



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA Y MEDICINA ORAL
AREA DE MICROBIOLOGÍA, LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA E
INMUNOLOGÍA ORAL.

**“ESTUDIO COMPARATIVO *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD
ANTIMICROBIANA DE LOS AGENTES
REMINERALIZANTES DE ESMALTE DENTARIO BLUE
REMIN®, FLÚOR SILANO Y FLUORURO DIAMINO DE
PLATA.”**

Constanza Jesús Avilés Saavedra

**TRABAJO DE
INVESTIGACIÓN PARA
OPTAR AL TÍTULO DE
CIRUJANO-DENTISTA**

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Patricia Palma Fluxá

TUTOR ASOCIADO

Dr. Mario Diaz-Dosque

**Adscrito a Proyecto de Open Beauchef "Remineralizador
cariostático basado en flúor y grafeno"
Santiago - Chile
2023**



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA Y MEDICINA ORAL
AREA DE MICROBIOLOGÍA, LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA E
INMUNOLOGÍA ORAL.

**“ESTUDIO COMPARATIVO *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD
ANTIMICROBIANA DE LOS AGENTES
REMINERALIZANTES DE ESMALTE DENTARIO BLUE
REMIN®, FLÚOR SILANO Y FLUORURO DIAMINO DE
PLATA.”**

Constanza Jesús Avilés Saavedra

**TRABAJO DE
INVESTIGACIÓN PARA
OPTAR AL TÍTULO DE
CIRUJANO-DENTISTA**

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Patricia Palma Fluxá

TUTOR ASOCIADO

Dr. Mario Diaz-Dosque

**Adscrito a Proyecto de Open Beauchef "Remineralizador
cariostático basado en flúor y grafeno"
Santiago - Chile
2023**

DEDICATORIA

A mis abuelas Patricia y Rosalía.

“La flor que florece en la adversidad es la más rara y hermosa de todas.”

Mulán de Disney (1998).

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, a mi casa de estudios la Universidad de Chile por todas las oportunidades entregadas para aprender y crecer no solo académicamente si no también como persona.

A mi tutora la Dra. Patricia Palma, mi primer contacto con la odontología cuando fui estudiante secundaria. Gracias por la confianza y el apoyo a lo largo de estos años en especial durante esta última etapa del pregrado.

Al Dr. Andrés Célis por su ayuda, apoyo y paciencia para resolver mis dudas e inquietudes a lo largo de este trabajo.

Al Dr. Mario Diaz-Dosque mi tutor asociado, por su disposición y amabilidad desde mi primer año. Gracias por confiar en mi para este proyecto.

A Daniela Salinas del Laboratorio de Microbiología por su ayuda y apoyo en cada paso que fui dando en el mundo de la investigación, sin ti no hubiera sido posible.

A Claudia Lefimil, por confiar en mí y apoyarme para atravesar uno de los momentos más difíciles que he vivido.

A todos los docentes que se dieron el tiempo de entregarme herramientas tanto para mi desarrollo profesional como personal, gracias por su vocación y profesionalismo. Su apoyo fue fundamental a lo largo de esta etapa.

A los funcionarios de los distintos espacios de la facultad, por sus palabras de apoyo, sonrisas en los días difíciles y su infinita ayuda cada vez que la solicité.

Agradezco infinitamente a mi familia, el proceso ha sido largo y difícil, pero lo hubiera sido aún más sin su apoyo, cariño y comprensión. A mi madre por enseñarme a ser perseverante y defender mis creencias, a mi padre por darme tranquilidad y un

punto de vista diferente. A mis hermanos por la comprensión y su paciencia (no tanta) en los días más complicados, estoy orgullosa de ambos.

Les agradezco también a todos los compañeros peludos que me acompañaron en las largas horas de estudio, casos clínicos y mi día a día a lo largo de estos años con un ronroneo o ladrido alegre.

José Manuel, mi mejor amigo y confidente desde el primer día de clases. Nunca lo hubiera logrado sin ti, gracias infinitas por las risas, la comida y todas las aventuras que hemos vivido juntos a lo largo de estos años. Gracias por estar siempre en las buenas, las malas y las terribles. No sé qué sería de mi sin ti, te quiero muchísimo.

A mi pareja Cristian, todo gracias a ti. Gracias por caminar a mi lado e iluminar mi camino en los momentos oscuros, eres un pilar fundamental en mi vida y te amo muchísimo.

Sigrid, mi amiga desde primer año con altos y bajos, pero hasta el final. Gracias por las risas y locuras que quedan para el recuerdo, nunca fue un año tranquilo en Hogwarts. Eres mi señora favorita para tomar el té.

A Sahafi, que llegó en un momento inesperado y me adoptó para no dejarme ir ni siquiera cuando me pierdo. Gracias por las donuts de naranja, el té de mango y las siestas. Sobre todo, infinitas gracias por no dejarme sola y cuidarme tanto en ese momento.

A Ignacio, tu valentía y perseverancia ante la adversidad hacen que me sienta honrada de ser tu amiga, gracias por tu apoyo y optimismo.

A Pamela, por ser un ejemplo que seguir en cuanto a convicciones y energía imparable. Gracias por tu confianza, proactividad ilimitada y volverme adicta a la radio Play en primer año, nada personal.

A Martín por toda tu ayuda y paciencia durante mi estancia en el Laboratorio de Microbiología. Gracias por resolver mis problemas más ridículos y también los matemáticos.

A mis amigos del Programa académico de Bachillerato y amigas del colegio, por su paciencia y por no olvidarme a pesar de lo limitado de mi tiempo para hacer vida social. Gracias por ser un lugar seguro al que siempre puedo volver.

A mis compañeros finalistas de la malla antigua, por tantos grandes momentos que atesoraré para siempre. Gracias por enfrentar los desafíos que se nos presentaron a lo largo de estos años con decisión y valentía sin perder nunca la sonrisa. Los quiero muchísimo, el meteorito ya está por llegar.

Agradezco también a mis pacientes, por su apoyo y ayuda a lo largo de los distintos desafíos que enfrentamos juntos. Soy mejor profesional gracias a que ustedes confiaron en mí.

A los Trabajos Comunitarios de Odontología (TCO) que me ayudaron año a año a reencontrarme con mi amor por esta profesión.

Quiero hacer un espacio para agradecer también a todas esas personas que fueron parte importante de mi vida a lo largo de estos años y que ya no son parte de ella. Gracias por todo lo que me enseñaron sobre el amor, la amistad, la empatía y el perdón.

Y por último a Pedro Zolezzi, sin su ayuda posiblemente no hubiera llegado hasta este punto.

Gracias por tanto.

ÍNDICE

I.	RESUMEN	4
II.	MARCO TEÓRICO	7
	2.1 Introducción	7
	2.2 Enfermedad de caries	8
	2.3 Microbiología de la enfermedad de caries.....	8
	2.4 Biopelícula	10
	2.5 <i>Streptococcus mutans</i>	12
	2.6 Lesión de caries	14
	2.7 Remineralización.....	15
	2.8 Remineralizantes y cariostáticos	15
	2.9 Flúor	16
	2.10 Fluoruro Diamino de Plata.....	17
	2.11 Flúor Silano	18
	2.12 Antimicrobianos	19
	2.12.1 Clorhexidina	20
	2.12.2 Cobre.....	21
	2.13 Grafeno	23
	2.14 Declaración del problema	25
2	HIPÓTESIS.....	26
3	OBJETIVO GENERAL.....	26
4	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
5	MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
	6.1 Cepas, agentes remineralizantes y antimicrobianos.....	27
	6.1.1 <i>Obtención de las cepas en medio sólido</i>	27
	6.1.2 <i>Obtención de cultivos en medio líquido</i>	28
	6.1.3 <i>Mantenimiento de cultivos viables</i>	28
	6.1.4 <i>Obtención de los agentes remineralizantes con potencial antimicrobiano</i>	29
	6.2 Diseño Experimental	30
	6.2.1 <i>Ensayo de Difusión en Agar o Agar diffusion assay</i>	30
	6.2.2 <i>Ensayo de microdilución en caldo</i>	31
	6.2.3 <i>Ensayo de supervivencia o Time Killing Test</i>	33
	34	
	6.3 Análisis estadístico.....	34

		3
6	RESULTADOS	35
	7.1 Ensayo de difusión o <i>Agar diffusion assay</i>	35
	7.2 Ensayo de dilución.....	38
	7.3 Ensayo de supervivencia o <i>Time Killing test</i>	40
7	DISCUSIÓN	42
8	CONCLUSIONES	52
9	BIBLIOGRAFÍA	53

I. RESUMEN

Introducción: La enfermedad de caries, de naturaleza disbiótica, es una de las más prevalentes a nivel mundial. Está mediada por bacterias presentes en la microbiota oral, cuyo metabolismo de azúcares fermentables sintetiza subproductos ácidos que provocan la pérdida mineral de los tejidos dentarios. Esto genera un desequilibrio en el proceso de remineralización y desmineralización de la superficie dentaria que, sumado al paso del tiempo, provocará la aparición de una lesión de caries. Para prevenir y/o detener el avance de la enfermedad se utilizan agentes que posean propiedades remineralizantes y además efecto antimicrobiano. El propósito de este estudio fue evaluar la capacidad antimicrobiana de un nuevo agente remineralizante en base a cobre, flúor y grafeno, llamado Blue Remin®.

Objetivos: Evaluar la actividad antimicrobiana de Blue Remin® y compararla con las propiedades de Fluoruro diamino de Plata y Flúor silano, otros agentes remineralizantes de frecuente uso odontológico.

Metodología: Se realizaron 3 ensayos experimentales para caracterizar cuantitativa y cualitativamente la actividad antimicrobiana *in vitro* de Fluoruro diamino de Plata, Flúor silano y Blue Remin® frente a *Streptococcus mutans*. Estos ensayos corresponden a un ensayo de difusión en agar con sensidiscos embebidos en los agentes experimentales, un ensayo de microdilución en caldo de cultivo y un ensayo de supervivencia bacteriana en función del tiempo de exposición a los distintos agentes antibacterianos utilizados.

Resultados: Los tres agentes estudiados demostraron actividad antimicrobiana *in vitro* frente a *Streptococcus mutans* y, al compararlos, el más efectivo fue Fluoruro diamino de plata y el menos efectivo fue Flúor silano. Blue Remin® tendría una efectividad intermedia entre Fluoruro

diamino de plata y Flúor silano, pero significativamente mayor a Flúor silano.

Conclusiones: Blue Remin® presenta acción antibacteriana *in vitro* y se evidenciaron diferencias significativas al comparar su efectividad con Flúor silano y Fluoruro diamino de plata.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Introducción

Las enfermedades bucales son las enfermedades crónicas más comunes, constituyendo un importante problema de salud pública por su alta prevalencia, impacto negativo en la salud oral y sistémica en los individuos y sociedad y por el alto costo de su tratamiento (Bagramian RA, 2009).

La enfermedad de caries, de origen multifactorial, se define como una enfermedad crónica no infecciosa, no transmisible, inducida por bacterias que promueven un desequilibrio de la biopelícula asociada a la superficie dentaria, modulada por la dieta. Se caracteriza por ser un proceso patológico crónico que genera una destrucción localizada de los tejidos duros dentales (Tanner AC y cols., 2016). Corresponde a una de las enfermedades más prevalentes a nivel mundial, no erradicada (Pitts N y cols., 2017). La incidencia de la caries dental en niños es actualmente un problema de salud pública con un 46,2% de prevalencia a nivel mundial en dientes temporales y un 53,8% en dientes permanentes (Kazeminia M y cols., 2020).

En Chile, los estudios epidemiológicos de salud oral secundan esta tendencia indicando que a los 2 años la prevalencia de caries es de un 17,5% y aumenta a un 49,6% a los 4 años alcanzando la preocupante cifra de 70,4% a los 6 años. Si avanzamos en el ciclo vital la prevalencia de caries a los 12 años corresponde a un 62,5%, entre los 35-44 años aumenta a un 99,2% y alcanza un 99,4% en adultos de 65 a 74 años (MINSAL, 2017).

En este contexto la odontología ha centrado sus esfuerzos en el control de la enfermedad a través de la prevención, modificando el antiguo enfoque invasivo de la escuela tradicional y su práctica en soluciones con procedimientos restaurativos (FDI, 2002). Este cambio de paradigma ha fomentado el desarrollo de nuevas biotecnologías y biomateriales con el fin de preservar la estructura dentaria, controlar e incluso revertir las lesiones de caries en algunos casos, minimizando la necesidad de utilizar técnicas

de carácter más invasivo y poco conservador para así otorgar a los tejidos dentarios el mayor tiempo funcional en condiciones óptimas (Tyas y cols., 2000).

2.2 Enfermedad de caries

La enfermedad de caries corresponde a un proceso patológico crónico que genera la destrucción de los tejidos duros dentales de manera localizada. Se define como una enfermedad multifactorial, mediada por bacterias (Tanner AC y cols., 2016), en la cual existen factores predominantes como lo son la presencia de azúcares fermentables, factores del hospedero y la presencia de microorganismos acidogénicos (Rathee y Sapra, 2021). La presencia de hidratos de carbono fermentables provenientes de los alimentos ingeridos por el hospedero, permite que los microorganismos acidogénicos presentes en la cavidad oral generen ácidos orgánicos como subproducto de su actividad metabólica (Tanner AC y cols., 2016). Estos subproductos disminuyen los valores de pH oral por debajo del valor crítico (pH 5,5) y esto trae como consecuencia la desmineralización progresiva del tejido dental hasta su eventual cavitación (Hicks y cols., 2003).

2.3 Microbiología de la enfermedad de caries

La cavidad oral es un sistema biológico único en el que existen distintos nichos ecológicos, esto debido a que existen distintos tipos de hábitats o microambientes. Por lo anterior el ecosistema oral alberga comunidades microbianas específicas, reguladas por sistemas de señalización, factores ambientales y factores del hospedero (Chimenos-Küstner E y cols., 2017). Por otra parte, cuando las especies microbianas se mantienen en equilibrio con su hospedero (eubiosis), se habla de un estado compatible con salud. Por el contrario, la ruptura de dicho equilibrio (disbiosis) se asocia con enfermedad y se caracteriza por la alteración de la diversidad y las proporciones relativas de especies de la microbiota normal (Chimenos-Küstner E y cols., 2017). La relación entre el ecosistema oral y su hospedero es dinámica ya que los cambios biológicos en el ciclo vital de

una persona pueden influir en el equilibrio de las especies que componen la comunidad (Chimenos-Küstner E y cols., 2017). Cambios fisiológicos tales como cambios hormonales durante la pubertad, el embarazo o la edad suelen provocar una adaptación del ecosistema de los individuos sanos sin perjudicar su salud oral (Chimenos-Küstner E y cols., 2017). En otras situaciones, la alteración del ecosistema oral puede causar una disbiosis con la consecuente pérdida del equilibrio y diversidad de comunidades presentes en la biopelícula, provocando el predominio de algunas especies y aumentando así el riesgo de enfermedad (Chimenos-Küstner E y cols., 2017). Existen factores predisponentes al estado de disbiosis tales como la disfunción de las glándulas salivales, mala higiene oral, inflamación gingival y estilos de vida poco saludables como por ejemplo una alimentación alta en carbohidratos fermentables y el hábito tabáquico, entre otros. Como ya se mencionó las enfermedades orales más prevalentes, como la caries y la periodontitis, se definen como enfermedades orales disbióticas. Están asociadas a biopelículas diversas y altamente complejas en las cuales los microorganismos de la microbiota comensal participan junto con otras especies denominadas patobiontes, que son patógenos claves que impulsan el desarrollo de un cambio ecológico, y sumado a los factores del hospedero, en favorecer la aparición y mantención de esta disbiosis (Rathee y Sapra, 2021).

La enfermedad de caries, de naturaleza disbiótica, está mediada por la presencia de bacterias con propiedades acidogénicas (productoras de ácidos) y acidofílicas (con capacidad para sobrevivir en ambientes ácidos) que además cuentan con la capacidad de metabolizar azúcares fermentables y adherirse en biopelículas a los tejidos dentales. Mediante el proceso de metabolización se crea un ambiente ácido en el que las bacterias acidúricas, son capaces de continuar sintetizando ácidos en ambientes de bajo pH, volviéndose predominantes en el ecosistema por el desplazamiento de especies que no son acidotolerantes. Esto, sumado al paso del tiempo, provocará la desmineralización del tejido dental (Rathee y Sapra, 2021).

2.4 Biopelícula

En la cavidad oral, como en otros sistemas biológicos, la mayoría de los microorganismos presentes no coexisten libremente, sino que conforman biopelículas asociadas a diferentes superficies como por ejemplo la estructura dentaria. La biopelícula dental está compuesta por diversas especies de microorganismos adheridos entre sí y/o a la superficie del diente (Lamont RJ y cols., 2018). Se define como un consorcio microbiano organizado, inmerso en una matriz de exopolisacáridos de origen mixto, compuesta de polisacáridos, agua, lípidos, proteínas y DNA extracelular que se encuentra adherido a una superficie dura viva o inerte (Eick, 2021). La formación de la biopelícula se compone de tres etapas principales, la primera es la formación de una película adquirida (PA), una delgada membrana biológica que se deposita en la superficie de los dientes, como resultado de la adsorción de proteínas y glucoproteínas contenidas en la saliva y el líquido crevicular, así como también otras provenientes de productos microbianos y celulares. Existe PA en todas las superficies bucales, no solamente en los dientes (Melchora y cols, 2007).

Esta membrana proteica desempeña variadas funciones dentro de las cuales se encuentran la regulación del contacto de la superficie dental con los ácidos, tanto de los alimentos como los resultantes del metabolismo bacteriano (Hanning y Balz, 2001). También otorgará sitios para la adhesión de microorganismos, dando paso al inicio de la formación de la biopelícula (Busscher y Van der Mei, 1997).

La segunda etapa corresponde a la interacción con la PA por parte de los microorganismos orales denominados colonizadores primarios, los que se van a adherir a través de variadas interacciones específicas de célula-superficie (Davey y O'toole, 2000). Se ha demostrado que *Streptococcus* spp. orales son los principales colonizadores primarios de las superficies de esmalte (Wright, 2013). Una vez que la PA es colonizada hablamos de placa bacteriana o biopelícula ya que existe una superficie con actividad biológica (Chimenos-Küstner E y cols, 2017).

La tercera etapa corresponde a la coagregación de otros microorganismos

a los colonizadores primarios a través de interacciones célula a célula. Esta coagregación permite el desarrollo de una comunidad multiespecie que posteriormente aumentará su densidad celular local y desarrollará microambientes en la biopelícula (Jakubovics y cols., 2010).

La importancia de esta biopelícula es que promueve la capacidad cariogénica de las bacterias productoras de ácido, otorgándoles estabilidad y protección respecto a otras especies y a las defensas del hospedero. En estas biopelículas existen interacciones microbianas de colaboración, sinergismo y antagonismo (no es colaborativo) que contribuyen tanto a la estabilidad ecológica como a la virulencia y potencial patogénico microbiano. Esto hace que las enfermedades asociadas a biopelícula sean muy difíciles de tratar, debido a la protección que otorga la matriz contra los agentes antimicrobianos y la existencia de poblaciones bacterianas resistentes a éstos (Eick, 2021).

Como ya se mencionó las enfermedades orales más prevalentes como la caries y la periodontitis están asociadas a biopelículas de múltiples especies. Si bien no actúan solos, los patógenos claves impulsan el desarrollo de un cambio microbiano que, sumado a los factores del hospedero, favorece la transición y mantención de la disbiosis (Rathee y Sapro, 2021).

2.5 *Streptococcus mutans*

Streptococcus mutans es una especie de bacterias cocáceas, Gram positivo y anaerobias facultativas, por lo que en concentraciones de dióxido de carbono cercanas al 10% su crecimiento se ve favorecido (Lemos y cols., 2013). Al observar su organización al microscopio electrónico se pueden visualizar células cocáceas agrupadas en cadenas o en diplos (Forssten y cols., 2010). En agar TYCS se observan colonias adherentes, difíciles de disgregar y de superficie granular con aspecto similar al vidrio esmerilado (Saravia, 2011). En agar sangre son generalmente α -hemolíticas o γ -hemolíticas y la temperatura óptima para su crecimiento es entre 35-37°C (Jakubovics y cols., 2010).

Su estilo de vida incluye una gran tolerancia a los ambientes ácidos, capacidad acidúrica y la producción de ácido láctico como resultado del metabolismo de azúcares fermentables (Richards VP y cols., 2017).

Su capacidad cariogénica está dada por sus factores de virulencia destacando su alta capacidad de adhesión a los tejidos dentarios, su capacidad de generar reservas de glucógeno y su habilidad de sintetizar polisacáridos extracelulares a partir de glucosa, sacarosa y fructosa (Forssten y cols., 2010; Krzysciak y cols., 2014).

Su metabolismo permite que frente a un exceso de carbohidratos en el ambiente la bacteria sea capaz de producir ácidos que disminuyen el pH de su microambiente, seleccionando de esta forma a aquellas especies bacterianas capaces de sobrevivir en estas condiciones, entre ellas su propia especie (Gross y cols., 2012). Además, al ser una especie acidúrica es capaz de continuar la producción de ácidos y por tanto seguir disminuyendo el pH oral, desencadenando como consecuencia el proceso de desmineralización del tejido dentario (Abranches, 2018). Por lo anterior es factible considerar a esta especie como un agente cariogénico (García-Godoy y Hics, 2008).

Antiguamente la enfermedad de caries se atribuía exclusivamente a la especie *Streptococcus mutans*, sin embargo, los estudios actuales mediante técnicas de secuenciación han revelado que existe un espectro más amplio y diverso de especies que contribuyen a la patogenia de la caries dental tales como *Scardovia wiggsiae*, *Lactobacillus salivarius*, *Streptococcus mutans* y *Parascardovia denticolens*, todas acidógenas. También destacan algunas especies pertenecientes a los géneros *Actinomyces*, *Bifidobacterium*, *Veillonella*, *Selenomonas*, *Propionibacterium* y *Atopobium* entre otros (Fakhruddin K y cols., 2020). Hoy en día se sabe que se puede cursar la enfermedad de caries independiente de la presencia o cantidad de *Streptococcus mutans*, debido a que no es el único microorganismo involucrado en la patogenia de esta (Fakhruddin K y cols., 2020). No obstante, en niños con caries de la infancia temprana se ha visto que es la bacteria que tiene un rol cariogénico predominante (Seow WK, 2018; Banas JA y cols., 2018). Por lo mencionado, es una de las especies bacterianas más investigadas (Rathee y Sapra, 2021) y utilizada en estudios *in vitro* sobre actividad cariogénica, ya que se conocen gran parte de sus factores de virulencia, metabolismo y características genéticas (Abranches J y cols., 2018). Cabe destacar que esta y otras especies acidogénicas en presencia de sustratos fermentables sobre la superficie dentaria y su consecuente acidificación provoca un desequilibrio químico y fisiológico que determina la pérdida de espesor mineral generando una lesión de caries (Abranches J y cols., 2018).

2.6 Lesión de caries

El proceso de desmineralización puede ser tanto reversible como irreversible. Siendo la primera condición una lesión en donde no existe aún una cavitación del esmalte dentario por lo que existe la posibilidad de que pudiese ser remineralizado para mantener la integridad del tejido dental (Fontana y cols., 2010). En el caso de una desmineralización irreversible, nos encontramos frente a una pérdida de tejido dentario en donde el objetivo terapéutico es detener el avance de la lesión de caries (Gómez, 2001).

La lesión de caries se describe en etapas, en su estado inicial se denomina caries incipiente la cual es macroscópicamente invisible ya que se encuentra en el esmalte subclínico (Balda y cols., 1999). Si la desmineralización de los tejidos continua, estos cambios podrían volverse visibles luego de secar prolijamente sobre la superficie del esmalte, manifestándose con una apariencia blanca y opaca de aspecto tizoso y sin brillo a la cual se denomina mancha blanca (Gugnani y cols., 2011). En esta etapa la lesión puede ser revertida y/o detenida con productos químicos que promueven el restablecimiento del equilibrio entre los procesos de remineralización y desmineralización (Fontana y cols., 2010). Sin embargo, una vez que las lesiones de mancha blanca se distinguen sin necesidad de secar la superficie estamos frente a una desmineralización de carácter más avanzado en la cual se ha comprometido completamente el espesor del esmalte, alcanzando el límite amelodentinario y pudiendo incluso llegar a afectar la dentina (Forssten y cols., 2010). Si la tasa de desmineralización se mantiene en el tiempo puede desencadenar una pérdida de estructura mineral de tal gravedad que se manifiesta en una cavitación irreversible (Gómez, 2001).

2.7 Remineralización

El equilibrio entre la desmineralización y la remineralización es un proceso fisicoquímico dinámico (Paes Leme, 2004). El proceso de remineralización a menudo se utiliza como sinónimo de reparación o endurecimiento del esmalte y se define como una reposición de los minerales perdidos (Cury, 2009). Si no se logra controlar el desarrollo de la biopelícula y la exposición a hidratos de carbono fermentables no hay forma de detener la pérdida de mineral. La repetición constante de los episodios de desmineralización eventualmente supera la capacidad reparadora de los fluidos orales iniciándose la manifestación de signos clínicos de la enfermedad, tales como las manchas blancas y las lesiones cavitadas (Fejerskov, 2004; Cury 2009).

2.8 Remineralizantes y cariostáticos

Para prevenir y/o detener el proceso de desmineralización, actualmente existen varios enfoques como, por ejemplo, la evaluación de factores de riesgo, una correcta instrucción de higiene oral y la protección del hospedero susceptible (Urzúa y Moncada 2008). Dentro de este último enfoque se utilizan distintos agentes ya sean remineralizantes o cariostáticos para aumentar así la protección del hospedero.

Los remineralizantes son agentes que buscan promover la remineralización del tejido dental (Lynch y Smith 2012), aumentando su resistencia a los ácidos resultantes del metabolismo bacteriano (Cochrane y cols., 2010). Si bien la saliva funciona como un remineralizante natural existen remineralizantes sintéticos como el fosfopéptido caseína fosfato cálcico amorfo (CPP-ACP de Recaldent®), el fosfato β -tricálcico funcionalizado (β -TCP) (Clinpro®), el Fosfato de calcio amorfo (ACP®) y fosfosilicato de calcio y sodio (NovaMin®) (Cochrane y cols. 2010).

Por otra parte, los cariostáticos son agentes que inhiben la progresión de la caries dental, disminuyen la sensibilidad dentinaria y remineralizan la dentina cariada (Mamani y cols., 2012). Suelen ser en base a flúor, agente con amplia evidencia respecto a su efectividad (Marinho y cols.,

2003, Walsh y cols., 2010).

2.9 Flúor

Dentro de los agentes cariostáticos más reconocidos encontramos los barnices y geles de flúor, cuyas propiedades permiten un aumento de la remineralización y una disminución de la desmineralización en etapas tempranas de la enfermedad (Fejerskov, 2004). Su mecanismo de acción consiste en la formación de enlaces entre los fluoruros presentes en el agente y los minerales propios de los tejidos dentarios (Marinho y cols., 2003; Tenuta y cols. 2008).

El flúor (F) es un elemento químico perteneciente al grupo de los halógenos, posee bajo peso atómico y una gran electronegatividad. Debido a estas propiedades posee gran capacidad para formar enlaces, por lo que suele encontrarse combinado con más elementos en forma de sales de fluoruro siendo las más importantes el fluoruro de calcio o fluorita (CaF_2), el fluoraluminio de sodio o criolita (Na_3AlF_6) y el fluorofosfato de calcio o fluorhidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$). Tanto la fluorita como la criolita son las principales fuentes industriales de obtención de sales solubles de fluoruro para uso odontológico, siendo las más comunes las de fluoruro de sodio (NaF) y de monofluorofosfato de sodio (Na_2FPO_3) (Gómez, 2010).

La presencia de flúor favorece la formación de moléculas más resistentes en los tejidos dentales como la fluorapatita o el fluoruro de calcio. La fluorapatita se forma una vez que se reemplazan los iones hidroxilos de la hidroxiapatita por iones fluoruros generando una mayor resistencia química y modificando el pH necesario para desestabilizar la molécula a un valor menor a 4.5 (Whelton y cols. 2004). El fluoruro de calcio por su parte se conforma y mantiene en el medio oral siendo un reservorio de iones flúor y calcio dependientes del pH. La molécula es estable a pH neutro, pero una vez que éste desciende se disocia proporcionando protección frente al ataque ácido incorporando iones fluoruro a la

estructura de la hidroxiapatita para formar la fluorhidroxiapatita. Como resultado, estos cristales recién formados o parcialmente regenerados son menos solubles y más resistentes a futuros episodios de bajas de pH (Beltrán y Goldstein 2000, Zamora y cols., 2006, Buzalaf y cols., 2011).

Adicionalmente el fluoruro posee actividad antimicrobiana, interfiriendo en el ciclo glicolítico bacteriano y desregulando así la actividad enzimática del metabolismo de carbohidratos (Gómez, 2010; Ten Cate, 2013). Por otro lado, genera cambios en la carga superficial del diente, impidiendo la formación de la película adquirida y, por lo tanto, la adherencia de los microorganismos al diente (Núñez y cols., 2010). Sin embargo, el flúor posee algunas desventajas tales como la posibilidad de generar efectos adversos indeseables tales como fluorosis (si es usado en altas dosis sistémicas) y toxicidad (Roberson y cols., 2006).

Algunas de sus presentaciones más destacadas en odontología son el fluoruro de sodio al 5% (Duraphat®), Fluoruro diamino de plata 38% (FAGamin®) y Flúor Silano 0.1% (Fluor Protector ®).

2.10 Fluoruro Diamino de Plata

Un destacado agente utilizado en el mercado odontológico para prevenir y detener las lesiones de caries es el fluoruro diamino de plata (FDP) de fórmula química $\text{Ag}(\text{NH}_3)_2\text{F}$ (Contreras, 2017), el cual posee efecto cariostático y remineralizante (Rosenblatt y cols., 2009; Rajendra y cols., 2017). Su capacidad remineralizante se debe a la interacción entre el fluoruro y la hidroxiapatita, generando como resultado de varias reacciones químicas fluorapatita e hidróxido de sodio lo que en consecuencia aumenta el pH volviendo básico el ambiente (Rosenblatt y cols., 2009). Mientras que sus propiedades antibacterianas consisten en la eliminación bacteriana e inhibición de la formación de la biopelícula. Su mecanismo de acción es producto de la interacción de la plata con los grupos sulfhídricos de las proteínas y el ADN de las bacterias, lo cual interfiere en los enlaces de hidrógeno provocando la inhibición de procesos bacterianos fundamentales como la respiración, división celular

y síntesis de pared (García y cols., 2013). Sin embargo, también tenemos interacción entre el nitrato de plata con la hidroxiapatita dando como resultado nitrato de calcio, fosfato de plata y óxido de plata, compuestos a considerar ya que generarán una tinción oscura en la superficie tratada afectando su estética (Rosenblatt y cols. 2009). Otros efectos poco deseables corresponden a su sabor metálico y la posibilidad de irritar las mucosas y encías en relación con el diente tratado, pudiendo generar además una sensibilidad postoperatoria (Rosenblatt y cols., 2009). Por último, es un agente que posee una alta toxicidad sobre algunas células orales debido a la presencia de plata en su composición (Yamamoto, 1998).

2.11 Flúor Silano

El barniz de flúor- silano (FS), es utilizado para la prevención y detención del avance de las lesiones de caries como también para el manejo de la hipersensibilidad dentinaria (Salazar, 2017). Es un barniz de poliuretano con base de fluoruro silano al 0,9%, lo que equivale a un 0,1% de fluoruro o 1000 ppm (Seppa, 2004). Dentro de sus propiedades podemos mencionar su color transparente, bajo pH, una muy baja viscosidad, buena acción humectante y alta volatilidad. Gracias a lo anterior posee una elevada penetración en las porosidades de la estructura del esmalte (Arends y cols., 1990). Su mecanismo de acción consiste en fortalecer el esmalte para protegerlo contra la desmineralización y promover la remineralización formando una capa de Fluoruro de calcio (CaF_2) (Mishra, 2014). Esto lo hace formando una fina película transparente en la superficie dental que liberará flúor en bajas cantidades de manera continua (Pinar Erdem, 2012).

Existen variados estudios que han demostrado que a pesar de ser un agente de remineralización efectivo, existen otros productos que clínicamente logran una mayor adquisición de fluoruro por parte del esmalte dentro de los que se pueden mencionar barnices de fluoruro de sodio como el Duraphat® (Seppa, 2004).

En cuanto a su efecto bactericida existe evidencia de que el flúor silano posee actividad bactericida tanto *in vivo* como *in vitro* (Ben Khadra, 2019; Pinar Erdem, 2012). Su mecanismo de acción se basa principalmente en su bajo pH y su composición de difluorsilano ya que frente a situaciones donde el pH oral desciende el flúor se difundirá en la bacteria en forma de ácido fluorhídrico. El ácido fluorhídrico afectará el pH del citoplasma afectando el metabolismo bacteriano y las funciones enzimáticas que permiten el ciclo glicolítico (Pinar Erdem, 2012).

2.12 Antimicrobianos

Los antimicrobianos son agentes que se utilizan para prevenir y/o tratar infecciones tanto en los seres humanos como en animales y plantas.

Estos agentes se pueden clasificar, según su efecto en el microorganismo, como bactericidas o bacteriostáticos (Kazimierczak y cols., 2022). Un antimicrobiano bactericida es aquel que posee la capacidad de provocar la muerte de la bacteria, mientras que un agente bacteriostático provocará una inhibición del crecimiento bacteriano (Kazimierczak y cols., 2022). Lo anterior se relaciona directamente con la concentración inhibitoria mínima (CIM) y la concentración mínima bactericida (CMB), donde CIM corresponde a la mínima concentración de antimicrobiano necesaria para inhibir el crecimiento de 10^5 bacterias en 1 mL de medio de cultivo tras 18 a 24 horas de incubación, mientras que CMB corresponde a la menor concentración capaz de destruir o matar 10^5 bacterias en 1 mL de medio de cultivo tras 18 a 24 horas de incubación (Peterson y cols., 1992).

Existen agentes que según la concentración en que se presentan poseen ambos efectos antimicrobianos en las células y uno de los más utilizados en odontología es la clorhexidina (Thangavelu y cols., 2020).

2.12.1 Clorhexidina

La clorhexidina (CHx) es una bisguanida desarrollada en la década de 1940 en Reino Unido y en 1976 comenzó a implementarse como enjuague bucal (Balagopal y Arjunkumar, 2013). Actualmente corresponde al agente quimioterapéutico más potente y el “*gold standard*” para la reducción de *Streptococcus mutans* y la biopelícula oral (Raszewski y cols., 2019). Dentro de sus formulaciones en odontología encontramos enjuagues bucales, geles y barnices.

Su mecanismo de acción consiste en una atracción de la molécula catiónica de CHx a la superficie bacteriana que contiene fosfatos y grupos sulfatos por lo que posee una carga negativa. Se forma un enlace entre la CHx y las cargas negativas en la biopelícula lo que incluye a bacterias, polisacáridos extracelulares y glicoproteínas (Poppolo Deus, y Ouanounou, 2022). Lo anterior genera una adsorción fuerte y específica del fosfato contenido en los distintos componentes de la membrana celular bacteriana, permitiendo la penetración por difusión pasiva hacia la membrana citoplasmática y comprometiendo su integridad para dar como resultado una mayor permeabilidad. La salida desde el microorganismo de variados compuestos y componentes citoplasmáticos provoca la inhibición de la actividad de algunas enzimas asociadas a la membrana citoplasmática. En este punto, la acción antimicrobiana de la CHx permanece en el nivel bacteriostático. Sin embargo, si la concentración de CHx se mantiene estable en el tiempo o aumenta, provocará un daño celular irreversible y por tanto un efecto bactericida (Thangavelu y cols., 2020).

Debido a la carga negativa de la mayoría de las superficies bucales (incluidas las membranas mucosas, los dientes y glicoproteínas salivales), la naturaleza catiónica de las moléculas de CHx presentan buena adherencia a estas superficies interfiriendo con la adhesión bacteriana y por ende con la formación de biopelículas (Poppolo Deus, y Ouanounou, 2022).

A pesar de ser el antimicrobiano “*gold standard*” existen reportes de

variadas reacciones adversas a CHx (Brookes y cols., 2020). Se ha reportado que en enjuagues dentales de concentraciones 0,12% y 0,2% la mayoría de las reacciones adversas corresponden a una alteración del sentido del gusto, dolor o entumecimiento de boca y/o lengua, xerostomía y decoloración de la lengua (Poppolo Deus, y Ouanounou, 2022). Sin embargo, los efectos adversos de mayor gravedad, aunque muy poco frecuentes, son las reacciones de hipersensibilidad y anafilaxia (Brookes y cols., 2020). Adicionalmente existen estudios que indican que al ser un antiséptico de amplio espectro afecta también la microbiota oral comensal pudiendo generar un mayor riesgo de disbiosis en la cavidad oral cuyo resultado es el desarrollo de enfermedades orales (Chatzigiannidou y cols., 2020).

2.12.2 Cobre

Antes del desarrollo de los antibióticos los agentes antibacterianos inorgánicos tales como la plata y el cobre fueron utilizados para tratar las infecciones microbianas (Sharan R y cols. 2010).

El cobre es un metal de transición y el vigésimo sexto elemento más abundante en la corteza terrestre. Posee propiedades físicas y químicas únicas que han permitido su uso en salud desde el año 3.000 a.C. (Ma y cols., 2022).

Corresponde a un oligoelemento esencial para los seres humanos por su participación en variados procesos fisiológicos tales como la formación ósea, la cicatrización de heridas, promoción de angiogénesis y actividad enzimática. Por otra parte, existen microorganismos que utilizan cobre para mantener sus funciones metabólicas, pero en altas concentraciones se vuelve tóxico (Maung y cols., 2021; Dupont y cols., 2011).

Actualmente en odontología existe una gran variedad de materiales restauradores a los que se ha adicionado cobre, entre ellos podemos mencionar las coronas metal-porcelana, algunas estructuras de las prótesis dentales removibles, las amalgamas e implantes (Ma y cols., 2022).

Los avances en nanotecnología han permitido desarrollar más usos para el cobre dentro del campo médico y específicamente en odontología se ha demostrado su acción antibacteriana frente a *Streptococcus mutans*.

Su mecanismo de acción consiste en la liberación de los iones de cobre provocando la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que destruyen tanto pared como membrana celular y, además, desestabilizan proteínas y material genético (Wang y cols, 2017). Adicionalmente los iones de cobre pueden unirse o reemplazar a los cofactores de las metaloproteínas (Fu y cols., 2014).

Inicialmente los iones metálicos entran en contacto directo con la pared celular, la cual se encuentra cargada negativamente tanto para Gram positivo como negativo. Esta interacción electrostática inicia la destrucción de la pared celular provocando la exposición de la membrana celular. Una vez expuesta la membrana las ROS se unen a los ácidos grasos de los fosfolípidos provocando una destrucción de la membrana que aumenta la permeabilidad y expone el contenido celular para finalmente provocar la muerte celular (Mitra D. y cols., 2019). Sin embargo, es importante mencionar que el efecto sobre las bacterias Gram positivas es más fuerte que en las Gram negativas. Se postula que este fenómeno se debe a que el cobre posee una mayor afinidad con las proteínas que con los lípidos, siendo la diferencia estructural de ambas paredes la alta cantidad de peptidoglicano que posee la pared Gram positivo (Tao B. y cols., 2019).

Múltiples estudios han demostrado la capacidad antimicrobiana del cobre frente a *Streptococcus mutans*, se postula que frente a altas concentraciones extracelulares de cobre los iones ingresan a las células e inhiben la transcripción de genes de glucosiltransferasa (gtf) y la proteína fijadora de glucano (gbp). Esta interferencia reduce la actividad celular, la adherencia y biomasa de la biopelícula (Singh K. y cols., 2015; Devulapalle KS. y cols., 2001).

Las bacterias tienen mecanismos para combatir la variación de concentración de iones cobre y mantener su homeostasis. En el caso de *Streptococcus mutans* posee con una ATPasa que le permite tolerar altas

concentraciones extracelulares de cobre y además puede oxidar Cu^+ intracelular a Cu^{+2} , que es menos tóxico. A pesar de lo anterior, el cobre logra inhibir eficazmente a *Streptococcus mutans* debido a sus múltiples mecanismos de acción (Vats N. y cols., 2001; García SS. y cols., 2016).

El mecanismo de acción antibacteriana del cobre no está completamente esclarecido y a la fecha aún se requieren más estudios para comprender todas sus dimensiones. Sin embargo, se sabe que estos múltiples y variados mecanismos antibacterianos simultáneos reducen la probabilidad de que las bacterias generen un mecanismo de resistencia al cobre (Ma, 2022).

Finalmente, sus efectos adversos corresponden principalmente a la citotoxicidad generada por las altas concentraciones de cobre, pero al compararlo con la plata el cobre tiene un efecto mucho menos tóxico sobre las células de los mamíferos (Bondarenko y cols., 2013).

2.13 Grafeno

El grafeno es un material derivado del grafito, una de las formas cristalinas del carbono. Corresponde a nanoláminas de carbono unidas mediante enlaces covalentes por un solo átomo de espesor en una estructura hexagonal plana similar a un panal de abejas. El grafeno de alta calidad es muy fuerte, ligero, un excelente conductor de calor y electricidad y casi transparente (Geim y Novoselov 2007). Es renovable, fácil de obtener y más barato que los metales y óxidos metálicos (Haiwei Ji, 2015). Ha demostrado tener propiedades muy útiles en el ámbito biomédico debido a su capacidad antibacteriana, la cual se atribuye tanto a sus efectos físicos como químicos en las bacterias (Haiwei Ji, 2015). El daño físico se produce por el contacto directo de los bordes afilados de la molécula con la pared y membrana celular bacteriana, provocando la reducción de su actividad metabólica y crecimiento. El daño químico se atribuye a la generación de especies reactivas de oxígeno provocando estrés oxidativo (Haiwei Ji, 2015).

Estudios actuales evidencian que compuestos y derivados del grafeno

poseen efecto citotóxico en bacterias, hongos y fitopatógenos de poca resistencia (Haiwei Ji, 2015), sin dañar significativamente las células mamíferas (Wenbing Hu y cols., 2010). En el ámbito odontológico su derivado, el óxido de grafeno, modificado por el número de oxígenos presentes en su estructura (Zhu y cols., 2010), ha evidenciado efectos bactericidas en patógenos dentales como *Streptococcus mutans*, *Porphyromona gingivalis* y *Fusobacterium nucleatum*. A través de microscopía electrónica de transmisión, se evidenció que al entrar en contacto con estas bacterias afecta la integridad de la pared y membrana celular de dichos microorganismos (Jianliang H. 2015).

2.14 Declaración del problema

Si bien el uso de los agentes anteriormente mencionados es efectivo en el control y tratamiento de la caries dental, se sigue buscando desarrollar productos que ayuden en la prevención de ésta. Los protocolos de prevención deben implicar agentes que mantengan el equilibrio entre la desmineralización y la remineralización y además posean efecto antimicrobiano (ten Cate, 2012). Es en esta búsqueda que un equipo multidisciplinario de la Universidad de Chile desarrolla un nuevo agente remineralizante formulado en base a flúor, cobre y grafeno llamado Blue Remin®. De fórmula química $\text{Cu}(\text{NH}_3)_6\text{F}_2$, es un agente con tres componentes principales: En primer lugar, un agente remineralizante que corresponde al fluoruro (24.000 ppm). En segundo lugar, está el cobre (70.000 ppm), agente antimicrobiano inorgánico disuelto en una solución de amoníaco con un rango de concentración en agua entre un 1 y un 50 % v/v. Y finalmente, un agente estabilizador que corresponde a la estructura de carbono derivada del grafeno, específicamente el óxido de grafeno en una concentración de 0,02 g/mL, el cual presenta conocidas propiedades antimicrobianas.

Es un producto de aplicación tópica que además de sus propiedades remineralizantes posee la ventaja de no generar una tinción extrínseca de la superficie de los dientes (Patente N°201602960 en nuestro país y en Estados Unidos WO2018090156A). A la fecha se han desarrollado estudios respecto a la capacidad de remineralización *in vitro* de Blue Remin® (BR) en modelos de caries monoespecie de *Streptococcus mutans*, y en ellos se demostró el aumento de los valores de la microdureza superficial tanto en esmalte como en dentina. Para continuar desarrollando este nuevo agente y eventualmente llevarlo a la práctica odontológica clínica aún se requieren más estudios.

En base a los antecedentes reportados, en este trabajo se propone estudiar su potencial como agente antibacteriano considerando las características antimicrobianas de sus componentes principales: flúor, cobre y grafeno (Haiwei Ji, 2015).

2 HIPÓTESIS

El agente remineralizante Blue Remin® presenta acción antibacteriana *in vitro* al igual que otros agentes remineralizantes como fluoruro diamino de plata y el barniz de flúor silano.

3 OBJETIVO GENERAL

Comparar, mediante ensayos de actividad antimicrobiana *in vitro*, la capacidad antimicrobiana de Blue Remin®, Flúor silano y Fluoruro diamino de plata.

4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar la actividad antimicrobiana de Blue Remin®, Flúor silano y Fluoruro diamino de plata.
2. Comparar la actividad antimicrobiana de Blue Remin®, Flúor silano y Fluoruro diamino de plata.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

Tipo de estudio: Estudio analítico de tipo experimental *in vitro*, que consistió en evaluar las propiedades antimicrobianas de un nuevo agente remineralizante del esmalte dentario comparado con otros agentes de remineralización disponibles en el mercado.

6.1 Cepas, agentes remineralizantes y antimicrobianos.

Se utilizaron 12 cepas de la especie *Streptococcus mutans*, correspondientes a 2 cepas de colección (*American Type Culture Collection, ATCC, Rockville, MD, USA*) y 10 aislados clínicos previamente identificados molecularmente, provenientes del laboratorio de microbiología de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, pertenecientes al cepario de la Dra. Patricia Palma Fluxá, criopreservadas a -80°C en glicerol al 50%.

A cada cepa clínica de *Streptococcus mutans* se le asignó un número del 1 al 10 como se especifica en la **Tabla N°1** y las cepas de colección recibieron los números 11 (ATCC 25175) y 12 (ATCC 38668) respectivamente.

Número	Cepa clínica
1	G13-2P
2	G14-1P
3	G71-1P
4	G90-1P
5	G06-2P
6	U15-2P
7	U10-1P
8	U05-1P
9	U12-1P
10	U31-2P

Tabla N° 1. Asignación numérica de cepas clínicas

6.1.1 Obtención de las cepas en medio sólido.

Para el cultivo en medio sólido se utilizó agar TYCS preparado según lo reportado por Wan, K. L. y cols., (2002). Se esterilizó en autoclave y se dejó enfriar hasta 45-50°C bajo campana de flujo laminar, luego se dispensaron aproximadamente 20 ml de medio en placas de Petri estériles las que posteriormente se dejaron 24 horas en la estufa a 37°C para confirmar su esterilidad.

Para la obtención de cepas en una placa de Agar TYCS se sembró una asada de cada cepa de *Streptococcus mutans* criopreservada y se incubó a 37°C durante 48 horas en condiciones de microaerofilia.

6.1.2 Obtención de cultivos en medio líquido.

Una vez obtenido crecimiento en agar y comprobado la pureza del cultivo mediante la observación de sus características macroscópicas y microscópicas compatibles con *Streptococcus mutans*, se traspasó entre 3 y 5 colonias a medio líquido Tryptic Soy Broth (TSB) preparado según las instrucciones del fabricante y con sus respectivos controles de calidad. Los cultivos líquidos fueron sembrados nuevamente en medio sólido TYCS para el control de pureza y viabilidad de los inóculos.

Las suspensiones bacterianas se ajustaron al estándar de 0.5 *Mc Farland* para todos los ensayos realizados.

6.1.3 Mantención de cultivos viables

Los aislados de las distintas cepas utilizadas se mantuvieron durante la fase experimental, mediante resiembras cada 2 días en nuevas placas de agar TYCS en las mismas condiciones ya descritas.

6.1.4 Obtención de los agentes remineralizantes con potencial antimicrobiano

1. **Blue Remin®:** El agente experimental 6,4% de concentración, compuesto de flúor (24.000 ppm), cobre (70.000 ppm), y grafeno 0,02 g/mL. Elaborado por un equipo multidisciplinario de la Universidad de Chile fue proporcionado y almacenado en un envase estéril, hermético y rotulado a 4°C.
2. **Flúor Silano:** Se utilizó agente remineralizante Fluor Protector® (Ivoclar Vivadent A.G., Madrid - España), compuesto con base de difluoro silano 0,9% con un 0,1% de fluoruro o 1000ppm de fluoruro. Utilizado para la prevención y detención del avance de las lesiones de caries. Fue adquirido en ampollas de 1 mL en una tienda de insumos dentales y almacenado en un envase estéril, hermético y rotulado, a temperatura ambiente.
3. **Fluoruro diamino de plata: Fluoruro diamino de plata:** Se utilizó agente remineralizante de marca FAgamin® 38% (Tedequim S.R.L.,Córdoba – Argentina) compuesto por 44.800 ppm de fluoruro y 253.870 ppm de ion plata. Fue adquirido en una tienda de insumos dentales y fue almacenado en su frasco a temperatura ambiente y al momento de ser utilizado se traspasó a un envase estéril, hermético y rotulado.
4. **Suero fisiológico:** Se utilizó como control negativo. Se trabajó con ampollas de suero fisiológico estéril Braun® al 0,9%, las cuales fueron rotuladas y almacenadas, a 4°C.
5. **Clorhexidina:** Se utilizó como control positivo por su conocido efecto antimicrobiano. Se trabajó con colutorio de la marca Perio-aid® adquirido en la farmacia, cuyos componentes son Digluconato de Clorhexidina 0,12% y Cloruro de cetilpiridinio 0,05%. Este colutorio fue almacenado en su envase comercial, hermético y rotulado, a 4°C.

6.2 Diseño Experimental

Se diseñaron 3 ensayos con el fin de caracterizar las propiedades antimicrobianas cuantitativa y cualitativamente.

6.2.1 Ensayo de Difusión en Agar o *Agar diffusion assay*

Cada cepa bacteriana fue ensayada de manera individual en placas de agar TYCS, previamente rotuladas, en las cuales se sembraron 200 μL de suspensión bacteriana en césped utilizando una torula de algodón estéril (hisopo) y girando la placa 3 veces en 90° . Posteriormente en cada placa se posicionaron de manera equidistante los distintos discos de papel absorbente embebidos en una alícuota de 10 μL de Blue Remin®, Fluoruro diamino de plata, Flúor silano, clorhexidina y suero fisiológico como control positivo y negativo respectivamente (Kirby-Bauer, 1996). Las placas se incubaron en jarra con vela (microaerofilia) por 48 h a 37°C . Posterior a la incubación se midieron los diámetros de los halos de inhibición del crecimiento bacteriano, usando pie de metro expresados en milímetros. Se registraron los resultados en una tabla Excel para su posterior análisis y pruebas estadísticas. Cuando no se observó zona de inhibición alrededor del disco de papel, se registró el resultado como cero (0). Este ensayo se realizó por duplicado en experimentos independientes.

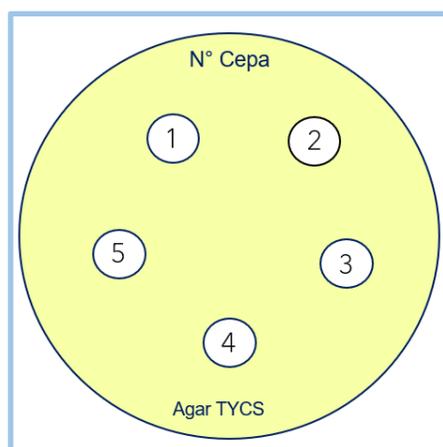


Figura N° 1 Esquema de ensayo de difusión en agar utilizando discos de papel absorbente embebidos en los distintos agentes remineralizantes con potencial antimicrobiano en estudio: (2) FDP (3) FS (4) BR, (1 y 5) CHx y SF control positivo y negativo respectivamente.

6.2.2 Ensayo de microdilución en caldo

Este ensayo se realizó en placas de cultivo celular de 96 pocillos, de fondo redondeado. El inóculo se preparó a partir de un cultivo fresco de *Streptococcus mutans* de 24 horas de crecimiento, del cual se tomó una alícuota que se agregó a 3 mL de caldo TSB estéril para ajustar la turbidez a 0.5 de *Mc Farland* conformando la suspensión de trabajo (ST).

Seguido a lo anterior en cada pocillo se agregó un volumen de la ST y diferentes volúmenes de los agentes en estudio alcanzando para todos los pocillos un volumen final de 150 μ L en el caso de Blue Remin® y Fluoruro diamino de plata y 50 μ L en el caso de Flúor silano.

Cada agente se ensayó por separado y en duplicado utilizando para ello una concentración inicial correspondiente a la indicada por el fabricante. Esta solución de stock fue alicuotada en la primera fila de la placa en los pocillos de A1 a A12 (Fig. 2).

En la siguiente fila, de B1 a B12 se dispuso la mitad del volumen inicial de cada agente y este proceso se repitió sucesivamente para cada fila de la placa desde B hasta F diluyéndose en total 6 veces cada uno de ellos.

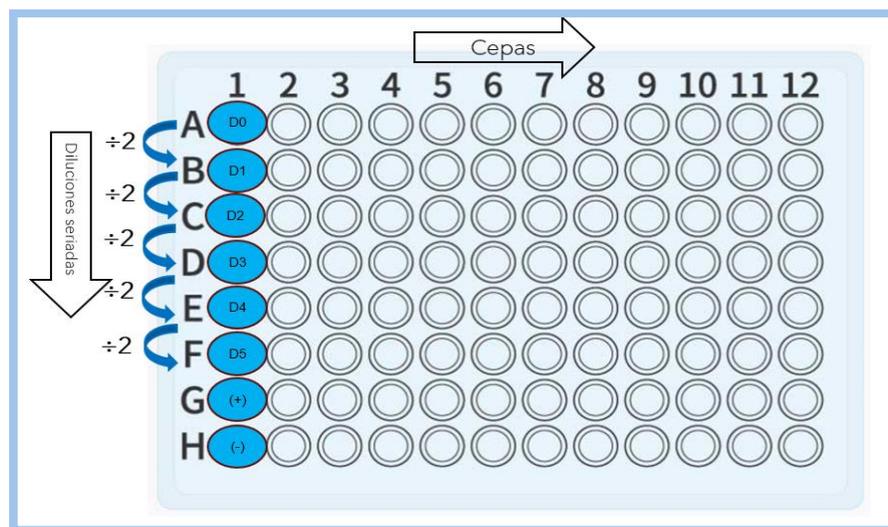


Figura N°2. Esquema de 96 pocillos para ensayo de microdilución en caldo. Las filas (A a la F) corresponden a la dilución (D) realizada y las filas G y H corresponden a los pocillos control positivo y negativo respectivamente. Las cepas fueron trabajadas en las columnas (1 a la 12) según su numeración asignada en la Tabla N°1.

Una vez alicuotada toda la placa se completó cada pocillo con la ST de cada cepa estudiada obteniendo un volumen final de 150 μ L o 50 μ L según el agente. Los volúmenes utilizados para cada agente se detallan en la **Tabla N°2**

Dilución	Agente Remineralizante									Agente antimicrobiano		
	Blue Remin @ 6,4 % (en 150 μ L)			Fluór silano 0,1% (en 50 μ L)			Fluoruro diamino de plata 38% (en 150 μ L)			Clorhexidina 0,12% (en 150 μ L)		
	Volumen (μ L)	Concentración	Porcentaje	Volumen (μ L)	Concentración	Porcentaje	Volumen (μ L)	Concentración	Porcentaje	Volumen (μ L)	Concentración	Porcentaje
D0	75 μ L	3.2 g/mL	50%	25 μ L	0.05 g/mL	50%	75 μ L	19 g/mL	50%	75 μ L	0.006 g/mL	50%
D1	38 μ L	1.28 g/mL	25%	12.5 μ L	0.02 g/mL	25%	38 μ L	7.6 g/mL	25%	38 μ L	0.0024 g/mL	25%
D2	19 μ L	0.64 g/mL	13%	6 μ L	0.01 g/mL	13%	19 μ L	3.8 g/mL	13%	19 μ L	0.0012 g/mL	13%
D3	10 μ L	0.32 g/mL	7%	3 μ L	0.005 g/mL	7%	10 μ L	1.9 g/mL	7%	10 μ L	0.006 g/mL	7%
D4	5 μ L	0.17 g/mL	4%	1.5 μ L	0.0027 g/mL	2%	5 μ L	1.01 g/ml	4%	5 μ L	0.003 g/mL	4%
D5	3 μ L	0.08 g/mL	2%	0.8 μ L	0.0013 g/mL	1%	3 μ L	0.50 g/mL	2%	3 μ L	0.0160 g/mL	2%
D6	1.5 μ L	0.04 g/mL	1%				1.5 μ L	0.25 g/mL	1%	1.5 μ L	0.0008 g/ml	1%
D7	0.8 μ L	0.02 g/mL	0.5%				0.8 μ L	0.12 g/mL	0.5%	0.8 μ L	0.0004 g/ml	0.5%

Tabla N° 2. Diluciones seriadas de agentes remineralizantes con potencial antimicrobiano utilizados en el ensayo de microdilución.

El ensayo se complementó, con un pocillo como control de viabilidad y turbidez (G1 a G12) en el que se agregó solo la suspensión de trabajo y un pocillo para el control de translucidez en el que se agregó caldo TSB estéril (H1 a H12). Como control de inhibición de crecimiento se preparó, con la misma metodología descrita, una placa y su duplicado utilizando Clorhexidina como agente antimicrobiano “*gold standard*” para todas las cepas.

Las placas se incubaron a 37°C durante 48 horas en condiciones de microaerofilia. Pasado este tiempo se realizó una inspección visual evaluando la turbidez de los pocillos en comparación con el pocillo de control de viabilidad. Lo anterior con el fin de determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) determinada a ojo desnudo por la translucidez del caldo.

Para determinar la total ausencia de viabilidad en los pocillos translúcidos, se tomó 10 μ L de cada pocillo y se sembró sobre una placa de agar TYCS previamente rotulada. Lo anterior se consideró debido a que dos de los tres agentes estudiados (BR y FDP) generan una coloración que podía interferir con la evaluación de la translucidez de los caldos obtenidos.

Las placas se incubaron en las mismas condiciones anteriores durante 48 horas. Una vez retiradas de la estufa de incubación se realizó la verificación de la presencia o ausencia de crecimiento bacteriano para cada dilución en

las distintas placas utilizando la lupa estereoscópica. De esta forma se determinó para cada agente la concentración mínima bactericida (CMB). Este ensayo se realizó por duplicado en experimentos independientes.

6.2.3 Ensayo de supervivencia o *Time Killing Test*

Las cepas de *Streptococcus mutans* se sembraron en Agar TYCS. Posterior al tiempo de incubación, fueron traspasadas a caldo TSB para la obtención de una suspensión bacteriana ajustada a una turbidez de 0.5 *McFarland* o suspensión de trabajo (ST).

Para cada una de las 12 cepas estudiadas se prepararon 4 tubos centrifuga tipo Eppendorf, uno para cada agente remineralizante con potencial antimicrobiano. Se realizó el ensayo de manera individual para cada cepa con el correspondiente agente para tener un correcto control de los tiempos.

Cada tubo se preparó según las siguientes proporciones para alcanzar la concentración inicial utilizada en el ensayo anterior:

- 100µL de ST + 50 µL de Clorhexidina.
- 100µL de ST + 50 µL de Fluoruro diamino de plata.
- 100µL de ST+ 50 µL de Blue Remin®.
- 100µL de ST + 50 µL de Flúor silano.

Una vez que el producto se puso en contacto con el inóculo bacteriano se mezcló en vórtex y se evaluó el contacto en 18 tiempos. Todos los tiempos se midieron con cronómetro y una vez alcanzados se sembraron inmediatamente 10 µL de la preparación formada por el agente remineralizante con potencial antimicrobiano y la ST en una placa de agar TYCS previamente rotulada como se indica en la **Figura N° 2** para cada cepa en cada uno de los tiempos medidos.

En el punto de control de viabilidad (+) y en el control de inhibición del crecimiento (-) se agregó la ST sin y con clorhexidina respectivamente (Fig. 2). Las placas se incubaron a 37°C durante 48 horas, luego de este tiempo se realizó la verificación de la presencia o ausencia de crecimiento bacteriano para cada tiempo medido.

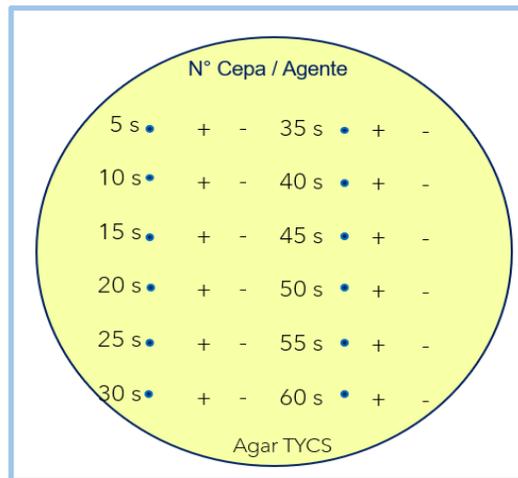


Figura N° 2. Esquema de las placas TYCS marcadas para el ensayo de sobrevivencia. Se marcaron los distintos tiempos en segundos y en paralelo a sus controles. (+) control de viabilidad y (-) control de inhibición.

6.3 Análisis estadístico

Con el objetivo de comparar el efecto antimicrobiano alcanzado por los agentes estudiados se evaluó los resultados obtenidos mediante el test Shapiro-Wilk en el programa SAS versión 9.4. Se compararon las medias y se analizó la existencia de diferencias estadísticamente significativas respecto a la capacidad antimicrobiana de Blue Remin® en comparación al resto de los agentes analizados con un intervalo de confianza de 95%.

6 RESULTADOS

7.1 Ensayo de difusión o *Agar diffusion assay*

En este ensayo se evaluó el halo de inhibición formado por cada agente remineralizante con potencial antimicrobiano sobre un césped de cada una de las 12 cepas de *Streptococcus mutans* ensayadas.

El promedio de la variable “halo de inhibición” en las cepas ensayadas (muestra), desviación estándar (D.S), mínimos y máximos para cada agente se presentan en la **Tabla N°3**.

Tabla N° 3. Halo de inhibición de crecimiento de Streptococcus mutans según agente remineralizante con potencial antimicrobiano.

Agente	Promedio (mm)	D.S	Mínimo	Máximo
Blue Remin®	22,8	4,2	18	32
Fluoruro diamino de plata	41,3	5,9	31	52
Flúor Silano	2,6	2,1	0	6
Clorhexidina (control positivo)	21	3,1	18	27
Suero fisiológico (control negativo)	0	0	0	0
Total	21,9	14,4	0	52

La distribución de la variable “halo de inhibición” en la muestra, es cercana a la normalidad con un pico en las mediciones iguales a 0, como se muestra en la **Figura N°3**.

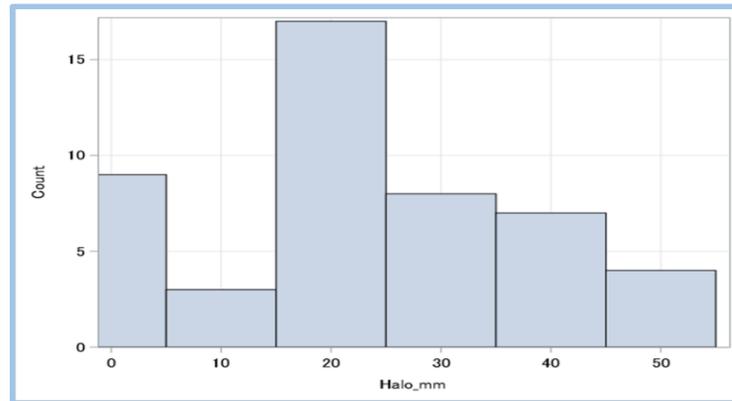


Figura N° 3 Gráfico distribución de la variable “halo de inhibición”. El eje (x) representa el diámetro del halo de inhibición (mm) y el eje (y) corresponde a la cantidad de datos recopilados.

Considerando la distribución de la variable, se seleccionó un modelo de regresión lineal de mínimos cuadrados para evaluar las diferencias entre los distintos agentes estudiados. Este resultado se muestra en la **Figura N°4**.

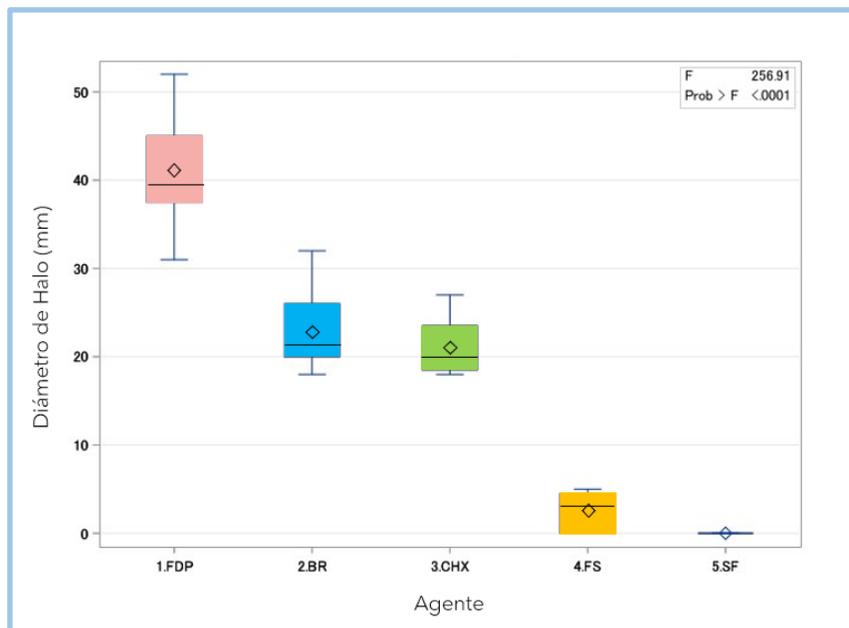


Figura N° 4. Gráfico comparativo del promedio del diámetro de los halos de inhibición del crecimiento de *Streptococcus mutans* según los agentes remineralizantes con potencial antimicrobiano estudiados, utilizando clorhexidina y suero fisiológico como control positivo y negativo respectivamente.

El agente con el halo de inhibición de mayor diámetro fue FDP, el cual presentó en promedio halos significativamente mayores que el resto de los agentes estudiados ($p < 0,0001$ en todas las comparaciones). La mayor diferencia se observó en comparación con el flúor silano (diferencia = 38,7 mm; IC 95% 35,3 - 42 mm).

En contraparte el halo de inhibición de menor diámetro fue el de flúor silano el cual presentó en promedio halos significativamente menores en relación con todos los otros agentes estudiados ($p < 0,0001$). Sin embargo, no hay diferencias significativas con relación a suero fisiológico, utilizado como control negativo ($p = 0,0875$).

En el caso de Blue Remin® no se observaron diferencias significativas con respecto a CHx ($p = 0,297$) que fue el agente utilizado como control positivo. Sin embargo, sí presentó diferencias significativas con respecto a FDP y FS con valores menores y mayores respectivamente.

7.2 Ensayo de dilución

En este ensayo se evaluó y comparó la CIM y CMB de los agentes estudiados mediante la presencia o ausencia de crecimiento de las distintas cepas al aplicar las diferentes diluciones de los agentes remineralizantes con potencial antimicrobiano. Estos resultados se pueden ver en la **Tabla N°4** y la **Figura N°5**.

Tabla N° 4. Porcentaje de cepas de Streptococcus mutans con crecimiento para cada dilución de los distintos agentes remineralizantes con potencial antimicrobiano.

Dilución /Reactivo	Blue Remin	FDP	FS	CHx
D0	0%	0%	100%	0%
D1	0%	0%	100%	0%
D2	0%	0%	100%	0%
D3	0%	0%		0%
D4	8%	0%		0%
D5	8%	0%		8%
D6	92%	0%		17%
D7	100%	0%		25%

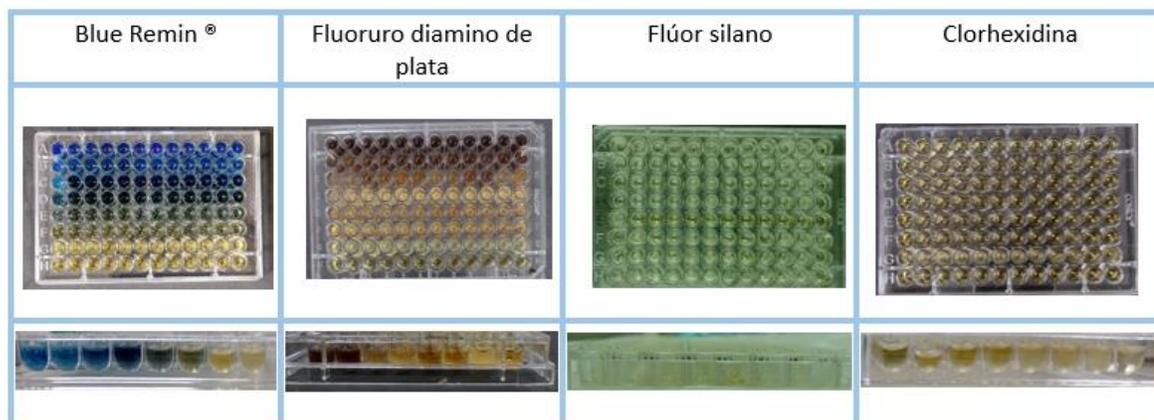


Figura N° 5. Registro visual de la turbidez y translucidez de los distintos pocillos para cada agente estudiado.

Al comparar los resultados de los distintos agentes evidenciamos que FDP independiente de la dilución no disminuyó su capacidad antimicrobiana obteniendo un 100% de inhibición del crecimiento en todas las diluciones. En contraparte, para FS no se observó inhibición del crecimiento bacteriano en ninguna de las diluciones realizadas ni en su concentración de stock. En consecuencia, para ninguno de los dos agentes fue posible determinar la CIM ni la CMB. Estos resultados se pueden observar en la **Tabla N°5** y **Figura N°6**.

Por otra parte, Blue Remin® y Clorhexidina mostraron resultados similares ya que a partir de D4 y D5 respectivamente, aumenta progresivamente el porcentaje de cepas con crecimiento a medida que se diluye el agente (**Figura N°6**). Adicionalmente al evaluar la inspección visual (**Figura N°5**) y la presencia o ausencia de crecimiento (**Tabla N°5**) se observa que para ambos agentes CIM y CMB coinciden.

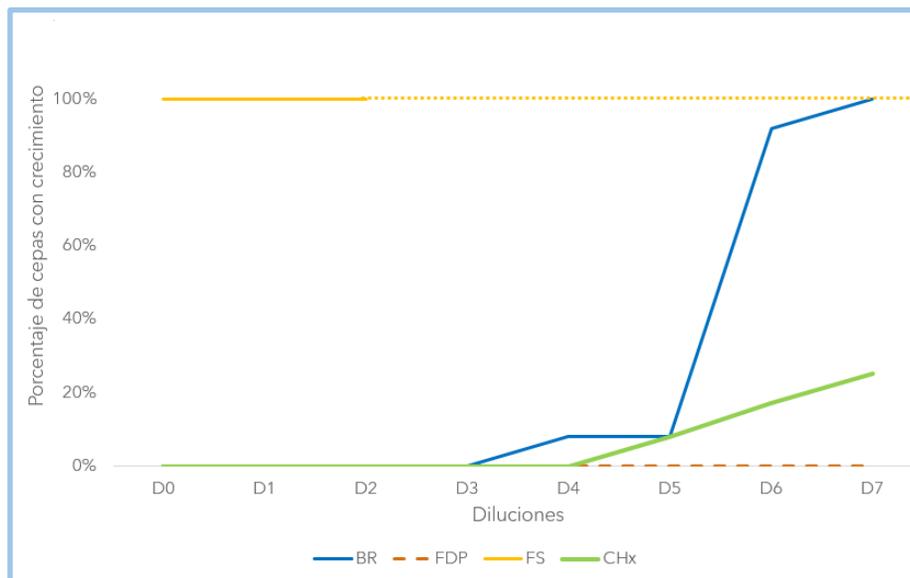


Figura N° 6. Gráfico comparativo del ensayo de microdilución. Se muestra el porcentaje de cepas de *Streptococcus mutans* con crecimiento según la dilución de cada agente remineralizante con potencial antimicrobiano y clorhexidina como agente de control de inhibición de crecimiento.

7.3 Ensayo de supervivencia o *Time Killing test*

Se evaluó la distribución de la variable “segundos” en la muestra (cepas) y para cada agente remineralizante con potencial antimicrobiano. Estos resultados se observan en la **Tabla N°6**.

Tabla N° 5 Tiempo de supervivencia de Streptococcus mutans al contacto con los agentes remineralizantes con potencial antimicrobiano.

Agente	Promedio (segundos)	D.S	Mínimo	Máximo
Blue Remin®	336	370	5	1200
Clorhexidina	5	0	5	5
Flúor silano	1800	0	1800	1800
Fluoruro diamino de plata	5	0	5	5
Total	536	770	5	1800

Se observó que a partir de los 5 segundos (tiempo 0) ninguna de las cepas ensayadas logró sobrevivir al contacto con FDP y CHx por lo que al evaluar las diferencias en los tiempos de supervivencia no se observaron diferencias significativas entre ambos agentes ($p = 1$).

Para Blue Remin® se observó una curva descendente de la supervivencia de las cepas estudiadas, observándose un 90% de supervivencia a los 5 segundos, un 50% entre los 300 y 400 segundos y finalmente a los 1200 segundos de contacto, no se observó supervivencia. Al comparar BR con los resultados de FDP y CHx los resultados del tiempo de supervivencia para estos dos últimos fueron significativamente menores que para BR ($p < 0,0001$; diferencia 331 seg; IC 95% 179 – 484 seg).

Finalmente, para FS la probabilidad de supervivencia durante todos los tiempos evaluados fue de un 100%, evidenciándose un tiempo significativamente mayor que CHx, FDP y BR.

La comparación de los porcentajes de cepas de *Streptococcus mutans* supervivientes al tiempo de contacto con los agentes remineralizantes con potencial antimicrobiano se observa en la **Figura N°7**.

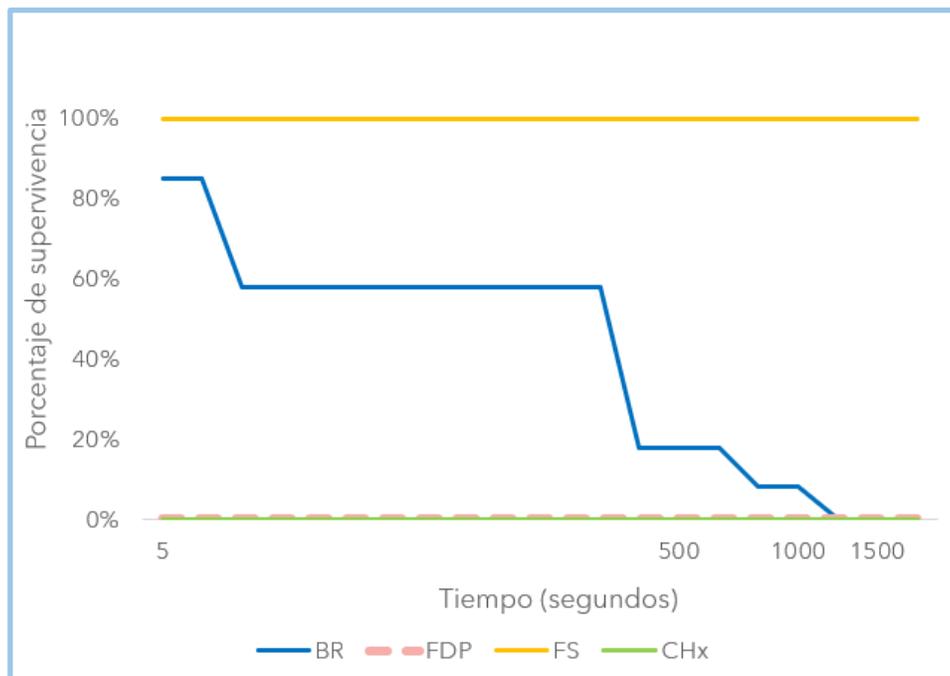


Figura N° 7. Gráfico comparativo de ensayo de Supervivencia. Porcentaje de cepas de *Streptococcus mutans* con crecimiento según el tiempo de contacto con cada agente remineralizante con potencial antimicrobiano y clorhexidina como agente de control de la inhibición de crecimiento.

7 DISCUSIÓN

El enfoque actual de la odontología se basa en la prevención de las distintas enfermedades orales. Sin embargo, cuando la enfermedad comienza a dejar signos irreversibles tales como las cavitaciones nos enfrentamos al dilema entre un tratamiento invasivo o uno de carácter más conservador. Este último es el enfoque actual, donde lo primordial es preservar la estructura dentaria el mayor tiempo posible. En el caso de los tejidos duros, preservar su integridad se dificulta debido a la pérdida de minerales esenciales para la estructura cristalina del esmalte dental y la dentina. Es aquí donde se inicia la búsqueda de agentes que permitan disminuir el avance de las lesiones y adicionalmente disminuir la carga bacteriana estrechamente relacionada con el inicio y avance de las lesiones de caries.

Los remineralizantes estimulan la remineralización del tejido dental además de fortalecerlo frente a un nuevo evento desmineralizante. Principalmente, se trata de compuestos en base a flúor que permitirán que los cristales de hidroxiapatita que componen el esmalte dental se transformen en fluorapatita, la cual es más resistente. Por otro lado, existen los agentes cariostáticos, los cuales además de estimular la remineralización de la dentina cariada van a disminuir la sensibilidad dentinaria y detener la progresión de la enfermedad de caries. Esto lo hacen mediante diferentes mecanismos de acción entre los que se encuentra su acción antimicrobiana que les otorga la característica de bactericida o bacteriostático. Es en este contexto que agentes como Fluoruro Diamino de Plata, Flúor Silano y Blue Remin® poseen estudios previos realizados en FOUCH que demuestran sus propiedades remineralizantes, por lo que en esta investigación se propuso evaluar y comparar sus propiedades antimicrobianas. Luego de realizar los tres ensayos de actividad antimicrobiana propuestos se comparó la capacidad antimicrobiana de Fluoruro diamino de plata, Flúor silano y Blue Remin® contra *Streptococcus mutans*.

En el ensayo de difusión se confirmó la existencia de actividad antimicrobiana de los tres agentes estudiados. Sin embargo, al compararlos existe una evidente diferencia en cuanto a su efectividad.

Al medir las zonas de inhibición FDP se posiciona como el agente de mayor eficacia antimicrobiana con un promedio 41,3 mm, una diferencia estadísticamente significativa respecto a los otros agentes estudiados. Esto coincide con lo reportado por García y cols. en 2013 respecto a los potentes efectos bactericidas de FDP frente a microorganismos orales. Estos resultados son concordantes con la evidencia disponible sobre ensayos *in vitro* con *Streptococcus mutans* en los cuales FDP demostró una clara actividad antimicrobiana al utilizarse en su concentración de 38% como evidenció Pérez y cols. en 2019 realizando ensayos de difusión con sensidiscos embebidos en distintas concentraciones de FDP obteniendo un promedio de 23 mm en la zona de inhibición. Este estudio también utilizó clorhexidina como control positivo obteniendo un promedio de 17 mm de zona de inhibición, muy cercano a los 21 mm promedio obtenidos en el presente trabajo.

En contraparte el agente que presentó una menor efectividad antimicrobiana fue FS con una discreta actividad inhibitoria, significativamente menor que el resto de los agentes estudiados.

La literatura respecto a la capacidad antimicrobiana de FS es contradictoria. Existe evidencia *in vivo* que respalda su capacidad antibacteriana como un agente superior a la clorhexidina frente a *Streptococcus mutans*, como reportan Narayan y cols. en 2017 al medir el recuento de *Streptococcus mutans* en una población infantil posterior a la aplicación de algunos agentes entre los que se incluye FS. Sus resultados indican que FS obtuvo la mayor disminución del recuento bacteriano en todos los periodos de tiempo medidos. Esto coincide con otro estudio *in vivo* realizado por Sharma y cols. en 2018 que demostró que FS obtuvo la acción antimicrobiana más efectiva al ser comparado con un enjuague de clorhexidina, un probiótico y el cepillado dental al medir el recuento de

Streptococcus mutans en saliva previo y posterior a la aplicación de los productos.

Respecto a los ensayos *in vitro* Pinar y cols. en 2012 reportan la efectividad de FS para mantener un efecto antimicrobiano continuo en biopelículas monoespecie de *Streptococcus mutans* y al compararlo con otros barnices de flúor sólo fue superado por una combinación entre Flúor silano y Cervitec (clorhexidina). Mosayebi y cols. en 2022 confirman este resultado en un estudio en que se aplicaron distintos agentes a discos de resina y luego se incubaron en una suspensión de *Streptococcus mutans*, dando como resultado que el disco donde se aplicó barniz de FS fue el que presentó el menor recuento bacteriano.

Sin embargo, también existen estudios *in vitro* como el de Munshi y cols. en 2001 que compara tres distintos barnices de flúor y su efecto antibacteriano para *Streptococcus mutans*, reportando que FS fue el de menor efecto. Por otra parte, Chau y cols. en 2014 evaluaron la adhesión y acidogenicidad de *Streptococcus mutans* luego de exponerlos a distintos barnices de flúor. Sus resultados demostraron que FS fue el barniz con menor efecto tanto en la adhesión como en el metabolismo acidogénico del microorganismo, con un recuento bacteriano que no posee diferencia significativa con el control de crecimiento.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos en esta investigación puesto que la zona de inhibición de FS fue la de menor magnitud y la más cercana a la inexistencia de la zona de inhibición del control negativo correspondiente a suero fisiológico (SF), sin diferencias estadísticamente significativas entre FS y SF.

El tercer agente, Blue Remin®, presentó una efectividad antimicrobiana intermedia respecto a los anteriormente mencionados, con un promedio de 22,8 mm. Demostró una diferencia significativamente menor respecto a FDP (promedio 41,3 mm), pero significativamente mayor a FS (promedio 2,6 mm). Al compararlo con el control positivo correspondiente a clorhexidina (promedio 21 mm), no presentó diferencias estadísticamente

significativas. Si bien BR es un nuevo agente remineralizante sus componentes principales correspondientes a cobre, óxido de grafeno (OG) y flúor, poseen gran cantidad de evidencia sobre su efecto antimicrobiano, como ha sido reportado por Ma y cols., en 2022 respecto a los mecanismos del cobre, Haiwei Ji y Jianliang en 2015 y Wenbing Hu y cols. y Zhu y cols. en 2010, en el caso del óxido de grafeno. Por último, las propiedades antimicrobianas del flúor han sido descritas por Gómez y Núñez y cols. en 2010 y posteriormente Ten Cate en 2013, entre muchos otros autores.

En 2022, Ashour y cols., realizaron un estudio que comparó los halos de inhibición de distintas combinaciones de cemento vidrio ionómero (CVI) con partículas metálicas. Se sintetizaron nanopartículas de cobre a partir del extracto de hoja de la planta *Thymus vulgaris* (TVE-CuNP) y se combinaron con metronidazol y con CVI juntos y por separado. En contraparte también se combinó CVI con nanopartículas de plata (AgNP) y con metronidazol juntos y por separado, obteniendo así 6 grupos de estudio: CVI sin modificar; CVI + metronidazol; CVI+ TVE-CuNP; CVI+ TVE-CuNP + metronidazol; CVI + AgNP; CVI +AgNP + metronidazol.

Los resultados revelaron que los grupos compuestos de CVI + las nanopartículas metálicas + metronidazol, obtuvo mayores zonas de inhibición que los grupos que no contenían metronidazol. Sin embargo, al comparar los resultados de los agentes que contenían cobre con los que tenían plata se evidenció una mayor zona de inhibición para estos últimos. Lo anterior también es corroborado en 2018 por Zia y cols., que al comparar la inhibición del crecimiento bacteriano concluyó que las nanopartículas de plata son más reactivas que las de cobre.

Estos resultados coinciden con los obtenidos en la presente investigación, puesto que FDP obtuvo zonas de inhibición significativamente mayores que el resto de los agentes estudiados y su promedio fue cercano al doble de lo obtenido por BR.

En el ensayo de dilución se comparó la CIM y CMB de los distintos agentes estudiados. En el caso de la CIM al comparar los resultados obtenidos se evidenció una efectividad evidentemente superior de FDP al evaluar visualmente la turbidez de sus pocillos en las distintas diluciones puesto que no se observó ningún cambio al compararlos con el control de translucidez. Estos resultados coinciden parcialmente con lo reportado por Takahashi y cols. en 2021 quienes realizaron un ensayo de dilución comparando la eficacia de FDP 38% con una dilución a su décima parte (3.8%) en *Streptococcus mutans* obteniendo como resultado que incluso el FDP 3.8% (equivalente a D2 en el presente estudio) logra inhibir el crecimiento bacteriano y afectar en gran medida la biopelícula. Lo anterior evidencia la gran capacidad bactericida que posee FDP a pesar de la disminución de su concentración, coincidiendo con los resultados obtenidos en este trabajo.

En contraparte FS evidenció un crecimiento bacteriano a partir de su concentración original de stock. Por lo que se podría inferir que su actividad antibacteriana es nula a discreta en ensayos de dilución *in vitro* frente a *Streptococcus mutans*, por tanto, no fue posible determinar CMB y CIM. Por otro lado, la volatilidad de FS puede ser una variable que considerar al realizar los ensayos debido a la reducción del volumen observado en todos los pocillos al retirar la placa de la estufa pudiendo este hecho disminuir la concentración efectiva del agente.

Blue Remin® y Clorhexidina obtuvieron resultados similares ya que a medida que aumenta el número de diluciones progresivamente aumenta el porcentaje de crecimiento bacteriano, con la diferencia de que CHx necesitó una dilución más que BR para iniciar su curva de crecimiento. Lo anterior nos permite inferir que Blue Remin presenta actividad antimicrobiana hasta alcanzar determinada concentración. Lo anterior se asemeja a lo reportado en 2017 por Amiri y cols., quienes estudiaron el efecto de las nanopartículas de cobre a distintas concentraciones frente a *Streptococcus mutans* en un ensayo de diluciones seriadas en placas

de cultivo celular de 96 pocillos. Los resultados obtenidos les permitieron concluir que los óxidos de cobre en bajas concentraciones tienen la capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano al disminuir en un 100% la densidad óptica en el medio TSB.

Por otro lado, el año 2021 Mao y cols., reportaron que nanopartículas compuestas de óxido de grafeno y cobre (GO-Cu) poseen un efecto bactericida o bacteriostático, dependiendo de su concentración frente a *Streptococcus mutans*. Además, comprobaron que parte del mecanismo de acción antibacteriano implica la inhibición de la producción de exopolisacáridos por parte de la bacteria, afectando su adhesión y capacidad para formar biopelículas. Este estudio permite suponer que al estar Blue Remin® conformado por elementos similares, pero no en forma de nanopartículas, su comportamiento podría ser semejante. Sin embargo, se requieren otros ensayos para determinar si el efecto de Blue Remin® es bactericida o bacteriostático y si este varía dependiendo de la concentración. Si bien existen métodos para estimar cuantitativamente el crecimiento bacteriano como por ejemplo la espectrofotometría, en este estudio debido a la coloración que generan los distintos agentes en la suspensión de trabajo una vez que son aplicados el uso de espectrofotómetro no es recomendable.

Además de determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) se determinó la concentración mínima bactericida (CMB), obteniendo como resultado que los agentes en los que se pudo determinar una CIM esta fue coincidente con su CMB. Al comparar la CMB de los agentes estudiados podemos ver nuevamente diferencias significativas entre los agentes ya que la CMB menor corresponde a FDP y la mayor a FS el que a partir de D0 presentó un 100% de crecimiento bacteriano. Esto sitúa a BR con capacidades antimicrobianas intermedias entre FDP y FS (ambos agentes remineralizantes con potencial antimicrobiano), sugiriendo que posiblemente su CMB se encuentra entre D3 y D4, correspondiendo esta última a la dilución en que se inicia la curva de crecimiento bacteriano.

Para el ensayo de supervivencia se evaluó de manera dicotómica la presencia o ausencia de crecimiento bacteriano en los distintos tiempos medidos. Al evaluar la supervivencia de *Streptococcus mutans* frente a FDP y CHx los resultados indican una ausencia de crecimiento en todos los tiempos ensayados sin diferencias significativas entre ellos.

En el caso de Blue Remin® su comportamiento tuvo una mayor variación puesto que en el tiempo 0 su probabilidad de supervivencia fue cercana al 90% pero presentó una disminución a medida que avanzó el tiempo de contacto entre BR y la suspensión bacteriana llegando a un 0% a los 1200 segundos. Estos resultados sugieren que BR podría requerir un mayor tiempo de contacto para lograr su efecto antimicrobiano al compararlo con FDP y CHx que poseen tiempos significativamente menores, posiblemente asociado al cobre y sus mecanismos de acción como publicaron Ma, y cols en su artículo de 2022.

Ahrari y cols. en el año 2015 realizaron un ensayo de supervivencia de metodología similar al desarrollado en este trabajo. Se hizo un recuento de UFC de *Streptococcus mutans* luego de 1 y 5 minutos de exposición a diferentes agentes entre los que se encontraban la clorhexidina 0.2%, enjuague bucal de fluoruro de sodio y soluciones coloidales de variadas nanopartículas metálicas, entre ellas nanopartículas de cobre y plata. Sus resultados evidenciaron una reducción significativa de UFC en el grupo tratado con la solución coloidal con nanopartículas de cobre, siendo incluso mayor que en el caso de la solución que contenía plata. En el caso del enjuague de fluoruro de sodio no se evidenció una reducción significativa de UFC, mientras que para clorhexidina 0.2% no se observaron colonias bacterianas en ninguno de los tiempos medidos.

De este estudio se infiere que el tiempo de contacto requerido para las nanopartículas de cobre es menor al de las de plata. Sin embargo, Sadeghi y cols. en el año 2010 reportaron que las nanopartículas de plata poseen efecto bactericida frente a *Streptococcus mutans* a partir de los 30 segundos, situación similar a lo ocurrido con clorhexidina. Lo anterior, se

condice con los hallazgos de este trabajo puesto que FDP y CHx por separado obtuvieron los menores tiempos de supervivencia, seguidos de BR y posteriormente FS. Esto podría explicarse comparando los mecanismos de acción del cobre y la plata en que la acción antibacteriana del cobre requiere un mayor tiempo de acción para provocar la muerte celular lo cual está avalado por Bondarenko y cols., quienes en 2013 evidenciaron que la citotoxicidad de la plata es superior a la del cobre.

Respecto de FS, su efecto antimicrobiano resultó ser lo opuesto a FDP y CHx al resultar muy similar al control de viabilidad (ST) ya que *Streptococcus mutans* logró sobrevivir en todos los tiempos medidos y esta característica fue significativamente mayor al comparar la sobrevivencia con los otros agentes estudiados. Sin embargo, la literatura disponible para este tipo de ensayo (ASTM E2315) es muy escasa cuando se trata de productos no clasificados como antimicrobianos, tales como los agentes remineralizantes estudiados en este trabajo. Esto es una dificultad al momento de comparar los resultados con otros autores que pudiesen concordar o diferir en el tiempo de sobrevivencia de *Streptococcus mutans* al contacto con FS.

Aun así, hay algunas posibles propuestas para lo observado en este trabajo como por ejemplo que FS requiera de un mayor tiempo de acción que los 1200 segundos medidos en este ensayo para lograr su efecto antibacteriano o que al evaluar el crecimiento pudo existir una disminución de la probabilidad de supervivencia entre un tiempo y otro que no fue detectada debido al carácter dicotómico de la lectura de resultados para este ensayo. Si bien lo descrito podría interpretarse como que FS no posee actividad antimicrobiana existe el antecedente del ensayo de difusión en el cual a pesar de que la zona de inhibición de FS fue menor en comparación al resto de los agentes, sí se formó un halo de inhibición indicativo de acción antimicrobiana. Por otro lado, existen estudios que han demostrado la propiedad antimicrobiana de FS como el de Deepti y cols., en 2008 y el de Pinar y cols., en 2012 que evalúan el crecimiento de *Streptococcus mutans*

en poblaciones de niños 6 meses posterior a la aplicación de FS como tratamiento cariostático con el resultado de una disminución de los niveles bacterianos. Como antecedente adicional en 2014 por Chau y cols., en su estudio sobre la adhesión de *Streptococcus mutans* en superficies de esmalte al ser tratadas con diferentes barnices de flúor evidenció que FS fue el barniz menos efectivo en cuanto a impedir la adhesión bacteriana a los discos de hidroxiapatita. Con estos antecedentes sería conveniente realizar ensayos que permitan definir y caracterizar con mayor profundidad el tipo de actividad antimicrobiana que posee FS y si esta tiene relación con su tiempo de contacto.

Si bien los resultados obtenidos para BR son prometedores, se requieren estudios y ensayos *in vitro* adicionales con múltiples especies bacterianas, ya que como se mencionó anteriormente la enfermedad de caries no se atribuye a una única especie, por lo que el modelo monoespecie utilizado en este estudio no logra replicar fielmente el microambiente de la cavidad oral. Varios estudios demuestran que el comportamiento bacteriano varía entre bacterias que componen una biopelícula y las que se encuentran en forma planctónica como mencionó Eick en 2021. Por lo que sería óptimo realizar ensayos antibacterianos *in vitro* en biopelículas orales con el objetivo de emular el ecosistema oral y de esta forma replicar las condiciones reales en las que son utilizados estos agentes para eventualmente estudiar la actividad de BR *in vivo*.

Por otro lado, existe el sesgo de la dicotomía de los ensayos de dilución y supervivencia ya que solo permitieron detectar la presencia o ausencia de crecimiento, pero no se realizó la cuantificación de bacterias sobrevivientes. Este dato es necesario para identificar si el agente antimicrobiano posee además de actividad bactericida, propiedades bacteriostáticas que impiden el crecimiento bacteriano sin necesariamente eliminar a gran parte de la población. Existen agentes que pueden poseer ambas propiedades dependiendo de su concentración, como es el caso de la clorhexidina mencionado previamente, que a partir de determinada concentración su

efecto bactericida se transforma en un efecto bacteriostático como reportan Thangavelu y cols. en 2020, siendo interesante estudiar también este comportamiento en los agentes experimentales de este trabajo.

Respecto a Blue Remin® como agente experimental, estudios previos realizados en FOUCH han demostrado su capacidad remineralizante en los tejidos duros dentales. Esto eventualmente podría posicionarlo como un sustituto que solucione los efectos adversos de FDP en cuanto a la tinción dentaria y toxicidad celular. Sin embargo, se debe considerar que FDP superó a BR en todos los ensayos antimicrobianos realizados en este estudio.

Los ensayos realizados presentan un antecedente sobre la existencia de actividad antibacteriana en BR y permiten su comparación con los agentes cariostáticos más utilizados actualmente en el país.

Finalmente, los resultados presentados apoyan la hipótesis de este trabajo que afirmó que **“el agente remineralizante Blue Remin ® presenta acción antibacteriana *in vitro* al igual que otros agentes remineralizantes como fluoruro diamino de plata y barniz de flúor silano”**, con diferencias en su efectividad en tres ensayos *in vitro* frente a la bacteria utilizada, *Streptococcus mutans*.

8 CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta los antecedentes presentados y los resultados de este trabajo de investigación las conclusiones son las siguientes:

1. Blue Remin® presenta acción antibacteriana *in vitro*
2. Al comparar la acción antibacteriana *in vitro* de Blue Remin® con Fluoruro diamino de plata podemos concluir que es significativamente menor.
3. Al comparar la acción antibacteriana *in vitro* de Blue Remin® con Flúor Silano podemos concluir que es significativamente superior.

9 BIBLIOGRAFÍA

1. Abranches J, Zeng L, Kajfasz JK, Palmer SR, Chakraborty B, Wen ZT, Richards VP, Brady LJ, Lemos JA (2018). Biology of Oral *Streptococci*. *Microbiol Spectr*. 2018 oct;6(5):10.
2. Ahrari, F., Eslami, N., Rajabi, O., Ghazvini, K., & Barati, S. (2015). The antimicrobial sensitivity of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis* to colloidal solutions of different nanoparticles applied as mouthwashes. *Dental research journal*, 12(1), 44–49.
3. Amiri, M., Etemadifar, Z., Daneshkazemi, A., & Nateghi, M. (2017). Antimicrobial Effect of Copper Oxide Nanoparticles on Some Oral Bacteria and *Candida* Species. *Journal of dental biomaterials*, 4(1), 347–352.
4. Arends, J., Ruben, J. L., Christoffersen, J., Jongebloed, W. L., & Zuidgeest, T. G. (1990). Remineralization of human dentine *in vitro*. *Caries research*, 24(6), 432–435.
5. Ashour, A. A., Felemban, M. F., Felemban, N. H., Enan, E. T., Basha, S., Hassan, M. M., & Gad El-Rab, S. M. F. (2022). Comparison and Advanced Antimicrobial Strategies of Silver and Copper Nanodrug-Loaded Glass Ionomer Cement against Dental Caries Microbes. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 11(6), 756.
6. Bagramian RA, Garcia-Godoy F, Volpe AR. (2009). The global increase in dental caries. A pending public health crisis. *Am J Dent*. 2009;22(1):3–8.
7. Balagopal S, Arjunker R. (2013). Chlorhexidine: the gold standard antiplaque agent. *J Pharm Sci Res* 2013;5(12):270–4.
8. Balda R., Solórzano A., González O. (1999). Tratamiento de la

enfermedad de caries dirigido al agente causal. Uso de los fluoruros. Acta. Odont. Venez.; 3: 284-287.

9. Banas JA, Drake DR. (2018). Are the *mutans streptococci* still considered relevant to understanding the microbial etiology of dental caries? BMC Oral Health, 18(129), 1-8.
10. Beltrán E., Goldstein J. (2000). Fluoride varnishes: A review of their clinical use, cariostatic mechanism, efficacy, and safety. Jada; 131: 23-35.
11. Ben Khadra, G. M., Arrag, E. A., Alammori, M., & AlKadi, M. F. (2019). The effect of chlorhexidine thymol and fluoride varnishes on the levels of *Streptococcus mutans* in saliva in children aged 6-8 years. Indian J Dent Res, 30(1), 67–72.
12. Bondarenko O, Juganson K, Ivask A, Kasemets K, Mortimer M, Kahru A. (2013) Toxicity of ag, cuo and zno nanoparticles to selected environmentally relevant test organisms and mammalian cells *in vitro*: a critical review. Arch Toxicol. 87(7):1181–200.
13. Brookes ZLS, Bescos R, Belfield LA, Ali K, Roberts A. (2020). Current uses of chlorhexidine for management of oral disease: a narrative review. J Dent 2020; 103:103497.
14. Busscher H, Van der Mei H. (1997). Physicochemical interactions in initial microbial adhesion and relevance for biofilm formation. Adv Dent Res 1997; 11:24-32.
15. Buzalaf M., Pessan J., Honório H., Ten Cate J. (2011). Mechanisms of action of fluoride for caries control. Monogr. Oral Sci; 22: 97-114.
16. Chatzigiannidou, I., Teughels, W., Van de Wiele, T., & Boon, N.

- (2020). Oral biofilms exposure to chlorhexidine results in altered microbial composition and metabolic profile. *NPJ biofilms and microbiomes*, 6(1), 13.
17. Chau, N. P., Pandit, S., Jung, J. E., & Jeon, J. G. (2014). Evaluation of *Streptococcus mutans* adhesion to fluoride varnishes and subsequent change in biofilm accumulation and acidogenicity. *Journal of dentistry*, 42(6), 726–734.
18. Chimenos-Küstner, E., Giovannoni, M. L., & Schemel-Suárez, M. (2017). Disbiosis como factor determinante de enfermedad oral y sistémica: importancia del microbioma. *Medicina clínica*, 149(7), 305–309.
19. Cochrane, N. J., Cai, F., Huq, N. L., Burrow, M. F., & Reynolds, E. C. (2010). New approaches to enhanced remineralization of tooth enamel. *J Dent Res*. 2010; 89(11), 1187–1197.
20. Contreras, V., Toro, M. J., Elías-Boneta, A. R., & Encarnación-Burgos, A. (2017). Effectiveness of silver diamine fluoride in caries prevention and arrest: a systematic literature review. *General Dentistry*, 65(3), 22–29.
21. Cury JA, Tenuta LMA (2009). Enamel remineralization: controlling the caries disease or treating early caries lesions? *Braz Oral Res* 23 (Spec Iss 1):23-30.
22. Davey M.E., O'toole G.A. (2000) Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*;64: 847–867.
23. Deepti A, Jeevarathan, J., Muthu, M., Prabhu V, R., & Chamundeswari (2008). Effect of Fluoride Varnish on *Streptococcus mutans* Count in Saliva of Caries Free Children Using Dentocult SM Strip Mutans Test: A Randomized Controlled Triple Blind Study. *International Journal of Clinical Pediatric*

Dentistry, 1(1), 1–9.

24. Devulapalle KS, Mooser G. (2001) Glucosyltransferase inactivation reduces dental caries. *J Dent Res.* 80(2):1505–6.
25. Dupont CL, Grass G, Rensing C. (2011) Copper toxicity and the origin of bacterial resistance—new insights and applications. *Metallomics.* 3(11):1109–18.
26. Eick S. (2021). Biofilms. *Monographs in oral science*, 29, 1–11.
27. Fakhruddin, K. S., Egusa, H., Ngo, H. C., Panduwawala, C., Pese, S., & Samaranayake, L. P. (2020). Clinical efficacy and the antimicrobial potential of silver formulations in arresting dental caries: a systematic review. *BMC oral health*, 20(1), 160.
28. FDI (Federacion Dental Internacional) - 2012. Minimal Intervention in the Management of Dental Caries 2002.
29. Fejerskov O (2004). Changing Paradigms in Concepts of Dental Caries: Consequences for Oral Health Care. *Caries Research* 38:182-191.
30. Fontana, M., Young, D. A., Wolff, M. S., Pitts, N. B., & Longbottom, C. (2010). Defining dental caries for 2010 and beyond. *Dental clinics of North America*, 54(3), 423–440.
31. Forssten S, Björklund M, Ouwehand A (2010). *Streptococcus mutans*, Caries and Simulation Models. *Nutrients*, 2(3); 290–298.
32. Fu Y, Chang F, Giedroc DP. (2014) Copper transport and trafficking at the host–bacterial pathogen interface. *Acc Chem Res.* 47(12):3605–13.
33. Garcia-Godoy F, Hics J (2008). Maintaining the integrity of the

enamel surface. The role of dental biofilm, saliva and preventive agents in enamel demineralization and remineralization. *JADA*, 139: 25S–34S.

34. Garcia R., Scougall J., Contreras R., Sakagami H., Baeza J., Flores R. y cols. (2013). Cytotoxic impact of silver and silver diamine fluoride in six oral cells culture. *Revista ADM*; 70(3): 134-139.
35. Garcia SS, Qin D, Hui W. (2016) *Streptococcus mutans* copper chaperone, copZ, is critical for biofilm formation and competitiveness. *Mol Oral Microbiol*. 31 (6):515–25.
36. Geim A., Novoselov K. (2007). The rise of graphene. *Nature Materials*; 6: 183- 191.
37. Gómez S (2001). Fluorterapia en Odontología. Para el niño y el adulto. Tercera Edición. Ed. Por. Grant. Educacional Colgate. Santiago.
38. Gómez S (2010). Fluorterapia en Odontología: Fundamentos y Aplicaciones Clínicas. 4ta ed. Santiago, Chile.
39. Gross, E. L., Beall, C. J., Kutsch, S. R., Firestone, N. D., Leys, E. J., & Griffen, A. L. (2012). Beyond *Streptococcus mutans*: dental caries onset linked to multiple species by 16S rRNA community analysis. *PloS one*, 7(10), e47722.
40. Gugnani N, Pandit I, Srivastava N, Gupta M, Sharma M (2011). International Caries Detection and Assessment System (ICDAS): A New Concept. *International Journal of Clinical Pediatric Dentistry*. 4(2): 93-100.
41. Haiwei Ji, Hanjun Sun, Xiaogang Qu (2015). Antibacterial applications of graphene-based nanomaterials: Recent 2 achievements and challenges. Elsevier, *Advanced Drug Delivery*

Reviews, 2015;100: 0-14.

42. Hanning M., Balz M. (2001). Protective properties of salivary pellicles from two different intraoral sites on enamel erosion. *Caries Research*; 35: 142-148.
43. Hics J, Garcia-Godoy, Flaitz C (2003). Biological factors in dental caries: role of saliva and dental plaque in a dynamic process of demineralization and remineralization. *J. Clin. Pediatr. Dent.* 28: 47–52.
44. Jafari, K., Hekmatfar, S., & Fereydunzadeh, M. (2018). In vitro Comparison of Antimicrobial Activity of Conventional Fluoride Varnishes Containing Xylitol and Casein Phosphopeptide-Amorphous Calcium Phosphate. *J Int Soc Prevent Communit Dent* 2018; 8(4), 309–313.
45. Jakubovics NS, Kolenbrander PE (2010). The Road to Ruin: the formation of disease-associated oral biofilms. *Oral Diseases* 16:729-739.
46. Jianliang H., Xiaodan Z. (2015). Killing Dental Pathogens Using Antibacterial Graphene Oxide, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2015;7: 5605–5611.
47. JP Randall, WK Seow, LJ Walsh. (2015). Antibacterial activity of fluoride compounds and herbal toothpastes on *Streptococcus mutans*: an in vitro study. *Australian Dental Journal* 2015; 60: 368–374
48. Kazeminia, M., Abdi, A., Shohaimi, S., Jalali, R., Vaisi-Raygani, A., Salari, N., & Mohammadi, M. (2020). Dental caries in primary and permanent teeth in children's worldwide, 1995 to 2019: a systematic review and meta-analysis. *Head Face Med*, 16(1), 22.

49. Kazimierczak, P., Golus, J., Kolmas, J., Wojcik, M., Kolodynska, D., & Przekora, A. (2022). Noncytotoxic zinc-doped nanohydroxyapatite-based bone scaffolds with strong bactericidal, bacteriostatic, and antibiofilm activity. *Biomaterials advances*, 139, 213011.
50. Krzysciak W., Jurczak A., Koscielniak D., Bystrowska B., Skalniak A. (2014). The virulence of *Streptococcus mutans* and the ability to form biofilms. *J. clin. microbiol infect dis.*; 33: 499-515
51. Lamont, R. J., Koo, H., & Hajishengallis, G. (2018). The oral microbiota: dynamic communities and host interactions. *Nature reviews. Microbiology*, 16(12), 745–759.
52. Lemos J, Quivey R, Koo H, Abranches J (2013). *Streptococcus mutans*: a new Gram-positive paradigm? *Microbiology*, 159(3), 436–445
53. Lynch R., Smith S. (2012). Remineralization Agents: New and Effective or Just Marketing Hype? *Adv Dent Res*; 24(2): 63-7
54. Ma, X., Zhou, S., Xu, X., & Du, Q. (2022). Copper-containing nanoparticles: Mechanism of antimicrobial effect and application in dentistry-a narrative review. *Frontiers in surgery*, 9, 905892.
55. Mamani Quisbert, Cinthia y Zeballos Lopez, Lourdes (2012). Cariostáticos. *Rev. Act. Clin. Med* 2012;23: 1103-1109.
56. Mao, M., Zhang, W., Huang, Z., Huang, J., Wang, J., Li, W., & Gu, S. (2021). Graphene Oxide-Copper Nanocomposites Suppress Cariogenic *Streptococcus mutans* Biofilm Formation. *International journal of nanomedicine*, 16, 7727–7739.

57. Marinho V., Higgins J., Logan S., Sheiham A. (2003). Fluoride varnishes for preventing dental caries in children and adolescents. *Cochrane database syst. Rev.*; 3: 14-279.
58. Marsh P.D. (2005). Dental plaque biological significance of a biofilm and community lifestyle. *J. Clin. Periodontol.* 32: 7–15.
59. Maung MT, Carlson A, Olea-Flores M, Elkhadragy L, Schachtschneider KM, Navarro-Tito N, et al. (2021) The molecular and cellular basis of copper dysregulation and its relationship with human pathologies. *FASEB J.* 35(9):21810–60.
60. Melchorra F., Guadalupe L., Battellino J. (2007). Película adquirida salival: Revisión de la literatura. *Acta odontológica venezolana*; 45(3): 479-486.
61. MINSAL (2017). “PLAN NACIONAL DE SALUD BUCAL 2018 – 2030”
62. Mishra S. (2014). Comparative Evaluation of Shear Bond Strength of Orthodontic Brackets on Pretreatment with CPPACP, Fluor Protector and Phosflur: An *In-vitro* Study. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*, 8(5), ZC01–ZC5.
63. Mitra D, Kang E-T, Neoh KG. (2019) Antimicrobial copper-based materials and coatings: potential multifaceted biomedical applications. *ACS Appl Mater Interfaces.* 12(19):21159–82.
64. Mosayebi, N., Toodehzaeim, M. H., Zandi, H., Joshan, N., & Haerian, A. (2022). Evaluation of the effects of fluoride mouth rinse and varnish on the early biofilm formation of *Streptococcus mutans* in two types of orthodontic adhesive resins: An *in vitro* study. *Dental research journal*, 19, 54.

65. Munshi AK, Reddy NN, Shetty V. (2001) A comparative evaluation of three fluoride varnishes: an *in-vitro* study. J Indian Soc Pedod Prev Dent Sep;19(3):92-102.
66. Narayan, A., Satyaprasad, S., Anandraj, S., Ananda, S. R., Kamath, P. A., & Nandan, S. (2017). Comparison of efficacy of three chemotherapeutic agents on *Streptococcus mutans* count in plaque and saliva: A randomized controlled triple blind study. Journal of the Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry, 35(2), 174–180.
67. Nizami, M. Z. I., Nishina, Y., Yamamoto, T., Shinoda-Ito, Y., & Takashiba, S. (2020). Functionalized Graphene Oxide Shields Tooth Dentin from Decalcification. Journal of dental research, 99(2), 182–188.
68. Núñez D, García L (2010). Bioquímica de la caries dental. Revista Habanera de Ciencias Médicas, 9(2):156-166.
69. Paes Leme AF, Koo H, Bellato CM, Bedy G, Cury JA (2006). The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation – new insight. J Dent Res 85(10):878-887.
70. Pérez MMT, Retana UR, González MJÓ (2019). Efectividad bactericida del diamino fluoruro de plata a diferente concentración sobre estreptococos cariogénicos en muestras de saliva y dentina de escolares. Un estudio *in vitro*. Rev ADM, 76(2):77-80.
71. Peterson LR, Shanholtzer CJ (1992). Tests for bactericidal effects of antimicrobial agents: technical performance and clinical relevance. Clin Microbiol Rev 5: 420-432
72. Pinar Erdem, A., Sepet, E., Kulekci, G., Trosola, S. C., & Guven, Y. (2012). Effects of two fluoride varnishes and one fluoride/chlorhexidine varnish on *Streptococcus mutans* and

Streptococcus sobrinus biofilm formation *in vitro*. International journal of medical sciences, 9(2), 129–136

73. Pitts, N. B., Zero, D. T., Marsh, P. D., Ekstrand, K., Weintraub, J. A., Ramos-Gomez, F., Tagami, J., Twetman, S., Tsakos, G., & Ismail, A. (2017). Dental caries. Nature reviews. Disease primers, 3, 17030.
74. Poppolo Deus, F., & Ouanounou, A. (2022). Chlorhexidine in Dentistry: Pharmacology, Uses, and Adverse Effects. International dental journal, 72(3), 269–277.
75. Rajendra A, Veitz-Keenan A, Oliveira BH, Ruff RR, Wong MCM, Innes NPT, Radford J, Seifo N, Niederman R (2017). Topical silver diamine fluoride for managing dental caries in children and adults (Protocol). Cochrane Database of Systematic Reviews, 7. Art. No.: CD012718
76. Raszewski Z, Nowakowska-Toporowska A, Wezgowiec J, Nowakowska D. (2019). Design and characteristics of new experimental chlorhexidine dental gels with anti-staining properties. Adv Clin Exp Med; 28(7):885–90.
77. Rathee, M., & Sapra, A. (2023). Dental Caries. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
78. Richards VP, Alvarez AJ, Luce AR, Bedenbaugh M, Mitchell ML, Burne RA, Nascimento MM. (2017) Microbiomes of Site-Specific Dental Plaques from Children with Different Caries Status. Infect Immun 85(8), e00106-17.
79. Roberson Roberson, Theodore M (2006). Sturdevant's Art and Science of Operative Dentistry, 5th ed. St Louis: Mosby; 2006;5: 112.

80. Rosenblatt A, Stamford T, Niederman R. (2009). Silver Diamine Fluoride: A Caries “Silver-Fluoride Bullet”. *J Dent Res*, 88 (2): 116 – 25.
81. Sadeghi R, Olia P, Rezvani MB, Taleghani F, Sharif F. (2010) Comparison of the nanosilver and chlorhexidin antimicrobial effect on *Streptococcus sanguis* and *actinomicosis viscosus*. *J Islamic Dent Assoc*; 23:225-31.
82. Salazar P, Diego, & Nakouzi M, Jorge. (2017). Evaluación Clínica de Barniz de Flúor en el Manejo de la Hipersensibilidad Dentinaria. *International journal of odontostomatology*, 11(1), 41-46.
83. Saravia ME, Nelson-Filho P, Yoko Ito I, Assed Bezerra da Silva L, Assed Bezerra da Silva R, Claes-Göran E (2011). *Microbiological Research* 166:63-67.
84. Seppä L. (2004). Fluoride varnishes in caries prevention. *Medical principles and practice: international journal of the Kuwait University, Health Science Centre*, 13(6), 307–311.
85. Seow WK. (2018). Early Childhood Caries. *Pediatr Clin North Am*, 65(5), 941- 954.
86. Sharan R, Chhibber S, Attri S, Reed RH. (2010) Inactivation and injury of *Escherichia coli* in a copper water storage vessel: effects of temperature and ph. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 97(1):91–7
87. Sharma M, Pandit IK, Srivastava N, Gugnani N, Gupta M. (2018). A Comparative Evaluation of Efficacy of *Streptococcus mutans* Counts in Saliva: An *in vivo* Study. *Int J Clin Pediatr Dent* 2018;11(2):94-99.
88. Singh K, Senadheera DB, Lévesque CM, Cvitkovitch DG. (2015) The copYAZ operon functions in copper efflux, biofilm formation,

genetic transformation, and stress tolerance in *streptococcus mutans*. J Bacteriol. 197(15): 2545–57.

89. Standard Guide for Assessment of Antimicrobial Activity Using a Time-Kill Procedure (ASTM E2315-23). Actualized in May 2023.
90. Takahashi, M., Matin, K., Matsui, N., Shimizu, M., Tsuda, Y., Uchinuma, S., Hiraishi, N., Nikaido, T., & Tagami, J. (2021). Effects of silver diamine fluoride preparations on biofilm formation of *Streptococcus mutans*. Dental materials journal, 40(4), 911–917.
91. Tanner A, Kressirer C, Faller L (2016). Understanding Caries from the Oral Microbiome Perspective. J Calif Dent Assoc. 44(7): 437-46.
92. Tao B, Lin C, Deng Y, Yuan Z, Shen X, Chen M, et al. (2019) Copper-nanoparticle embedded hydrogel for killing bacteria and promoting wound healing with photothermal therapy. J Mater Chem B. 7(15):2534-48.
93. Ten Cate JM (2012). Novel Anticaries and Remineralizing Agents: Prospects for the Future. Journal of Dental Research 91:813-815.
94. Ten Cate JM (2013). Contemporary perspective on the use of fluoride products in caries prevention. Br Dent J 214:161-167.
95. Tenuta LM, Cerezetti RV, Del Bel Cury AA, Tabchoury CP, Cury JA. (2008). Fluoride release from CaF₂ and enamel demineralization. J Dent Res 2008; 87:1032-1036.
96. Thangavelu A, Kaspar S, Kathirvelu R, Srinivasan B, Srinivasan S, Sundram R. Chlorhexidine: an elixir for periodontics. J Pharm Bioallied Sci 2020;12(5):57.

97. Tyas M, Anusavice K, Frencken J, Mount G (2000). Minimal Intervention Dentistry - A Review. Proyecto de la Comisión de la FDI 1-97. Int Dent J: 50: 1- 12.
98. Urzua I., Moncada G. (2008). Cariología clínica. Bases preventivas y restauradoras. ISBN.; 1: 125-139.
99. Vats N, Song FL. (2001) Characterization of a copper-transport operon, copyaz, from streptococcus mutans. Microbiology. 147(Pt 3):653–62.
100. Walsh T, Worthington HV, Glenny AM, Appelbe P, Marinho VC, Shi X (2010). Fluoride toothpastes of different concentrations for preventing dental caries in children and adolescents. Cochrane Database Syst Rev (1):CD007868.
101. Wan, A. K. L., Seow, W. K., Walsh, L. J., & Bird, P. S. (2002). Comparison of five selective media for the growth and enumeration of *Streptococcus mutans*. Australian dental journal, 47(1), 21-26.
102. Wang L, Hu C, Shao L. (2017) The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future. Int J Nanomed. 12:1227–49.
103. Whelton H, Ketley C, McSweeney F, O'Mullane D (2004), A review of fluorosis in the European Union: prevalence, risk factors and aesthetic issues. Community Dentistry and Oral Epidemiology, 32: 9–18.
104. Wenbing Hu, Cheng Peng, Weijie Luo, Min Lv, Xiaoming Li, Di Li, Qing Huang, and Chunhai Fan (2010). Graphene-Based Antibacterial Paper. ACS Nano, 4(7): 4317-4323.

105. Wright CJ, Burns LH, Jack AA, Back CR, Dutton LC, Nobbs AH et al. (2013). Microbial interactions in building of communities. *Molecular Oral Microbiology* 28:83-101.
106. Yamamoto A., Honma R., Sumita M. (1998). Cytotoxicity evaluation of 43 metal salt using murine fibroblast and osteoblastic cells. *J. Biomed. Mater Res.*; 391: 331-340.
107. Zamora S., Borda C., De la Cruz R., Menacho S., Ramos G. y cols. (2006). The fluoride in the prevention of decay in the temporary teething. *Fluorated varnishes. Odontol. Sanmarquina*; 9(1): 31-35.
108. Zia, R.; Riaz, M.; Farooq, N.; Qamar, A.; Anjum, S. (2018) Antibacterial activity of Ag and Cu nanoparticles synthesized by chemical reduction method: A comparative analysis. *MRE*, 5, 075012.
109. Zhu Y., Murali S., Cai W., Li X., Won Suk J., Potts J. y cols. (2010) Graphene and Graphene Oxide: Synthesis, Properties, and Applications. *Advanced Materials*; 22: 3906-3924.