobre la superficie del diente. El tratamiento de esta afección, pasa por bloquear, con sales de oxalato, los mecanismos de transmisión mediante la oclusión de los túbulos dentinarios y el bloqueo con sales de potasio de la transmisión nerviosa a través de los nervios pulpares (<http://www.odontocat.com/dentolca.htm> [Accesado el 13 de mayo de 2005]).

Por lo general, las sustancias *desensibilizantes* (Tabla IV), son muy efectivas, pero el tratamiento debe seguirse de forma prolongada, ya que al suspenderlo, el problema de hipersensibilidad suele volver a presentarse. Para potenciar su efecto, estas sustancias pueden combinarse con otros compuestos, así podemos encontrar combinaciones de nitrato de potasio con fluoruro sódico, con monofluorfosfato de sodio o con fluorhidrato de nicometanol.

Los *saborizantes*, generalmente aceites, tienen como función dar sabor a los dentífricos durante su uso y además, dejar un sabor fresco en la boca (Forward *et al.*, 1997).

Los *surfactantes* o *detergentes* son agentes tensoactivos que tienen por finalidad:

- i) disminuir la tensión superficial
- ii) penetrar y solubilizar los depósitos que hay sobre la superficie dentaria [1]
- iii) convertir lípidos y grasas en miscelas que se dispersan y mantienen en el agua jabonosa
- iv) prevenir la coalescencia de las miscelas, evitando que se depositen nuevamente
- v) Además los *detergentes* confieren a las pastas dentales la cualidad de formar espuma (Reynolds, 1994; Takarada *et al.*, 2004; Shapiro *et al.*, 1994).

Tabla IV: Componentes de los dentífricos y sus usos.

Componentes	Función	Ejemplos
Terapéuticos y preventivos		
Abrasivos	Eliminan los depósitos acumulados sobre los dientes	alúmina, sílica hidratada, pirofosfato de calcio, carbonato de calcio, trisilicato de magnesio y geles de sílica.
Antiinflamatorios y epitalizantes	Favorecen la regeneración o epitelización de la mucosa.	alantoína, aldioxo, provitamina B5, vitamina P, enoxolona, vitamina E y ácido hialurónico.
Blanqueadores	Contribuyen a blanquear los dientes y eliminar las manchas	sílice, dióxido de titanio, óxido de aluminio, carbonato de calcio y fosfato de calcio entre otros.
Desensibilizantes	Previenen el aumento de la sensibilidad dentaria	nitrate de potasio, cloruro de estroncio
Enzimas	Actúan sobre la placa bacteriana	glucosa oxidasa, amiloglucosa oxidasa, lactoperoxidasa y glucolactoperoxidasa.
Compuestos fluorurados	Aumentan la resistencia del esmalte y favorecen su remineralización, actúan sobre el metabolismo de bacterias	fluoruro de sodio,
Detergentes	Solubilizan los depósitos que hay sobre los dientes y facilitan la dispersión de los agentes activos	laurilsulfato de sodio, laurilsarcosinato de sodio y laurilsulfoacetato de sodio.
Sustancias antiplaca bacteriana	Eliminan a los microorganismos que forman la placa bacteriana	clorhexidina, triclosán.
Estructurales		
Colorantes	Confieren al dentífrico un aspecto agradable	rojo, verde (D & C), azul y blanco (dióxido de titanio).
Espesantes	Le dan una cierta consistencia al dentífrico en boca y dentro del tubo.	carragenanos, arcillas, silicatos de sodio aluminio y espesante de sílica
Humectantes	Evitan la pérdida de agua y el posterior endurecimiento del dentífrico dentro del tubo	glicerol, sorbitol, propilenglicol, xilitol y polietilenglicol.
Ligandos	Mantienen íntegro el dentífrico	-gomas naturales: arábica, baraya y tragacant. -celulosas sintéticas como: carboximetil celulosa de sodio, hidroxietil celulosa, éteres de celulosa, alginato de sodio y carbapols.
Preservantes y Anticorrosivos	Evitan la colonización microbiana del dentífrico y evitan la corrosión del tubo	metilparabeno, benzoato de sodio, benzoato de sodio, etilparabeno y diclorofenol.
Saborizantes y edulcorantes	Confieren al dentífrico un sabor agradable	anis, clavos de olor, pimienta, eucaliptos, citrus, mentol, nuez moscada y canela.

Junto a los componentes ya señalados, hay dentífricos que llevan en su composición sustancias naturales que presentan diferentes funciones y actúan en la cavidad oral. Estas son: sanguinaria, manzanilla, eucaliptus, aloe vera, aceite de castor, clavo de olor, tomillo, esencias de orégano, bedelio, salvia y mirra entre otros.

4.1 Sustancias utilizadas como agentes antiplaca bacteriana

La función antiplaca de algunos dentífricos se logra a través de diversos agentes químicos, los cuales actúan eliminando los microorganismos que forman el biofilm, inhibiendo la formación de su matriz y eliminando el biofilm ya formado. Los componentes antiplaca más usados son la clorhexidina, el triclosán, la hexetidina, la sanguinaria, el citrato de zinc y los fluoruros.

Clorhexidina:

Es una molécula bicatiónica perteneciente al grupo de las bisguanidinas, que se encuentra en el mercado en concentraciones de 0.12% a 2% en preparaciones de uso oral. Estas concentraciones le confieren un efecto bacteriostático a concentraciones bajas y bactericida a concentraciones mayores. Su acción es pH dependiente y además, se ve muy disminuida en presencia de materia orgánica (McDonnel y Russell, 1999; Foliche *et al.*, 2003; Van Strydonck *et al.*, 2005). Este compuesto tiene una sustantividad (tiempo de actuación) de 7 a 12 horas.

La clorhexidina (CHX) ejerce su efecto bacteriostático o bactericida, debido a que se une a moléculas cargadas negativamente, fundamentalmente a grupos fosfato de los lipopolisacáridos (LPS) de la membrana externa de bacterias Gram negativas. También se une a grupos COOH de las proteínas bacterianas, como por ejemplo, las ATPasas, impidiendo así el transporte de sustancias. Al unirse a la membrana celular bacteriana altera su permeabilidad, su integridad, su estructura organizada. Al interior de la célula coagula constituyentes citoplasmáticos (Filoche *et al.*, 2003; Menendez *et al.*, 2005).

A nivel del esmalte, se une a iones hidroxapatita, compitiendo con *S. mutans* por los sitios de unión al dextrano. Se adhiere también a estructuras orales, sin embargo, en la mucosa oral penetra limitadamente adhiriéndose a las glucoproteínas, donde permanece por horas liberándose gradualmente (Jones, 1997) y uniéndose a las proteínas salivales libres (<http://www.odontocat.com/dentolca.htm> [Accesado el 13 de mayo de 2005]; Fine, 1995; Ciancio, 1995; Menendez *et al.*, 2005).

Cloruro de cetilpiridinio:

El cloruro de cetilpiridinio (CPC) es una molécula orgánica catiónica, con función antiplaca moderada debido a su baja sustantividad. Sin embargo, utilizado junto a la clorhexidina potencia la acción de esta última, reduciendo sus efectos secundarios¹ (Cummins, 1997; McDonnell y Russell, 1999).

Eucaliptus:

Este componente natural tradicionalmente utilizado para tratar enfermedades respiratorias y también problemas de piel, dolores articulares e infecciones bacterianas, tanto en la medicina oriental como en la occidental, es capaz de inhibir el crecimiento de estreptococos orales y bacterias Gram negativas (Coppen, 1995; Takarada *et al.*, 2004).

Triclosán:

El Triclosán (2,4,4'-tricloro-2'-hidroxidifenil éter), es un derivado fenólico no iónico (Ciancio, 1995; Jackson, 1997), soluble principalmente en solventes orgánicos como el etanol (Rolla *et al.*, 1993; Travis, 2000; Brading *et al.*, 2004). Presenta un amplio espectro antibacteriano, afectando tanto a bacterias Gram positivas como Gram negativas (Moran y Newcombe, 1988). Es un agente antiplaca de sustantividad elevada (efecto por 14 horas), que actúa a nivel de la membrana celular, ARN, lípidos y proteínas (Kjaerheim *et al.*, 1994; Brading *et al.*, 2004). Su baja unión a sitios orales se debe a su débil carga positiva, la cual determina que hoy en día se le asocie a iones como zinc y ácido maleico con metoxietileno (gantrez), para darle mejor eficacia (Creeth *et al.*, 1993; Ciancio, 1995; Jackson, 1997).

Sanguinaria:

La sanguinaria, sustancia vegetal alcaloide extraída de la planta *Sanguinaria canadenses* (Ciancio, 1995), ha sido poco estudiada. Su supuesta acción antiplaca, se debe a que se une covalentemente a sulfidrilos reactivos de las células bacterianas, haciéndolas más vulnerables y enzimáticamente menos activas (Fine, 1995).

Hexetidina:

La hexetidina es un antiséptico catiónico con acción antiplaca sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas. Inhibe el crecimiento de los microorganismos en la boca, ya que interfiere con el metabolismo de la tiamina o vitamina B1 (<http://viatusalud.com/documento.asp>?)

¹ Los efectos colaterales indeseables relacionados al uso de clorhexidina son: la generación de manchas sobre los dientes, tinción ligal, formación de cálculo supragingival, alteración del gusto (deja un sabor amargo) y posibles descamaciones de la mucosa bucal (Ciancio, 1995).

ID=6689&alias=HEXETIDINA [Accesado el día 12 de mayo de 2005]; <http://www.farmaciasahumada.cl/stores/fasa/html/MFT/PRODUCTO/P3862.HTM> [Accesado el día 13 de mayo de 2005])

Citrato de zinc:

El citrato de zinc, al igual que otras sales metálicas tiene un efecto antiplaca innegable. Además tiene una acción antisarro ya que evita la calcificación de la misma (<http://www.odontocat.com/dentolca.htm> [Accesado el 13 de mayo de 2005]; Mandel, 1992; Jackson, 1997).

Laurilsulfato de sodio:

El laurilsulfato de sodio es un agente surfactante aniónico empleado en una variedad de formulaciones farmacéuticas. Es un detergente y agente humectante, efectivo en soluciones ácidas o alcalinas y en aguas duras (<http://www.fcq.unc.edu.ar/cime/laurilsulfato.htm> [Accesado el 20 de mayo de 2005]). Su propiedad humectante está ligada a su ionización (Cohen y Burns 1999), confiriéndole todo esto una actividad antibacteriana (Wade y Addy, 1992).

Xilitol:

El xilitol es un compuesto que la mayoría de las bacterias no pueden metabolizar en compuestos cariogénicos. Experiencias *in vitro* muestran que al acumularse intracelularmente en la bacteria, como 5 fosfato xilitol, inhibe el crecimiento bacteriano (Trahan, 1995). El Xilitol cuando es metabolizado por *S. mutans*, es transportado a nivel de la membrana celular y fosforilado por sistemas membranales fosfotransferasas fosfoenolpiruvasa dependientes. El xilitol al ser absorbido lentamente por microorganismos del biofilm, produce una reducción en la formación de ésta y una elevación del pH. Su efecto se produciría entonces por un bloqueo competitivo del sistema fosfotransferasa debido a las similitudes estructurales entre xilitol y sorbitol (Frostell, 1984).

Fluoruros:

Los fluoruros actúan de diversas formas contra el biofilm:

- i) Interfieren con el metabolismo bacteriano, inhibiendo la acción de las enzimas enolasa¹ y peroxidasa² (Loesche, 1982 en Gómez, 1991; Lenander *et al.*, 1997).

¹ Enolasa es una enzima que actúa en la glicólisis, específicamente en la transformación del 3-fosfoglicerato en fosfoenolpiruvato.

² Peroxidasa actúa sobre el peróxido de hidrógeno, una de las formas tóxicas del oxígeno, para transformarlo en agua. (Madigan *et al.*, 2003).

- ii) Inhiben la acidogenicidad *in vitro* a concentraciones menores que en el biofilm (Brailsford *et al.*, 2005).
- iii) Por otro lado poseen una acción anticariogénica al interferir en el proceso de disolución del esmalte y favorecer la remineralización de las zonas desmineralizadas, formando cristales de fluorapatita, que son más resistentes a ser disueltos (Gómez, 1991).

PRESENTACIÓN DEL TRABAJO

En base a los antecedentes expuestos en el marco teórico, se puede concluir que *S. mutans* es el principal patógeno responsable de la etiología de la caries.

Los dentífricos han sido formulados para ser un complemento del cepillado y favorecer el control del biofilm. Éstos, actuarían mediante un control químico, al ser utilizados como vehículos de sustancias con comprobado efecto cariostático y/o antibacteriano. Creemos que a dicho efecto se suma la acción de los demás componentes del dentífrico, como saborizantes, detergentes, preservantes, entre otros. Por lo tanto, se esperaría un efecto diferente a lo descrito sobre *S. mutans*, al existir una asociación de los componentes en las formulaciones y no sólo a la acción de cada uno de ellos por separado.

Es por esto, que en el presente trabajo nos hemos propuesto estudiar, *in vitro*, el efecto de diferentes dentífricos de uso nacional sobre el crecimiento de *S. mutans*. Para ello exponemos la siguiente hipótesis:

Las pastas dentífricas aplicadas in vitro a cultivos puros de S. mutans alteran su crecimiento.

Los objetivos propuestos para probar esta hipótesis son:

Objetivo General

Comparar el efecto de diferentes dentífricos y de ciertos componentes con conocida actividad bacteriostática, sobre el desarrollo de *S. mutans* aislado de la cavidad oral.

Objetivos específicos

1. Aislar *S. mutans* desde una muestra de saliva.
2. Determinar la curva de crecimiento óptima de *S. mutans*.
3. Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de ciertas pastas dentífricas
4. Determinar el efecto de los dentífricos sobre el crecimiento de *S. mutans*.

Definiciones Operacionales

Componente, compuesto o agente activo: compuesto químico que posee una acción terapéutica o preventiva.

Concentración Mínima Inhibitoria (CMI): concentración menor a la que se produce una inhibición del crecimiento microbiano.

Dentífrico: compuesto farmacéutico utilizado como complemento a la higiene oral.

Fase de latencia: período de tiempo que va desde el momento en el cual se inoculan microorganismos en un medio fresco hasta el inicio de la fase de crecimiento exponencial. Durante la fase de latencia no se observa un aumento del número de células.

Pasta control: formulación dentífrica que no contiene compuestos activos.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Aislamiento de *Streptococcus mutans* desde una muestra de saliva

En este estudio se utilizó el kit CRT[®] bacteria (Ivoclar Vivadent, Anexo I), el cual ha sido desarrollado para determinar el número de *S. mutans* y de lactobacilos en muestras de saliva. La muestra se obtuvo desde un donador sistémicamente sano, el cual, de acuerdo a las instrucciones del kit, no había ingerido alimentos ni líquidos, ni se había realizado higiene oral en la hora previa a la obtención de la muestra.

Para estimular la producción de saliva, se hizo masticar al donador una pastilla de parafina durante 5 minutos, tiempo después del cual, escupió la saliva en un frasco estéril. La muestra fue inmediatamente usada para humedecer ambas caras del porta agar: superficie de agar clara para la determinación de lactobacilos y superficie de agar azul para la determinación de *S. mutans*. Finalmente el porta agar inoculado con la muestra, se guardó en el tubo de prueba en cuyo interior se depositó una tableta de NaHCO₃ para generar un ambiente anaerobio. El tubo de prueba conteniendo el porta agar fue incubado a 37° C por 48 horas (Anexo I).

Con el fin de obtener cultivos puros de *S. mutans*, muestras de las microcolonias crecidas sobre la superficie azul del porta agar, fueron sembradas en agar mitis-salivarius (Difco), suplementado con telurito potásico al 1% (1 ml por litro; Anexo II). Para un adecuado aislamiento de las colonias, se usó el procedimiento de agotamiento por estría en placa (Alonso-Urmeneta, 1999). Las placas fueron incubadas a 37° C en condiciones de anaerobiosis por 24 h y luego otras 24 h en aerobiosis (Vitas e Irigoyen, 1999). Después de 48 h, se identificaron y seleccionaron aquellas colonias que presentaron las características típicas de los *Streptococcus* en este medio (Anexo II). De estas colonias se tomaron muestras que fueron nuevamente aisladas en el mismo medio y bajo las mismas condiciones de incubación. Los cultivos puros obtenidos después del aislamiento, fueron sometidas a la tinción de Gram y observadas al microscopio óptico (LEITZ).

Para efectuar una identificación preliminar de *S. mutans*, las colonias cuyas células mostraron una morfología correspondiente a cocos Gram positivos, fueron sometidas a las siguientes pruebas bioquímicas: catalasa, Voges Proskauer, y fermentación de Manitol y Sorbitol.

- Para la prueba de la **catalasa**, un inóculo de cada colonia aislada fue sembrado en agar nutritivo. Después de 24 horas de incubación a 37° C y en anaerobiosis, se agregó sobre el cultivo unas gotas de peróxido de hidrógeno (H₂O₂). La no producción de burbujas se consideró indicativo de un resultado catalasa negativo, propio del género *Streptococcus* (Montiel y Lam, 2001)
- La prueba de **Voges-Proskauer** (VP, fermentación butanodiolica de la glucosa), se realizó inoculando cada colonia pura (cultivo de 12 h), en caldo RM-VP (Difco, Anexo II). Después de 24 h de incubación bajo las condiciones antes señaladas, se agregó al cultivo una gotas de

solución de KOH (40%) y 1 ml de α naftol en solución alcohólica (5%). La mezcla se dejó a 37° C por 20 min. para favorecer la reacción. La formación de un anillo rojizo fue indicativo de un resultado positivo para el género *S. mutans*.

- Finalmente para realizar las pruebas de **fermentación de Manitol (M) y Sorbitol (S)**, un inóculo de cada colonia pura fue sembrado respectivamente en caldo manitol rojo fenol y sorbitol rojo fenol (Difco, Anexo II). Los cultivos fueron incubados por 24 h bajo las condiciones ya señaladas. Se consideró respuesta positiva aquellos cultivos que viraron al color amarillo, indicativo de la producción de ácidos a partir de la fermentación del correspondiente azúcar.

A partir del análisis de estos resultados se seleccionaron dos colonias (cepa 2 y cepa 3), que dieron respuesta VP y Manitol positivas, características que diferencian a *S. mutans* de otras especies del género *Streptococcus* (Ej. *S. salivarius* y *S. mitis*), que son negativas frente a estas pruebas (Alcaide, 2002).

Gracias a la gentil gestión de Cecilia Levipan, representante de ventas de Biomérieux, la identificación definitiva de *S. mutans* (desde las cepas 2 y 3), fue realizada por el sistema automatizado VITEK® (Biomérieux Vitek, Inc., St. Louis, MO), el cual permite identificar especies bacterianas, mediante el análisis de la respuesta frente a variadas pruebas bioquímicas.

2. Determinación de la curva de crecimiento de *Streptococcus mutans*

Los cultivos bacterianos actúan como suspensiones coloidales, absorbiendo y reflejando la luz que incide sobre ellos. La turbidimetría mide, mediante un espectrofotómetro, la cantidad de luz transmitida por la suspensión. Por este procedimiento se puede estimar el número de bacterias en el cultivo, ya que, dentro de ciertos límites, la luz absorbida o difractada por una suspensión bacteriana es directamente proporcional a la concentración de células en el cultivo (Bengoechea y Aragón, 1999). Basados en este principio, y con el fin de determinar el tiempo en el cual *S. mutans* describe la curva de crecimiento completa, se siguió su crecimiento por lectura de la densidad óptica (D.O.) a 550 nm (Shapiro, 1994), en un espectrofotómetro¹ Shimadzu UV-120-11. Para ello, 1,2 ml de un cultivo de *S. mutans* fue inoculado en 84 ml de caldo Cerebro-Corazón (CC) (DIFCO, Anexo II). Inmediatamente 3 ml de esta suspensión (cantidad necesaria para llenar la celda de lectura), previamente homogenizada, fueron usados para medir la D.O. (tiempo = 0 h). El resto de la suspensión fue separada asépticamente en volúmenes de 7 ml en tubos estériles. Todos los tubos fueron incubados a 37° C en cámara de anaerobiosis. Cada una hora uno de estos tubos fue usado para medir la densidad óptica.

¹ El uso del espectrofotómetro se basa en la lectura de la D.O. de fluidos, en este caso de cultivos puros de *S. mutans*. La densidad óptica se corresponde con el grado de absorbancia que se produce cuando el haz luminoso, emitido por el instrumento, se enfrenta con las partículas (células), suspendidas en el fluido.

Tabla V: Dentífricos usados en este estudio

Dentífricos	Componente activo y su concentración en partes por millón (ppm)	Presentación del Componente Activo
Caristop	Ión flúor 2500	Fluoruro de sodio Monofluorfosfato de sodio
Colgate total	Ión flúor 1500 Triclosán 3000	Fluoruro de sodio Triclosán
Colgate Herbal	Ión flúor 1500	Monofluorfosfato de sodio
Colgate Whitening	Ión flúor 1500	Monofluorfosfato de sodio
Crowne	Nitrato de potasio 50.000	Nitrato de potasio
Perio-Aid Gel	Clorhexidina 1200	Digluconato de Clorhexidina
Perio-Aid Colutorio	Clorhexidina 1200	Digluconato de Clorhexidina
Pasta Base Dentífrica	Ausente	

3. Preparación de soluciones stock de cada dentífrico

Los dentífricos usadas en este estudio y sus correspondientes compuestos activos se presentan en la tabla V. La composición de cada uno de estos dentífricos se puede ver en el Anexo III.

Con cada uno de los dentífricos siguientes: Caristop, Colgate Herbal blanqueador (CH), Colgate Total (CT), Colgate Whitening (CW), Crowne y Pasta Control (PC), se preparó una solución madre (Stock) al 1% en agua destilada estéril. Para el caso de Perio Aid, tanto gel como colutorio¹, la solución stock fue preparada al 10%.

Estas soluciones fueron usadas para determinar las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI), y en las experiencias de crecimiento. El cálculo de las concentraciones finales expresadas en partes por millón (ppm), obtenidas al usar las soluciones Stock se presentan en el Anexo IV.

Con el fin de determinar si los demás componentes presentes en un dentífrico (saborizantes, estabilizantes, etc.), alteran el efecto del componente activo sobre *S. mutans*, también se estudió el efecto del ión flúor y del triclosán en solución pura. El ión flúor se obtuvo

¹ Este estudio consideró el uso de colutorio, como otro vehículo de la clorhexidina. Por razones prácticas lo incluimos en el grupo de los dentífricos.

bajo la forma de fluoruro de sodio (NaF), con el cual se preparó una solución stock al 0,33 % (1500 ppm F). En el caso del triclosán, debido a su insolubilidad en agua, éste se preparó en solución alcohólica al 0,3%, usando para ello etanol (96%). Seguidamente, 1 ml de esta solución fue diluido en 100 ml de agua destilada, obteniéndose así una solución stock al 0,003% de triclosán (30 ppm).

4. Determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias

La CMI para cada dentífrico, fue determinada en series de tubos conteniendo 7 ml de caldo CC suplementado con concentraciones crecientes de cada solución stock. Cada uno de estos tubos fue inoculado con 0,1 ml de un cultivo de *S. mutans* en etapa final de crecimiento exponencial (10 h de incubación y D.O. > 0,5). Después de 10 horas de incubación a 37° C y en anaerobiosis, se midió el crecimiento por lectura de la D.O._{550 nm}. El crecimiento de *S. mutans* en caldo CC sin dentífrico, fue usado como control positivo del crecimiento.

5. Estudio del efecto de los dentífricos sobre el crecimiento de *S. mutans*

Para estudiar el efecto de cada dentífrico sobre el crecimiento, 1,2 ml de un cultivo de *S. mutans* en etapa final del crecimiento exponencial, fue inoculado en 84 ml de caldo CC suplementado con una determinada concentración del dentífrico a probar. Inmediatamente, 3 ml de esta suspensión bacteriana, previamente homogenizada, fueron usadas para medir la D.O. (tiempo = 0 h). El resto de la suspensión fue separado asépticamente en volúmenes de 7 ml en tubos estériles (serie de 11 tubos). Todos los tubos fueron incubados a 37° C en cámara de anaerobiosis. Cada 1 hora, uno de estos tubos fue usado para medir la D.O. Al igual que en la determinación de CMI, el crecimiento de *S. mutans* en caldo CC sin dentífrico fue usado como control positivo del crecimiento.

El efecto del flúor y del triclosán en solución pura, se determinó mediante el mismo procedimiento.

RESULTADOS

1. Aislamiento de *S. mutans* desde una muestra de saliva

Dos de las colonias aisladas a partir del cultivo obtenido del kit CRT[®] bacteria, denominadas Cepa 2 y Cepa 3, fueron sometidas al sistema de identificación automatizada Vitek[®], el cual se basa en la respuesta a variados test bioquímicos. Las colonias fueron. Los resultados obtenidos para cada test se presentan en la Tabla VI.

Tabla VI: Resultados para los test Bioquímicos del sistema automatizado Vitek[®]

Prueba	Cepa 2	Cepa 3
Peptona base	+	+
Bacitracina	+	+
Optosina	+	+
Hemicelulosa	+	+
Na Cl 6%	-	-
Bilis 10%	+	+
Bilis 40%	-	-
Esculina	-	-
Arginina	-	-
Urea	-	-
Rojo de tetrazolina	-	-
Novobiocina	+	+
Dextrosa	+	+
Lactosa	-	-
Manitol	+	+
Rafinosa	+	+
Salicina	+	+
Sorbitol	-	-
Sucrosa	+	+
Trehalosa	+	+
Arabinosa	-	-
Piruvato	-	-
Pululano	-	-
Inulina	+	+
Melibiosa	+	+
Melezitosa	-	-
Celibiosa	-	-
Ribosa	-	-
Xilosa	-	-
CAT	-	-
BH/CO	-	-

Los resultados entregados por el sistema automatizado, indican que las cepas aisladas corresponden a:

- Cepa 2: 99% *Streptococcus mutans* y <1% *Streptococcus sanguinis*
- Cepa 3: 99% *Streptococcus mutans* y <1% *Streptococcus sanguinis*

De acuerdo al resultado anterior, la Cepa 2 fue seleccionada para este estudio.

2. Crecimiento de *S. mutans* en ausencia de dentífricos

El crecimiento de *S. mutans* cultivado en caldo cerebro corazón, a 37° C y en anaerobiosis (Fig. 2), muestra que bajo estas condiciones, esta bacteria exhibe una fase de latencia de 5 horas (h), tiempo en que debuta la fase de crecimiento exponencial la cual se extiende por 4 h. Al final de la fase exponencial (9 h de incubación), la D.O. (medida a 550 nm), alcanza un valor máximo promedio de 0,540. Esta densidad se mantiene estable a las 10 y 11 h de incubación, lo que indica un claro establecimiento de la fase de crecimiento estacionario. Este patrón de crecimiento se consideró como el crecimiento óptimo de *S. mutans* bajo las condiciones *in vitro* previamente descritas y establecidas para este estudio.

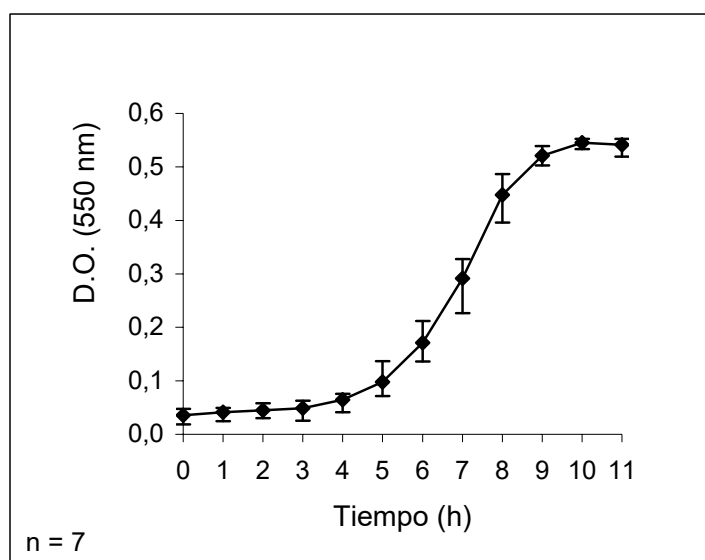


Figura 2: Curva de crecimiento de *S. mutans*

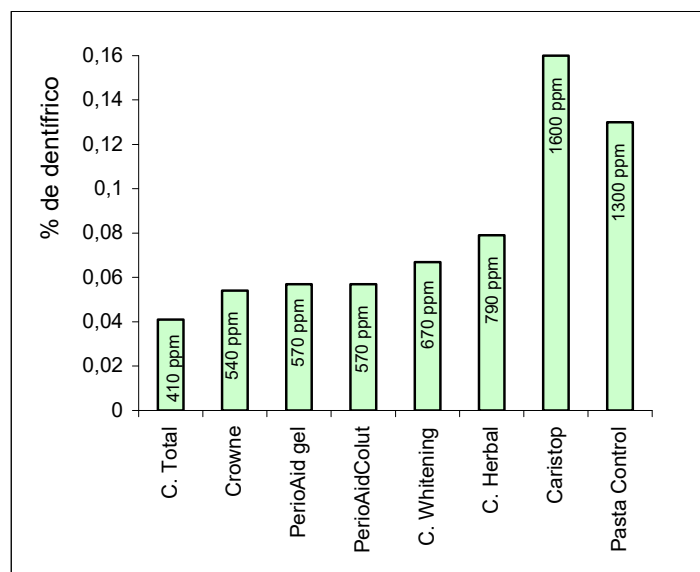


Figura 3: Concentración mínima inhibitoria de diferentes dentífricos

3. Concentración mínima inhibitoria de diferentes dentífricos

Las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) para los dentífricos estudiados se muestran en la Figura 3. Como se observa en el gráfico, el desarrollo de *S. mutans* se ve inhibido a concentraciones bajas de dentífricos, que contienen en su composición algún compuesto activo con reconocido efecto bacteriostático o bactericida. Esto se evidencia al comparar la CMI de los diferentes dentífricos con la CMI de la pasta control, la cual inhibe el crecimiento de *S. mutans* a una concentración de 0,13% (1300 ppm). Por el contrario, los otros dentífricos inhiben a concentraciones 2 a 3 veces menores, que van de 0,041% a 0,079% (400 a 800 ppm). Excepción a este comportamiento lo constituye el dentífrico Caristop, que ejerce un efecto inhibitorio a una concentración mayor que la pasta control (0,16% ó 1600 ppm).

4. Efecto de los dentífricos sobre el crecimiento de *S. mutans*

En este estudio se determinaron las curvas de crecimiento de *S. mutans* a distintas concentraciones de los dentífricos Caristop, CH, CW, CT, Crowne, Perio Aid gel y colutorio. La Figura 4 resume los resultados obtenidos con tres de estos dentífricos. Como puede observarse, las CMI de CH, CW, y Crowne corresponden a 0,079%, 0,067% y 0,054% respectivamente. Sin embargo, comparado con el crecimiento de *S. mutans* en ausencia de dentífrico (control), ya a una concentración de 0,028% de CH y de CW (Fig. 4 a y b), y 0,027% de Crowne (Fig. 4c), se observa un efecto inhibitorio, el cual se evidencia por una fase de latencia más prolongada y por una disminución de la D.O. a las 11 h de incubación. Este efecto es aún más marcado a 0,067% de CH (Fig. 4a), 0,054% de CW (no mostrado en la figura) y a 0,041% de Crowne (Fig. 4c), donde la fase de latencia se alarga por 8 horas y la D.O. a las 11 horas no sobrepasa de 0,2.

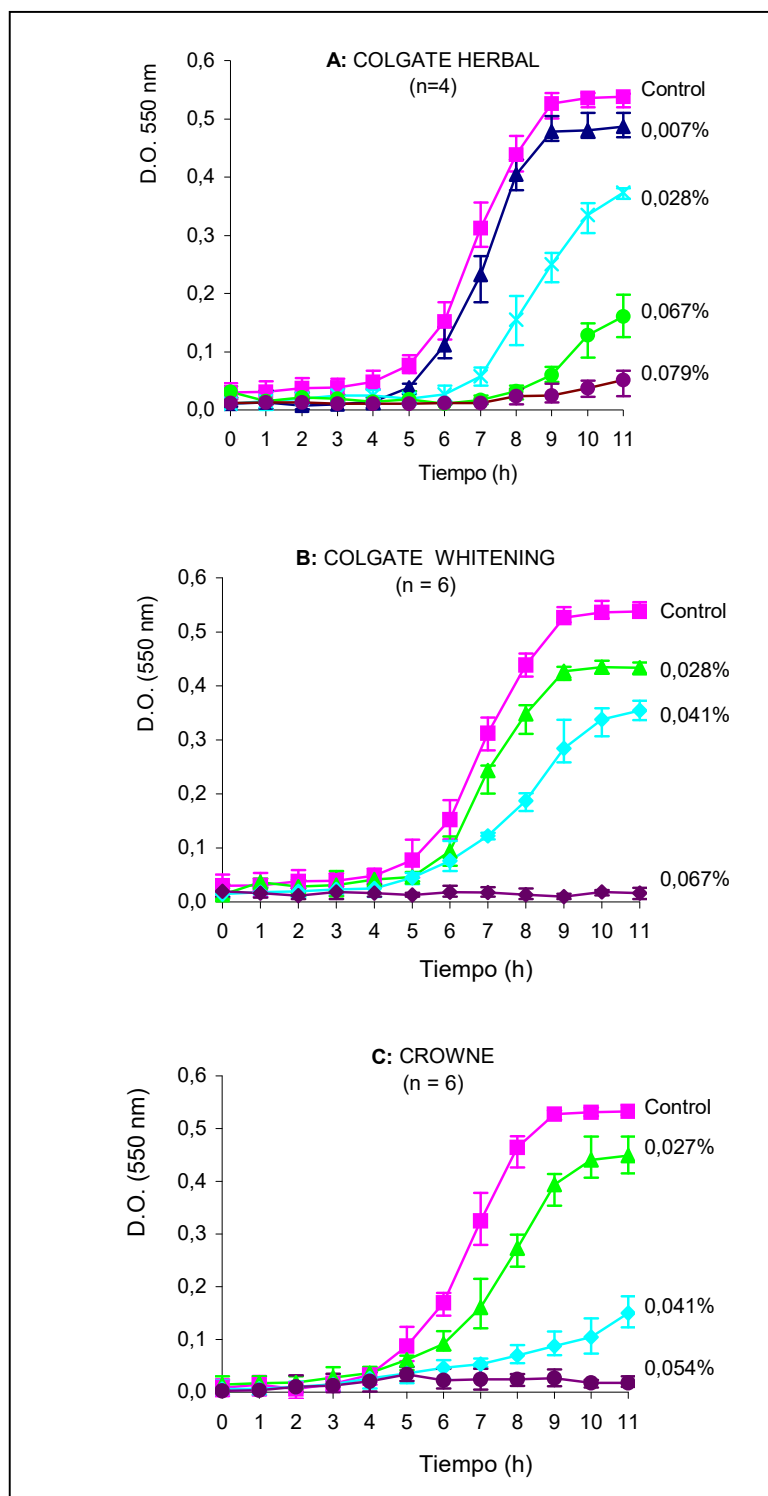


Figura 4: Crecimiento de *S. mutans* a distintas concentraciones de CH, CW y Crowne

Del mismo modo, para los otros dentífricos usados en este estudio, el comportamiento de *S. mutans* a concentraciones crecientes de cada dentífrico, muestra también que el efecto inhibitorio sobre el crecimiento se manifiesta a concentraciones menores que la CMI. Las curvas de crecimiento de *S. mutans* frente a los otros dentífricos se presentan en el Anexo V.

5. Efecto del ión Flúor y del Triclosán sobre el crecimiento de *S. mutans*

La figura 5, compara el crecimiento de *S. mutans* a 0,62 ppm de ión Flúor contenido en distintos dentífricos (Colgate Total, Colgate Whitening, Colgate Herbal y Caristop) así como también en solución pura (NaF). Las curvas muestran que, cuando *S. mutans* es expuesto a 0,62 ppm de ión Flúor en solución pura, manifiesta sólo un retraso en el comienzo de la fase exponencial, pero no inhibición del crecimiento, ya que la D.O. a las 10 y 11 horas es igual a la del control. Por el contrario, a la misma concentración de ión Flúor (0,62 ppm) pero como componente de un dentífrico, el crecimiento de *S. mutans* exhibe diferentes grados de inhibición, los cuales se manifiestan en los distintos valores de D.O. obtenidos entre las 10 y 11 horas, siendo todos más bajos que el control. El efecto inhibitorio, de cada dentífrico, en orden creciente fue: Caristop, Colgate Whitening, Colgate Herbal y Colgate Total.

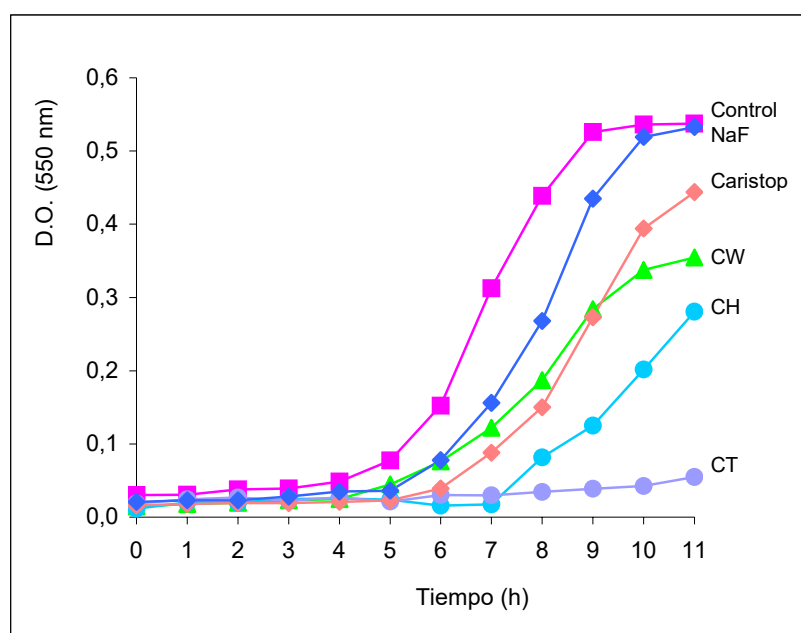


Figura 5: Curvas de Crecimiento de *S. mutans* a 0,62 ppm de Flúor en solución pura (NaF) y como componente de distintos dentífricos.

En cuanto al triclosán, de los dentífricos estudiados, CT es el único que presenta este componente en su formulación. La Figura 6 compara el crecimiento de *S. mutans* a diferentes concentraciones de triclosán tanto en el dentífrico CT como en solución pura. Como puede observarse 0,83 ppm de triclosán tienen un efecto inhibitorio mayor cuando este compuesto se encuentra en solución pura.

6. Acción de la clorhexidina bajo dos diferentes presentaciones

Para estudiar si la eficacia de un compuesto activo se altera según su forma de presentación, nosotros comparamos el efecto de la clorhexidina contenida en Perio Aid gel y Perio Aid colutorio. Nuestros resultados muestran que la acción de dicho componente se ve modificada por su forma de presentación. Es así que el crecimiento de *S. mutans* a 0,47 ppm de clorhexidina contenido en el colutorio, ejerce una mayor inhibición sobre el crecimiento que la misma concentración pero bajo la forma de gel (Fig. 7).

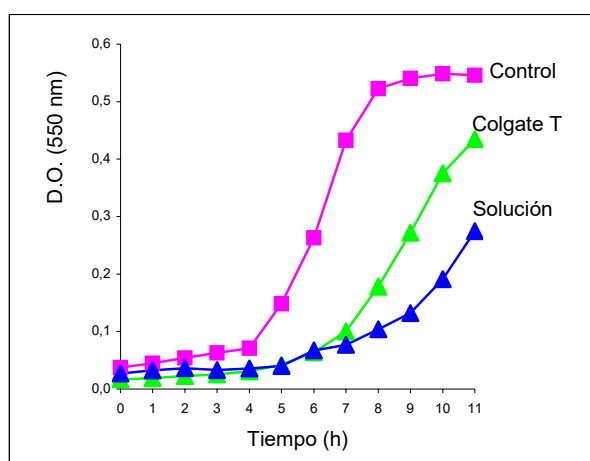


Figura 6: Curvas de Crecimiento de *S. mutans* a 0,83 ppm de Triclosán en solución pura y como componente del dentífrico Colgate Total

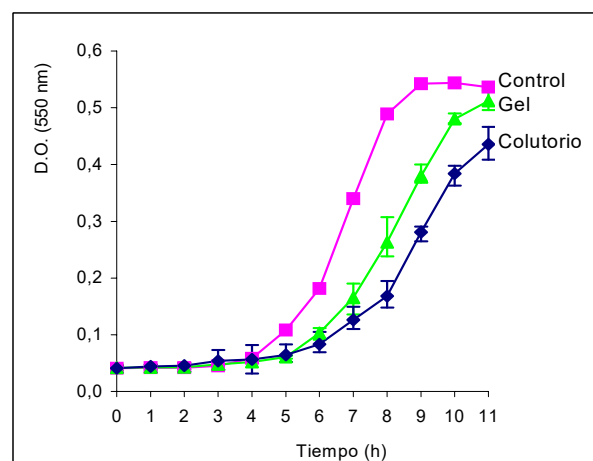


Figura 7: Crecimiento de *S. mutans* a 0,47 ppm de clorhexidina en dos presentaciones: gel y colutorio.

DISCUSIÓN

El propósito primario de lavarse los dientes con un dentífrico es eliminar de las superficies accesibles del diente el biofilm, restos alimenticios y manchas. Los dentífricos han sido preparados de muchas formas, como pastas, geles y polvos, siendo las dos primeras las más usadas. Se ha mostrado que las pastas dentífricas tienen un rol fundamental en ayudar a remover el biofilm (causa de caries y enfermedad periodontal). La mayoría de las personas de países desarrollados utilizan pastas dentífricas principalmente por razones cosméticas, sin embargo, el potencial de los dentífricos como vehículo para agentes terapéuticos o preventivos resulta aún más importantes (Moran y Addy, 1984). Por esta razón los avances en la formulación de los dentífricos han permitido adicionarles componentes que cumplen un rol preventivo y terapéutico (Reynolds, 1994).

En este trabajo se estudió, *in vitro*, el efecto antibacteriano de distintos dentífricos sobre el crecimiento de *S. mutans* aislado de la cavidad oral.

CMI de diferentes dentífricos

Al comparar las CMI de los distintos dentífricos probados en este estudio, se observa una clara diferencia entre la CMI de la pasta control y aquella de los demás dentífricos (Fig.3). Así, nuestros resultados muestran que se necesitan concentraciones 2 a 3 veces mayores de la pasta control para inhibir el crecimiento de *S. mutans*. En la composición de la pasta control se encuentran sólo elementos estructurales y no compuestos con función preventiva o terapéutica, por lo tanto, su efecto inhibitorio parece estar relacionado con lo señalado por Takarada *et al.* (2004), quienes comprobaron que existe un efecto antibacteriano de algunos componentes de los dentífricos, no relacionados con una función bacteriostático ni bactericida. Moran y Addy (1984), estudiaron, *in vitro*, aquellos ingredientes comunes a los dentífricos que podían tener dicho efecto, demostrando que los detergentes como el laurilsulfato de sodio, incorporados en las formulaciones como agentes tensoactivos (Tabla IV), poseen actividad antibacteriana. En nuestro estudio, la pasta control, que también posee este elemento en su composición, mostró una acción inhibitoria sobre el crecimiento de *S. mutans*, aunque menor a los otros dentífricos (excepto Caristop), indicando que su efecto podría estar dado por los componentes formulados. Una situación similar puede señalarse para el dentífrico Crowne, el cual está destinado a cumplir una función desensibilizante, dado por el nitrato de potasio, y no una acción antiplaca. Sin embargo, la CMI de Crowne es similar a la de Perio Aid, tanto gel como colutorio, los cuales poseen clorhexidina con una finalidad netamente antibacteriana (Marine *et al.*, 1997).

Especial atención merece la CMI de Caristop, la cual resultó ser, en nuestro estudio, mayor incluso que la CMI de la pasta control. La cantidad de ión flúor a la concentración inhibitoria de Caristop (3,9 ppm de flúor), está por debajo del rango necesario para inhibir la actividad enzimática (10 ppm; Mc Ghee *et al.*, 1982 en Brown *et al.*, 1991), y por lo tanto, el crecimiento celular. Esto podría explicar el hecho que se requieran mayores concentraciones de Caristop para lograr un efecto inhibitorio. Sin embargo, los otros dentífricos fluorurados probados en este estudio (Colgate Total, Colgate Whitening y Colgate Herbal), logran inhibir el

crecimiento de *S. mutans* a concentraciones 2 a 4 veces menores que Caristop (Fig. 3), las cuales contienen cantidades de flúor aún menores de 3,9 ppm. Lo anterior, podría deberse a que con estos dentífricos el crecimiento de *S. mutans* está siendo inhibido no sólo por el flúor, sino también por otros componentes propios a cada dentífrico. Al comparar la composición de estos dentífricos (Anexo III), se observa que Colgate Total, Colgate Whitening y Colgate Herbal, poseen una formulación mucho más compleja. Así, es posible que por un efecto de sinergismo, se potencie el efecto bacteriostático en estos dentífricos más que en Caristop. Esto es particularmente marcado en el caso de Colgate Total, dentífrico que posee no sólo flúor como componente activo sino también triclosán. El efecto inhibitorio combinado de ambos componentes, hace que se requieran, comparativamente, menores cantidades del dentífrico para inhibir el desarrollo de los microorganismos, motivo por el cual Colgate Total exhibe la CMI más baja.

Crecimiento de *S. mutans* en presencia de distintos dentífricos

En relación a las experiencias de crecimiento de *S. mutans* a distintas concentraciones de cada dentífrico, nuestros resultados muestran que el crecimiento de la bacteria comienza a ser afectado a concentraciones menores que las correspondientes CMI (Fig. 4 y Anexo V). Dicho de otro modo, el efecto antibacteriano de cada dentífrico comienza a observarse a concentraciones que pueden ser, según cada dentífrico, 2 a 4 veces menores que la CMI.

S. mutans cultivado en ausencia de dentífricos, exhibe una fase de latencia de 5 horas (Fig. 2). Sin embargo, a concentraciones “moderadamente” inhibitorias esta fase puede extenderse de 7 a 9 horas (Fig. 4), según aumenta la concentración del dentífrico estudiado. De acuerdo a la cinética de crecimiento, cuando una población microbiana es inoculada en un medio fresco, usualmente el crecimiento no se inicia inmediatamente, sino después de un periodo de tiempo llamado fase de latencia, el cual puede ser breve o extenderse dependiendo de la historia del cultivo o de las condiciones de crecimiento (Madigan *et al.*, 2003; Prescott *et al.*, 1999). Este tiempo se requiere para sintetizar variados constituyentes celulares esenciales y necesarios para una activa multiplicación celular. Si la fase de latencia se extiende más allá del tiempo establecido para una determinada condición de cultivo y/o incubación definida como óptima, significa que las células requieren más tiempo para adaptarse, ya sea porque están dañadas o porque están siendo sometidas a una condición de estrés como por ejemplo, si la población celular es transferida desde un medio rico en nutrientes a uno pobre (Madigan *et al.*, 2003). En nuestro estudio, para inocular los medios con distintas concentraciones de dentífrico, se usaron cultivos en fin de la fase de crecimiento exponencial. Además estos pre-cultivos fueron crecidos en un medio rico y a temperatura óptima para el desarrollo de *S. mutans*. Por lo tanto, la mayor extensión de la fase de latencia observada en presencia de dentífricos, no puede ser atribuida al envejecimiento extremo del pre-cultivo, ni a algún daño previo sufrido por las células. En consecuencia, nuestros resultados indican que la mayor extensión de la fase de latencia, corresponde a una respuesta adaptativa de *S. mutans* frente a una condición de estrés como lo es la exposición al dentífrico. Durante este mayor tiempo de adaptación, las células posiblemente reparan el daño causado por los componentes antibacterianos y antiplaca de los dentífricos, modifican sus características estructurales para resistir mejor frente a los dentífricos (por ejemplo cambios a nivel de permeabilidad), y/o sintetizan los componentes necesarios que permitan poner

en marcha algún posible mecanismos de desintoxicación frente al flúor, triclosán, clorhexidina u otro contenidos en los dentífricos (Llanos, 2000).

Dado que en un cultivo, no todas las células se encuentran en el mismo estado fisiológico, sólo algunas lograrán adaptarse a la presencia del dentífrico, otras morirán (efecto bactericida) y otras quedarán viables pero incapaces de reproducirse (efecto bacteriostático; Madigan, 2003). Por lo tanto, del total de células expuestas al dentífrico solo aquellas fisiológicamente aptas para adaptarse serán las que entren en un proceso activo de división celular (fase de crecimiento exponencial). Nuestros resultados reflejan lo anterior, a nivel de la densidad celular alcanzada a las 10 u 11 horas de incubación, tiempo en el cual *S. mutans* ha completado su crecimiento exponencial en las condiciones definidas por nosotros como óptimas para esta bacteria. Es así como puede apreciarse que a mayores concentración del dentífrico la densidad celular a las 11 horas (medida como D.O. a 550 nm) disminuye. Mientras más alta sea la concentración del dentífrico, y por ende del compuesto bacteriostático o bactericida contenido en él, menor será la cantidad de células que logran adaptarse. Lo anterior es cierto hasta una determinada concentración, más allá de la cual se sobrepasa la capacidad homeostática, perdiendo todas las células su capacidad de reproducirse. Esta concentración corresponde a la CMI.

Composición del dentífrico y su efecto sobre la eficacia de los antibacterianos

Para verificar si los demás elementos presentes en un dentífrico alteran el efecto del componente activo sobre *S. mutans*, también se estudió el efecto del ión flúor y del triclosán en solución pura.

En gran medida el efecto del triclosán está determinado por la formulación del dentífrico que lo contiene. Creeth *et al.* (1993), demostraron que la eficacia del triclosán mejora cuando éste está asociado a vehículos u otros compuestos propios de los dentífricos. Sin embargo, Kjaerheim *et al.* (1994), demostraron a partir de estudios *in vitro*, que al disolver el triclosán en aceites, este no mostraba actividad antibacteriana, lo cual sugiere que algunos componentes como los saborizantes oleosos y el glicerol, interfieren en su efecto. Del mismo modo, Arenas *et al.* (2005), demostraron que algunos componentes del dentífrico pueden interferir en la acción de otros compuestos, impidiendo el rol total de un agente determinado. Nuestros resultados concuerdan con lo anteriormente dicho, ya que al comparar similares concentraciones de este compuesto (Fig 6), tanto en solución pura como formando parte del dentífrico Colgate Total, se encontró que, a 0,83 ppm, el triclosán puro ejerce un efecto inhibitorio mayor sobre el crecimiento de *S. mutans*, que el ejercido por la misma concentración, pero como constituyente de un dentífrico. Colgate Total, aunque contiene gantrez como vehículo, también contiene algunos componentes oleosos como por ejemplo, glicerofosfato de sodio y aceites naturales (actúan como saborizantes), que de acuerdo a lo señalado por Kjaerheim *et al.* (1994) y Arenas *et al.* (2005), posiblemente limitan la acción del triclosán.

Contrario a lo señalado para el triclosán, nuestros resultados muestran que el ión flúor en solución pura, solo prolonga la fase de latencia pero, no inhibe el crecimiento de *S. mutans*. En cambio, a la misma concentración de ión flúor en distintos dentífricos (0,62 ppm), el crecimiento bacteriano exhibe distintos grados de inhibición (Fig. 5). El efecto inhibitorio de los dentífricos

que contienen flúor en su composición, podría deberse al efecto combinado (sinergismo), de este elemento con los excipientes en su conjunto, más que al flúor por sí solo (Takarada *et al.*, 2004; Moran y Addy, 1984). Además, la acción antibacteriana de un dentífrico fluorurado, puede potenciarse con ayuda de un segundo elemento antibacteriano. Yang y Sreenivasan (2005), evidenciaron que un dentífrico que contiene triclosán y flúor en su composición, tiene, *in vivo*, mayor efecto inhibitorio sobre los microorganismos orales que un dentífrico que sólo posee flúor. En nuestro estudio, de los dentífricos estudiados, el único que contiene flúor y triclosan es Colgate Total. Al comparar el efecto de 0,62 ppm de ión flúor en los distintos dentífricos, se comprueba que a esta concentración el único que inhibe completamente el crecimiento microbiano es Colgate Total (Fig. 5). Así, nuestros resultados confirman, *in vitro*, lo señalado por Yang y Sreenivasan (2005).

Eficacia del compuesto activo en relación a su forma de presentación

Con el fin de estudiar si la forma de presentación de un compuesto antibacteriano, afecta la eficacia de dicho elemento, nosotros comparamos la respuesta de *S. mutans* frente a la clorhexidina (dentífrico Perio Aid), administrada a los cultivos bajo dos diferentes presentaciones gel y colutorio.

La CMI de Perio Aid determinada en este estudio, concuerda con las indicadas por Roberts y Addy (1981), no encontrándose diferencias entre gel y colutorio, ya que ambas presentaciones inhiben a la misma concentración. Mariné *et al.*, (1997), señalan que varias investigaciones desarrolladas en países escandinavos, comprueban que enjuagatorios y geles de clorhexidina disminuyen marcadamente la actividad cariogénica, lo cual está asociado a una disminución de la cantidad de *S. mutans*. La clorhexidina es uno de los agentes antibacterianos más efectivos contra los microorganismos orales. Sin embargo, como señala Jones (1997), su eficacia depende de la forma de presentación del producto. Nuestros resultados corroboran esta observación, ya que ellos muestran que al cultivar *S. mutans* en presencia de 0,47 ppm de clorhexidina en su presentación como colutorio (Fig. 7), se obtiene un crecimiento menor que cuando la bacteria es cultivada en la misma concentración pero, en su presentación como gel, en cuyo caso se obtiene, a las 11 horas de incubación, una densidad celular similar a la del control (Fig. 7). Además resultados preliminares obtenidos por nosotros desde experiencias realizadas con el gel Peroxidín, el cual también posee clorhexidina, muestran que bajo esta presentación, la CMI para este compuesto es de 0,09 ppm, es decir, casi 7 veces menor que la obtenida con Perio Aid.

CONCLUSIONES

Los dentífricos probados en este estudio inhiben el crecimiento de *S. mutans* a bajas concentraciones de los dentífricos.

Los dentífricos que contienen agentes activos en su formulación, tienen un efecto antibacteriano mayor que la pasta control

Las diferencias encontradas en las CMI se atribuyen a las diferentes formulaciones de los dentífricos.

El efecto inhibitorio de los dentífricos fluorurados se debe a la acción conjunta del ión flúor con los excipientes.

La actividad antibacteriana de triclosán disminuye al estar contenida en una formulación dentífrica.

La acción de la clorhexidina se ve modificada por su forma de presentación.

Los componentes considerados excipientes tienen efecto inhibitorio sobre *S. mutans*.

LIMITANTES

Los estudios *in vitro* no son totalmente representativos de lo que ocurre *in vivo*.

El comportamiento de *S. mutans* se estudió en cultivo puro y no como integrantes del biofilm.

S. mutans es una bacteria nutricionalmente fastidiosa, por lo tanto su manejo requiere especial atención.

No se conocen todos los componentes y sus porcentajes en los dentífricos.

El replicar las experiencias de laboratorio es tiempo y costo dependiente. Debido a esto, el número de réplicas es bajo y no permite un análisis estadístico complejo.

SUGERENCIAS

Experimentar *in vitro* ,el efecto de los dentífricos sobre un modelo de biofilm dental bajo condiciones orales.

Ejecutar un análisis químico detallado de los componentes de los dentífricos antes de iniciar las experiencias.

Estudiar si la respuesta de *S. mutans* frente a los dentífricos puede ser inducida por concentraciones menores del mismo u otro dentífrico.

Complementar este estudio con recuentos de células viables cultivables y de totales (microscopía) para determinar si la acción del dentífrico tiene un efecto bacteriostático o bactericida.

RESUMEN

El *Streptococcus mutans* ha sido identificado como el principal patógeno del biofilm dental responsable en la etiología de la caries dental. Es por ello que la prevención de esta enfermedad está enfocada a la eliminación de este microorganismo, o bien, a mantenerlo en niveles compatibles con la salud oral. El uso masivo de los dentífricos se ha asociado al control químico del biofilm. Es conocido el mecanismo cariostático y antibacteriano de ciertos agentes activos, pero no del dentífrico como tal.

El propósito de este estudio fue estimar el efecto de 6 dentífricos de uso nacional (Colgate Total, Colgate Whitening, Colgate Herbal Blanqueador, Crowne, Caristop y PerioAid gel), una pasta control y algunos componentes activos (triclosán, ion flúor), sobre el desarrollo de *S. mutans* aislados de la cavidad oral.

Nuestros resultados indican que los dentífricos estudiados inhiben el crecimiento de *S. mutans* a concentraciones que van desde 400 ppm (Colgate Total) hasta 1600 ppm (Caristop). Las diferencias encontradas en las CMI se atribuyen a las diferentes formulaciones de los dentífricos. Además, los dentífricos que contienen agentes activos tienen un efecto antibacteriano mayor que la pasta control. No obstante lo anterior, los componentes considerados excipientes, también poseen un efecto inhibitorio sobre la bacteria. Por último nuestros resultados también señalan que la acción de un agente activo se ve modificado por los demás componentes del dentífrico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Acta Odontológica Venezolana (2003). “Microbiología de la Caries Dental”. *Página de Microbiología* [En línea], 41(3), disponible en http://www.actaodontologica.com/41_3_2003/108.asp# [Accesado el día 08 de octubre de 2005]
- 2) Ajdic, D., (2002). “Genome Secuence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen” en *Proceedings of the Natural Academy of Science. U.S.A.*. 99(22): 14434-14439.
- 3) Alcaide, F., (2002). “Aspectos Microbiológicos de los Estreptococos del Grupo Viridans” en. *Revisiones Temáticas de Bacteriología* [En línea] Mayo 2002, Control Calidad SEIMC, disponible en: http://www.seimc.org/control/revi_Bacte/SGVirid.htm [Accesado el 08 de Octubre de 2005]
- 4) Alonso-Urmeneta, B., (1999). “Obtención y mantenimiento de cultivos puros”. En Díaz, R.; C. Gamazo y I. López-Goñi. *Manual Práctico de Microbiología*. Segunda edición. Masson, S.A., Barcelona. España.
- 5) Arenas, G., *et al.* (2005). “Poder inhibitorio de las diferentes pastas dentales comercializadas en la ciudad de Lima sobre bacterias orales de muestras de placa cariogénica” *Página de metodología de la investigación* [En línea], disponible en <http://www.metodologia-unmsn.com/pasta/pasta.htm>. [Accesado el día 5 de abril de 2005]
- 6) Bengoechea, J.A. y V. Aragón, (1999). “Técnicas turbidimétricas”. En Díaz, R.; C. Gamazo y I. López-Goñi. *Manual Práctico de Microbiología*. Segunda edición. Masson, S.A., Barcelona. España.
- 7) Brading, M.G. *et al.*, (2004). “The role of triclosan in dentifrice formulations, with particular reference to a new 0,3% triclosan calcium carbonate-based system” en *International Dental Journal*. 54: 291-298.
- 8) Brailsford, S.R, *et al.*, (2005). “Effect of withdrawal of fluoride containing toothpaste on the interproximal plaque microflora” en *Caries Research*. 39: 231-235.
- 9) Brown, P., S. Nicolini y J.E. Onetto, (1991) *Caries*, Ediciones de la Universidad de Viña del Mar. Viña del Mar, Chile.
- 10) Caufield, P., G. Cutter y A. Dasanayake, (1993) “Initial Adquisition of Mutans Streptococci by Infants: Evidence for a Discrete Window of Infectivity” en *Journal Dental Research*. 72(1): 37-45.
- 11) Ciancio, S., (1995). “Chemical agents: plaque control, calculus reduction and treatment of dentinal hypersensitivity” en *Periodontology 2000*. 5: 75-86.

- 12) Cohen, S. y R.C. Burns, (1999) *Vias de la Pulpa*. Séptima edición. Editorial Harcourt. Madrid. España.
- 13) Coppen, J.J.W., (1995). “Capítulo 5 Eucalyptus oil”. en “Flavors and Fragrances of Plant Origin”. *FAO Corporate Document Repository* [En línea], 1995, disponible en http://www.fao.org/documents/show_cdr.asp?url_file=/docrep/V5350E/V5350e00.htm [Accesado el día 16 de agosto de 2005]
- 14) Creeth, JE *et al.*, (1993) “Oral delivery and clearance of antiplaque agents from triclosan-containing dentifrices” en *International Dental Journal*. 43 (4 Suppl 1): 387-397. [En línea], disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi> [Accesado el día 16 de agosto de 2005]
- 15) Cummins, D., (1997) “Vehicles: how to deliver goods” en *Periodontology 2000*. 13: 84-99.
- 16) Departamento de Farmacia Hospitalaria Clínica Universitaria de Navarra “Antisépticos y desinfectantes” [En línea], <http://www.viatusalud.com/documento.asp?ID=6689&alias=HEXETIDINA> [Accesado el día 16 de agosto de 2005]
- 17) Diccionario Ilustrado de Términos Médicos. *Página de Diccionario Médico* [En línea], disponible en <http://www.iqb.es/diccio/s/sal.htm#sanguinaria> [Accesado el día 9 de agosto de 2005]
- 18) Difco, (1978) *Manual de Bacteriología*. Gráficas MIRASA. Madrid.
- 19) Facklam, R., (2002) “What Happened to the Streptococci: Overview of Taxonomic and Nomenclature Changes” en *Clinical Microbiology Reviews*. 15(4): 613–630
- 20) Filoche, S.K.; K., Soma y C.H., Sissons., (2003) “Antimicrobial effects of essential oils in combination with chlorhexidine digluconate” en *Oral Microbiology and Immunology*. 20: 221-225.
- 21) Fine, D., (1995) “Chemical agents to prevent and regulate plaque development” en *Periodontology 2000*. 5: 87-107.
- 22) Fischman, S., (1997) “The history of oral hygiene products: how far we come in 6000 years?” en *Periodontology 2000*. 13: 7-14.
- 23) Forward, G. *et al.*, (1997) “Gum health product formulations: what is in them and why?” en *Periodontology 2000*. 5: 32-39.
- 24) Frostell, G., (1984) “Interaction between xylitol and sorbitol in plaque metabolism” en *Swedish Dental Journal*. 8(3):137-46 . [En línea], disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi> [Accesado el día 30 de abril de 2005]

- 25) Gamboa F. *et al.*, (2004) “Control Microbiológico sobre *Streptococcus mutans* y su acción acidogénica” en *Revista Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana*. 9: 45-55.
- 26) Gómez de Ferraris, M. y A. Campos. (1999). *Histología y Embriología Bucodental*. Editorial Médica Panamericana. Madrid, España.
- 27) Gómez S., (2001). *Fluoroterapia en Odontología para el niño y el adulto*. Tercera edición. Editorial Arancibia Hermanos y Cía Ltda. Chile.
- 28) Gómez, S. *et al.* (1991). *El Flúor en odontología preventiva*. Segunda edición. Procter & Gamble Chile. Valparaíso, Chile.
- 29) Hamada S. y H. Slade., (1980) “Biology, Immunology, and Cariogenicity of *Streptococcus mutans*” en *Microbiological Review*. 44(2): 331-384.
- 30) Hirasawa, M. y K., Takada, (2003) “A new selective medium for *Streptococcus mutans* and the Distribution of *S. mutans* and *S. sobrinus* and Their Serotypes in Dental Plaque” en *Caries Research*. 37: 212-217.
- 31) Huerta, J., (1975). *Principios de microbiología bucal*. Editorial Universitaria S.A. Santiago. Chile.
- 32) Jackson, R., (1997) “Metal salts, essential oils and phenols-old or new?” en *Periodontology 2000*. 13: 63-73.
- 33) Jones, C., (1997) “Chlorhexidine: is it still the gold standard?” en *Periodontology 2000*. 13: 55-62.
- 34) Kjaerheim, V.; SM., Waaler y G., Rolla., (1994) “Organic solvents and oils as vehicles for triclosan in mouthrinses: a clinical study” en *Scandinavian Journal of Dental Research*. 102(5): 306-308. [En línea], disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi> [Accesado el día 7 de abril de 2005]
- 35) Lenander, M. *et al.*, (1997) “Combined inhibitory effect of fluoride and hypothiocyanite on the viability and glucose metabolism of *Streptococcus mutans*, serotype c” en *Oral Microbiology and Immunology*. 12: 231-235. [En línea], disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi> [Accesado el día 19 de junio de 2005]
- 36) Liébana, J., (1995). *Microbiología Oral*. Editorial Interamericana McGraw Hill. España
- 37) Linossier, A. *et al.*, (2003). “*Streptococci mutans*: Método semi-cuantitativo para establecer el rango de riesgo de infección bucal en niños preescolares chilenos” en *Revista Médica de Chile*. 131: 412-418.
- 38) Linossier, A. y F. Pizarro, (1987) “Frecuencia de biotipos de *Streptococcus mutans* en escolares chilenos” en *Revista Médica de Chile*. 115: 411-415

- 39) Loesche, W. (1986). "Role of *Streptococcus mutans* in Human Dental Decay" en *Microbiology Reviews*. 50(4): 353-380.
- 40) Llanos, J., (2000) *Comportement vis-à-vis des métaux lourds de micro-organismes thermophiles isolés d'un site hidrotermal profond*. Tesis de Doctorado. France, Université de Bretagne Occidentale, Brest.
- 41) Madigan, M.T., J.M. Martiniko y J. Parker., (2003). *Biology of Microorganisms*. Brock. Décima edición. Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey, USA.
- 42) Mandel, ID., (1992) "Rinses for the control of supragingival calculus formation" en *International Dental Journal*. 42(4 Suppl 1): 270-275. [En línea], disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi> [Accesado el día 30 de abril de 2005]
- 43) Mariné, A.; F. Stanke y I. Urzúa, (1997) Caries: Tratamiento de una enfermedad infectocontagiosa. Apuntes de Asignatura de Operatoria. Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.
- 44) Marsh, P.D., (2003) "Are dental diseases examples of ecological catastrophes?" en *Microbiology*. 149(2): 279-294.
- 45) McDonnell, G. y A. Russell, (1999). "Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance" en *Clinical Microbiology Reviews*. 12(1): 147-179. [En línea], disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi> [Accesado el día 4 de mayo de 2005]
- 46) Menendez, A. *et al.*, (2005) "Comparative analysis of the antibacterial effects of combined mouthrinses on *Streptococcus mutans*" en *Oral Microbiology and Immunology*. 20: 31-34.
- 47) Michael, B. *et al.*, (2005) "Generation of human antibody fragments against *Streptococcus mutans* using a phage display chain shuffling approach" en. *BMC Biotechnology* 5: 4.
- 48) Montiel, F. y M. Lam., (2001) "Métodos microbiológicos convencionales y rápidos usados en la identificación de bacterias aeróbicas. En Montiel, F. y M. Lam. *Manual de Microbiología Clínica*. Publicaciones Técnicas Mediterráneo Ltda. Santiago de Chile.
- 49) Moran, J. y M. Addy, (1984) "The Antibacterial Properties of Some Commercially Available Toothpastes *in vitro*" en *British Dental Journal*. 156: 175-178.
- 50) Moran, J. y M. Newcombe, (1988) "The antibacterial effect of toothpastes on the salivary flora" en *Journal of Clinical Periodontology*. 15(3):193-199. [En línea], disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi> [Accesado el día 5 de abril de 2005]
- 51) Munson, M. *et al.*, (2004) "Molecular Analysis of the Microflora Associated with Dental Caries" en *Journal Clinical Microbiology*. 42(7):

- 52) *Página de Farmacias Ahumada* [En línea] 2005. disponible en <http://www.farmaciasahumada.cl/stores/fasa/html/MFT/PRODUCTO/P3862.HTM>, [Accesado el día 10 de marzo de 2005]
- 53) Palavecino, E., (2004) “*Streptococcus* grupo *anginosus*: ¿Es su identificación clínicamente importante” en *Revista chilena de Infectología*. 21(3): 261-267.
- 54) Prescott, L.; J. Harley y D. Klein, (1999) *Microbiología*, cuarta edición. Editorial Interamericana McGraw Hill. España.
- 55) Reynolds, E., (1994) “Contents of toothpastes – safety implications” en *Australian Prescriber*. 17: 49-51. [En línea], disponible en <http://www.australianprescriber.com> [Accesado el día 16 de agosto de 2005]
- 56) Richard F., (2002) “What Happened to the Streptococci: Overview of Taxonomic and Nomenclature Changes” en *Clinical Microbiology Reviews*. 15(4): 613–630.
- 57) Rolla, G.; D. Gaare y JE. Ellingsen, (1993) “Experiments with a toothpaste containing polydimethylsiloxan/triclosan” en *Scandinavian Journal of Dental Research*. 101(3): 130-132. [En línea], disponible en <http://www.australianprescriber.com> [Accesado el día 19 de junio de 2005]
- 58) Sasaki, H. *et al.*, (2004) “Antibacterial Activity of Polyphenol Components in Oolong Tea Extract against *Streptococcus mutans*” en *Caries Research*. 38: 2-8.
- 59) Schilling, K. y W. Bowen, (1992) “Glucans Synthetized In Situ in Experimental Salivary Pellicle Function as Specific Binding Sites for *Streptococcus mutans*” en *Infection and Immunity*. 60(1): 284-295.
- 60) Shapiro, S., A. Meier y B. Guggenheim, (1994) “The antimicrobial activity of essential oil components towards oral bacteria” en *Oral Microbiology and Immunology*. 9: 202-208.
- 61) Swiss Institute of Bioinformatics (2005), “*Streptococcus mutans* complete proteome” en *ExPASy* [En línea]. Suiza, disponible en <http://www.expasy.org/sprot/hamap/STRMU.html> [Accesado el día 05 de abril de 2005]
- 62) Takarada, K. *et al.*, (2004). “A comparison of the antibacterial efficacies of essential oils against oral pathogens” en *Oral Microbiology and Immunology*. 19: 61-64.
- 63) Trahan, L., (1995) “Xylitol: a review of its action on mutans streptococci and dental plaque--its clinical significance” en *International Dental Journal*. 45(1 Suppl 1):77-92.
- 64) Travis, J., (2000) “Popularity of germ fighter raises concern” en *Science News*. 157:1-2

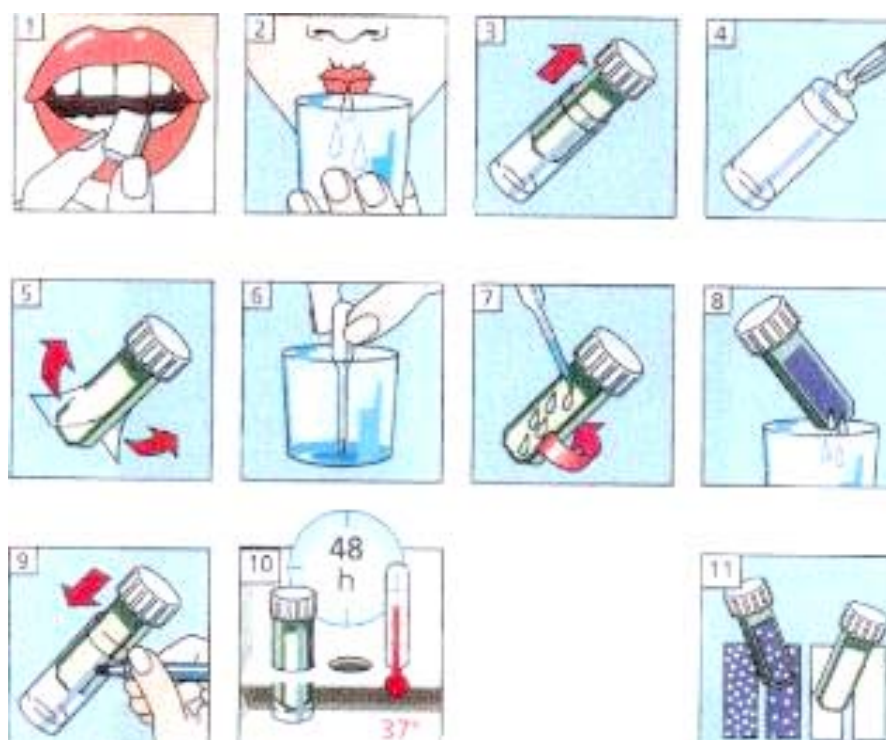
- 65) Triratana, T. *et al.*, (2002) “Clinical effect of a new liquid dentifrice containing triclosan/copolymer on existing plaque and gingivitis” en *Journal of the American Dental Society Association*. 133(2): 219-225.
- 66) University of Maryland Medical Center. (2001). “Anatomía del Diente”. *Medical Encyclopedia* [En línea], Maryland, disponible en http://www.umm.edu/esp_ency/article/002214.htm [Accesado el día 08 de octubre de 2005]
- 67) University of New Castle, (2005a) “Streptococci and Oral Streptococci” en *The Oral Environment* [En línea]. United Kingdom, disponible en <http://www.ncl.ac.uk/dental/oralbiol/oralenv/tutorials/streps.htm> [Accesado el día 08 de octubre de 2005]
- 68) University of New Castle, (2005b) “*Streptococcus mutans* and the mutans streptococci” en *The Oral Environment* [En línea]. United Kingdom, disponible en <http://www.ncl.ac.uk/dental/oralbiol/oralenv/tutorials/mutans.htm> [Accesado el día 08 de octubre de 2005]
- 69) University of New Castle, (2005c) “Kiss Plates” en *The Oral Environment* [En línea]. United Kingdom, disponible en <http://www.ncl.ac.uk/dental/oralbiol/oralenv/tutorials/kissplates.htm> [Accesado el día 08 de octubre de 2005]
- 70) Van Strydonck, D.A.C. *et al.*, (2005) “Plaque inhibition of two commercially available chlorhexidine mouthrinses” en *Journal of Clinical Periodontology*. 32: 305-309.
- 71) Vega, E., *et al.*, (2001) “Lauril Sulfato de Sodio: ¿Polémica en Internet?” *Página de CIME Centro de Información de Medicamentos* [En línea] Junio 2001. Boletín informativo número 6. disponible en <http://www.fcq.unc.edu.ar/cime/laurilsulfato.htm> [Accesado el día 10 de julio de 2005]
- 72) Vitas, A. y A. Irigoyen, (1999). “Cultivo en anaerobiosis”. En Díaz, R.; C. Gamazo y I. López-Goñi. *Manual Práctico de Microbiología*. Segunda edición. Masson, S.A., Barcelona.
- 73) Wade, W. y M. Addy, (1992) “Antibacterial activity of some triclosan-containing toothpastes and their ingredients” en *Journal of Periodontology*. 63(4): 280-282.
- 74) Yang, Y. y P.K. Sreenivasen, (2005) “An *ex vivo* multiplexed antibacterial test on oral microflora” en *Oral Microbiology and Immunology*. 20: 180-185.

ANEXO I

Kit CRT[®] bacteria (Ivoclar Vivadent)

Este kit ha sido desarrollado para determinar el número de *S. mutans* y de lactobacilos en muestras de saliva. Además, si se introduce una leve modificación al protocolo de muestreo indicado por los fabricantes, se puede determinar *S. mutans* en placa.

El kit se compone de una tableta de parafina, una tableta de NaHCO₃, un gotario, una “paleta porta agar” y un tubo de prueba. El protocolo a seguir para la determinación del número de *Streptococcus mutans* y de lactobacilos se resume en las figuras siguientes:



La tableta de parafina debe ser masticada por el individuo a quien se realiza la determinación, a fin de estimular la producción de saliva (cuadros 1 y 2 de la figura). La tableta de NaHCO₃ se deposita al fondo del tubo de prueba durante la incubación y tiene por finalidad generar condiciones anaerobias (cuadro 4). El gotario se usa para humedecer las superficies de la “paleta porta agar” con la saliva (cuadros 6 y 7). La “paleta porta agar” contiene en cada una de sus superficies un substrato selectivo, que permite determinar ambos tipos de bacteria: superficie de agar clara para la determinación de lactobacilos y superficie de agar azul para la determinación de *S. mutans*. Finalmente, el tubo de prueba se usa para guardar la “paleta porta agar” durante el periodo de incubación (cuadro 9).

Resultados: después de incubar se debe comparar la densidad de las colonias desarrolladas sobre ambas superficies con los correspondientes cuadros patrones del kit CRT[®] bacteria, los cuales se muestran en la figura inferior.

Valoración: Un recuento de lactobacilos y *S. mutans* superior a 10^5 unidades formadoras de colonias (UFC) en saliva indica un alto riesgo de caries.



Cuadros patrones del kit CRT[®] bacteria, para estimar el N^o de UFC/ml saliva

ANEXO II

MEDIOS DE CULTIVO

Agar mitis-salivarius (Difco)

El medio agar mitis-salivarius es un medio selectivo usado para el aislamiento de *S. mitis*, *S. salivarius* y enterococos. Su composición por litro de agua destilada es la siguiente:

digerido pancreático de caseína	6 g
peptona de proteasa N° 3	9 g
peptona de proteasa	5 g
dextrosa	1 g
sacarosa	50 g
fosfato dipotásico	4 g
azul tripano	0,075 g
cristal violeta	0,0008 g
agar	15 g

Al medio una vez preparado, esterilizado y enfriado hasta 50–55° C, se le adiciona 1 ml por litro de una solución al 1% de telurito potásico. (Telurito de Chapman)

Características de las colonias crecidas en agar mitis-salivarius

Microorganismo	Colonias
<u><i>S. mitis</i></u>	pequeñas azules de aprox. 0,2 mm de diámetro. Consistencia dura.
<i>S. salivarius</i>	azules lisas o rugosas de 1 a 5 mm de diámetro. Consistencia mucoide.
Enterococos	Color azul oscuro o negro, brillantes, ligeramente abultadas y con 1 a 2 mm de diámetro.

Agar Nutritivo (Difco)

Medio de mantención que permite el crecimiento de una amplia variedad de microorganismos. Su composición por litro de agua purificada es la siguiente:

Extracto de carne	3 g
Peptona	5 g
Agar	15 g

Medio MR-VP (Difco)

El caldo RM-VP permite diferenciar organismos coliformes en base a los pruebas de Rojo Metilo (fermentación ácido mixta de la glucosa) y Voges proskauer (fermentación butanodiólica de la glucosa). Su composición por litro de agua purificada es la siguiente:

Peptona	7 g
Fosfato dipotásico	5 g
Bacto dextrosa	5 g

Caldo Manitol Rojo Fenol (Difco)

Medio formulado para detectar la fermentación de Manitol Su composición por litro de agua purificada es la siguiente:

Peptona	10 g
Extracto de carne	5 g
Cloruro de sodio	5 g
D-Manitol	5 g
Rojo fenol	0,018 g

Caldo Sorbitol Rojo Fenol (Difco)

Medio formulado para detectar la fermentación de Sorbitol. Su composición por litro de agua purificada es igual a la del medio anterior, excepto que cambia el manitol por sorbitol.

Caldo Cerebro Corazón (Difco)

El caldo cerebro corazón es un medio base para el cultivo de microorganismos difíciles entre los que se incluyen estreptococos, neumococos, y meningococos. Su composición por litro de agua purificada es la siguiente:

Infusión de cerebro de ternero	200 g
Infusión de corazón de res	250 g
Peptona de Proteasa	10 g
Dextrosa	2 g
Cloruro de sodio	5 g
Fosfato disódico	2,5 g

ANEXO III**COMPOSICIÓN QUÍMICA DE CADA DENTÍFRICO****CARISTOP**

Ingredientes por cada 100g de pasta: Fluoruro de Sodio 0,3315g, Monofluorofosfato de sodio 0,7600g, sacarina sódica 0,2500g, excipientes c.s.p. 100g.

CROWNE

Ingredientes por cada 100 g de pasta: Nitrato de potasio 5 g, excipientes c.s.p. 100 g.

PERIO-AID GEL

Ingredientes por cada 100 g de gel: Digluconato de clorhexidina 0,12 g, Excipientes c.s.p. 100g.

PERIO-AID COLUTORIO

Ingredientes por cada 100 ml de colutorio: Digluconato de Clorhexidina 0,12g, Sacarina sódica 0,01g, Excipiente c.s.p. 100 ml

COLGATE TOTAL*

Ingredientes: Fluoruro de sodio 0,33% (1500 ppm ión flúor), Triclosano 0,3%, Agua, sorbitol, sílica hidratada, laurilsulfato de sodio, copolímero PVM/MA, sabor carragenina, hidróxido de sodio, sacarina sódica, carbonato de calcio, glicerofosfato de calcio, formaldehído, fosfato.

COLGATE HERBAL BLANQUEADOR*

Ingredientes: carbonato de calcio; agua; sorbitol, alúmina, laurilsulfato de sodio, monofluorofosfato de sodio 1,14% (1500 ppm de ión flúor), silicato de sodio, aroma, carragenina, goma de celulosa, sacarina sódica, aceite de eucalyptus, globulus, metilparabeno, extracto de menta (*Melissa officinalis*), extracto de Hinojo (*Foeniculum vulgare*), aceite de limón (*citrus medica limonum*), CI 74260, CI 74160.

COLGATE WHITENING*

Ingredientes: Monofluorofosfato de sodio 0,76% (1500 ppm de ión flúor), glicerina, sílica hidratada, propilen glicol, bicarbonato de sodio, óxido de aluminio, agua, trifosfato de pentapotasio, pirofosfato de tetrasodio, lauril sulfato de sodio, hidróxido de sodio, peróxido de calcio, sacarina de sodio, carragenina, goma celulosa, dióxido de titanio.

PASTA BASE DENTÍFRICA (PASTA CONTROL)*

Ingredientes: Carbonato de calcio, glicerina, vaselina sólida, gel carboximetilcelulosa 4%, LSS, sorbitol 70%, colorante verde menta, esencia menta, solución mentol 11% en etanol, agua destilada, MACKAM2C.

* La formulación comercial no especifica en qué cantidad de gramos están contenidos estos componentes.

ANEXO IV

**DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACION FINAL
DE CADA DENTÍFRICO Y DE SUS COMPONENTES ACTIVOS**

Ejemplo, caso del dentífrico Colgate Total (CT):

lleva en su composición 1500 ppm de ión flúor (0,15%) y
3000 ppm de Triclosán. (0,3%)

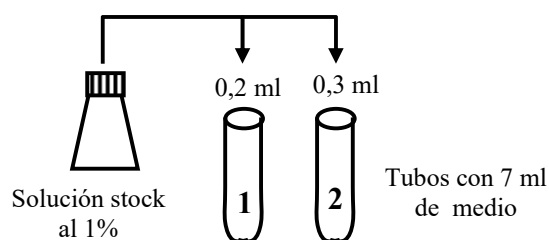
1. Solución stock:

Se prepara solución stock de CT al 1%, por lo tanto, la dilución $(1/100) = 0,01$

De la relación **Concentración x Dilución**, se obtiene la concentración final en la solución stock. Por lo tanto:

$$1500 \text{ ppm} \times 0,01 = 15 \text{ ppm de ión fluor en la solución stock de CT}$$

$$3000 \text{ ppm} \times 0,01 = 30 \text{ ppm de triclosán en la solución stock de CT}$$

2. Uso de la solución stock:

Los tubos con distintas concentraciones de dentífrico, usados en este estudio, se prepararon según muestra la figura superior. Para obtener la concentración final de dentífrico y de los componentes activos en cada tubo, se usa la relación siguiente:

$$\text{Concentración}_1 \times \text{Volumen}_1 = \text{Concentración}_2 \times \text{Volumen}_2$$

Así, por ejemplo:

Colgate total en el tubo 1	1%	x	0,2 ml	=	¿?	x	7,2 ml
Colgate total en el tubo 2	1%	x	0,3 ml	=	¿?	x	7,3 ml
Ión flúor en el tubo 1	15 ppm	x	0,2 ml	=	¿?	x	7,2 ml
Triclosán en el tubo 2	30 ppm	x	0,3 ml	=	¿?	x	7,3 ml

Por lo tanto, la concentración del CT en el tubo 1 = 0,028 % y en el tubo 2 = 0,041%.
En el tubo 1 hay 0,42 ppm de ión flúor y en el tubo 2 hay 1,23 ppm de triclosán.

La concentración final de dentífrico y sus componentes activos, fue calculada de forma similar para todos los dentífricos usados en este estudio.

ANEXO V

Crecimiento de *S. mutans* a distintas concentraciones de los dentífricos Caristop, Colgate Total y Perio Aid gel y colutorio

