



UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE CUENCA

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA

Comunidad Educativa al Servicio del Pueblo

UNIDAD ACADÉMICA DE SALUD Y BIENESTAR

CARRERA DE ODONTOLOGÍA

CUANTIFICACIÓN DE LACTOBACILLUS

ESTIMULADA EN SALIVA DE UNIVERSITARIOS

CUENCA – ECUADOR

**PROYECTO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE ODONTÓLOGO**

AUTOR: BAGNER ALEXANDER ROMERO MOGROVEJO

DIRECTOR: OD. ESP. MAGALY NOEMI JIMENEZ ROMERO

CUENCA - ECUADOR

2024

DIOS, PATRIA, CULTURA Y DESARROLLO



UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA

Comunidad Educativa al Servicio del Pueblo

UNIDAD ACADÉMICA DE SALUD Y BIENESTAR

CARRERA DE ODONTOLOGÍA

**CUANTIFICACIÓN DE LACTOBACILLUS ESTIMULADA EN
SALIVA DE UNIVERSITARIOS CUENCA - ECUADOR**

**PROYECTO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE ODONTÓLOGO**

AUTOR: BAGNER ALEXANDER ROMERO MOGROVEJO

DIRECTOR: OD. ESP. MAGALY NOEMI JIMENEZ ROMERO

CUENCA - ECUADOR

2024

DIOS, PATRIA, CULTURA Y DESARROLLO

Cuantificación de *Lactobacillus* estimulada en saliva de universitarios Cuenca - Ecuador

Quantification of *Lactobacillus* Stimulated in Saliva of University Students in Cuenca - Ecuador

Romero Mogrovejo Bagner¹, Jiménez Romero Magaly²

¹Estudiante, Carrera de Odontología de la Universidad Católica de Cuenca. Cuenca (Ecuador).

bagner.romero@est.ucacue.edu.ec

²Docente de la carrera de Odontología de la Universidad Católica de Cuenca. Cuenca (Ecuador)

mjimenezr@ucacue.edu.ec

RESUMEN

Introducción: La salud bucal y la reducción de la carga bacteriana en la cavidad oral es importante tener en cuenta y crucial para la prevención de enfermedades dentales. *Lactobacillus* es una bacteria común en la saliva que puede estar relacionada con problemas dentales. **Objetivo:** Este estudio tiene como objetivo comparar el número de microorganismos existentes en distintas soluciones, en dos periodos de tiempo, y analizar el recuento de microorganismos de acuerdo al sexo, en Universitarios Cuenca, Ecuador. Y evaluar si existen o no diferencias significativas al momento de verificar los resultados. **Metodología:** se realizó un estudio experimental con la recolección de saliva en dos periodos de tiempo. La concentración de *Lactobacillus* en la saliva se midió mediante análisis de laboratorio. La muestra se dividió entre grupos de hombres y mujeres para analizar las diferencias en la carga bacteriana. Se verificó la normalidad de datos a través de la prueba Kolmogorov Smirnov. Se usó la prueba Rangos de Wilcoxon para muestras relacionadas del recuento de microorganismos en diferentes soluciones, en los dos periodos de tiempo y la prueba U de Mann-Whitney para determinar la relación de las soluciones en los dos periodos de tiempo de acuerdo al sexo. **Resultados:** La Comparación del número de microorganismos existentes en las distintas soluciones, en los dos periodos de tiempo, basal y final tuvieron una diferencia significativa.

Palabras Clave: Saliva, Microorganismos, *Lactobacillus*, sexo.

ABSTRACT

Introduction: Oral health and reducing bacterial load in the oral cavity are important to consider and crucial for preventing dental diseases. *Lactobacillus* is a common bacterium in saliva that may be related to dental problems. **Objective:** This study aims to compare the number of microorganisms present in different solutions over two periods and analyze the microorganism count according to sex among university students in Cuenca, Ecuador. It also evaluates whether there are significant differences when verifying the results. **Methodology:** An experimental study was conducted with saliva collection at two-time points. The

concentration of *Lactobacillus* in saliva was measured through laboratory analysis. The sample was divided into groups of men and women to analyze differences in bacterial load. The normality of the data was verified using the Kolmogorov-Smirnov test. The Wilcoxon rank-sum test was used for related samples of microorganism counts in different solutions across the two time periods, and the Mann-Whitney U test was employed to determine the relationship of the solutions in the two time periods according to sex. **Results:** The comparison of the number of microorganisms present in the different solutions at the two-time points, baseline and final, showed a significant difference.

Keywords: Saliva, Microorganisms, *Lactobacillus*, sex.

INTRODUCCIÓN

La saliva es un fluido biológico esencial que desempeña un papel vital en la homeostasis oral, la protección de los tejidos blandos y duros de la cavidad bucal, y en procesos digestivos tempranos. Compuesta por agua en un 99%, así como electrolitos, proteínas, enzimas y compuestos antimicrobianos, la saliva actúa como una primera línea de defensa contra microorganismos patógenos, contribuyendo a la remineralización del esmalte dental. Además, su flujo es estimulado mecánicamente por la masticación o químicamente por el sabor, lo que aumenta significativamente su volumen y capacidad para limpiar la cavidad oral. (1,2) El flujo salival basal oscila entre 0.3 a 0.5 ml por minuto, mientras que bajo estimulación puede aumentar hasta 5 ml por minuto. Este incremento contribuye no solo a la protección de los dientes contra caries, sino también a la neutralización de ácidos y la lubricación de la mucosa oral, facilitando procesos como el habla y la deglución. (3,4)

La microbiota oral es una de las comunidades microbianas más complejas y dinámicas del cuerpo humano, con más de 700 especies bacterianas identificadas hasta la fecha. Estas bacterias residen en diferentes superficies de la cavidad oral, incluyendo dientes, encías, lengua y mucosas, formando comunidades estructuradas que interactúan tanto entre sí como con el huésped. Un equilibrio adecuado de estas bacterias es esencial para mantener la salud oral, pero cualquier alteración en este balance puede dar lugar a infecciones como caries, gingivitis o periodontitis. (5,6) La formación de biofilm en la superficie dental es un proceso crítico en la patogénesis de estas enfermedades, ya que facilita la colonización y resistencia de las bacterias a los mecanismos de defensa del huésped y a los tratamientos antimicrobianos. (7,8)

Lactobacillus es un grupo bacteriano de gran interés en odontología debido a su relación directa con el desarrollo de caries dental. Esta bacteria acidogénica y acidúrica es capaz de sobrevivir y multiplicarse, lo que le confiere una ventaja sobre otros microorganismos en la cavidad bucal cuando las condiciones son favorables para la formación de caries. *Lactobacillus* es más abundante en las lesiones cariosas avanzadas, y su capacidad para producir ácido láctico como producto final de la fermentación de carbohidratos contribuye directamente a la desmineralización del esmalte dental. (9,10) Diversos estudios han demostrado que una elevada presencia de *Lactobacillus* en la saliva o en la placa dental se asocia con un mayor riesgo de caries, especialmente en individuos con una ingesta elevada de azúcares refinados. Este microorganismo no es una causa primaria de la caries, pero su proliferación puede acelerar el proceso carioso una vez que se ha iniciado. Además, juega un papel en la formación de biofilm dental que puede ser complejo, los cuales pueden dificultar el acceso de los agentes antimicrobianos y la limpieza mecánica, favoreciendo la persistencia de la enfermedad dental. Su resistencia a condiciones ácidas y su habilidad para adherirse a superficies dentales lo convierten en un componente crítico en el manejo y prevención de

caries, y destacan la necesidad de estrategias de control más efectivas en la práctica clínica odontológica.(11,12)

En relación del chicle sin azúcar, especialmente el que contiene xilitol, tiene un impacto significativo en la salud oral al promover un aumento en la producción de saliva, lo que contribuye a la prevención de caries y otras patologías bucales. Durante la masticación, las glándulas salivales se activan, elevando el flujo salival hasta diez veces más que en reposo. Este incremento ayuda a la neutralización de ácidos producidos por bacterias cariogénicas como *Lactobacillus* y facilita la limpieza mecánica de los dientes al eliminar partículas de alimentos y residuos bacterianos. (13,14) El xilitol, a diferencia del azúcar, no es metabolizado por estas bacterias, lo que reduce la producción de ácidos y favorece la remineralización dental. En conjunto, el uso regular de chicle sin azúcar, combinado con una adecuada higiene bucal, representa una estrategia efectiva para mantener un equilibrio microbiano saludable y prevenir la desmineralización del esmalte dental.(15,16)

El objetivo principal de este estudio fue comparar la cantidad de *Lactobacillus* presente en la saliva de estudiantes universitarios de Cuenca, Ecuador, antes y después de masticar chicles con varios componentes activos; así como, establecer posibles diferencias entre hombres y mujeres. (17-20)

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio experimental y de corte longitudinal de participantes entre 18 a 25 años de edad para cuantificar la presencia de bacterias, principalmente *Lactobacillus*, en saliva de estudiantes universitarios antes y después de masticar distintos tipos de chicles: con azúcar, sin azúcar, xilitol y placebo (parafina). El análisis también se enfocó en las diferencias de la carga bacteriana según el sexo de los participantes, en edades que varían desde los 18 a los 25 años, dentro de los criterios de inclusión, como poseer al menos 20 dientes y de los criterios de exclusión como padecer actualmente de enfermedades sistémicas, infecciosas o inflamatorias o que se encuentren tomando medicamentos, antibióticos o flúor en el último mes, consumidores habituales de productos y enjuagues que contengan xilitol o sorbitol, con flujo salival anormal (<1ml/min), embarazadas o con tratamiento de píldoras anticonceptivas o con hábitos dietéticos anormales, sujetos con enfermedad periodontal o presencia de caries dental. (21,22)

La variable dependiente fue la cantidad de *Lactobacillus* presentes en Agar Cerebro-Corazón (**BHI**).

1.1.1 Las variables independientes fueron: sexo (hombres, mujeres), tipo de chicle (Xilitol, Azucarado, Sin Azúcar, y Placebo).

Para la toma de la muestra se solicitó a los participantes acudir al laboratorio entre 8 a 10 am, teniendo en cuenta, que los participantes no debían haber ingerido alimentos, fumado o haberse cepillado los dientes al menos 1 hora previa a la toma de muestra, al momento de empezar se les colocó gorro y se les entregó un embudo estéril y un tubo falcon de 40 ml para la recolección de saliva, seguido de un enjuague de la boca con agua pura, con la finalidad de eliminar cualquier resto de alimento, posteriormente se les colocó en una silla en una posición vertical con la cabeza inclinada ligeramente hacia adelante y se les tomó la muestra de saliva basal a través del método de drenaje, luego de haber salivado en el tubo durante 5 min, se les hizo escoger entre cuatro gomas de mascar al azar (Con Azúcar, Sin Azúcar, con Xilitol y Placebo), para que luego procedan a masticar durante otros 5 min, repitiendo este proceso hasta llegar al min 30 donde se le pidió al participante botar el chicle en el embudo y así obtener la muestra de saliva final. Posterior se almacenó en gradillas para tubos cónicos y se transportó al laboratorio.(23,24)

De las 44 muestras de saliva que se receptaron para el estudio. Primero se procedió a centrifugar las muestras en el vortex (Labnet) para mezclar la saliva, posterior se diluyó la muestra en solución tamponada, en la cual se tomó 450 uL de solución para los tres tubos eppendorf, diluyendo 1:10, 1:100 y 1:1000. Posteriormente se tomó 50 ml y se sembró en el Agar **BHI (Brain Heart Infusion)**, para obtener el crecimiento específicamente de *Lactobacillus*, posterior se llevó las muestras a una estufa (Memmert) a una temperatura de **35°C durante 48 horas**, para luego visualizar el crecimiento bacteriano y cuantificar mediante un contador de colonias (Isolab) el número de *Lactobacillus* que se obtuvieron en la muestra basal y en la muestra final. (25,26)

Se utilizó el software **SPSS versión 25.0** para el análisis de datos. Los resultados fueron presentados mediante: **media y desviación estándar** para las cargas bacterianas, **prueba t de student para muestras pareadas** para la comparación de las cargas bacterianas antes y después de la masticación y la **prueba t independiente para la comparación** entre hombres y mujeres. Se consideraron significativos los resultados con **p < 0.05**. Se verificó la normalidad de datos a través de la prueba Kolmogorov Smirnov y se usó la prueba ANOVA para verificar las condiciones de similitud (recuento de SM) de los participantes en la muestra basal. La prueba Kruskal-Wallis se utilizó para verificar diferencias dentro del grupo de las gomas de mascar en el intervalo de 30 min. y se usó la prueba de Rangos de Wilcoxon para muestras relacionadas en la diferencia entre los intervalos de tiempo. El nivel de significancia fue $p < 0,05$.

1.1.2 RESULTADOS

El estudio contó con 44 muestras de saliva de participantes que oscilan entre de 18 a 25 años de edad, luego de la siembra y conteo de las bacterias, se pudo visualizar mediante un microscopio (Leika) que no existía *Lactobacillus* en el Agar **BHI (Brain Heart Infusion)** en ninguna de las muestras. **Se puede decir que se debe a la condición saludable de los pacientes, al ser jóvenes y sanos, presentan una flora bacteriana bucal equilibrada y sin presencia de bacterias acidófilas como *Lactobacillus*.**

En la **tabla 1**. Se puede observar mediante la prueba de Wilcoxon que existe una diferencia significativa en la cantidad de microorganismos, pasados los 30 min de masticar cualquier tipo de goma de mascar.

Tabla 1. Comparación del número de microorganismos en distintas soluciones en dos periodos de tiempo.

95% IC para media						
Tiempo		Media	±DE	Mediana	Límite inferior	Límite superior
Basal	BHI 10	3762.50	3434.18	2840.00	2600.54	4924.46
	BHI 100	22005.56	19875.037	18850.00	15280.81	28730.30
	BHI 1000	157093.33	182783.330	61500.00	95248.35	218938.31
Después 30 min	BHI 10	2153.83	2722.485	1595.00	1232.68	3074.99
	BHI 100	11633.89	10850.842	9300.00	7962.49	15305.29
	BHI 1000	72708.61	115803.429	15450.00	33526.37	111890.85
Comparación entre los periodos de los dos tiempos						
		BHI 10		BHI 100		BHI 1000
Basal - 30min		0,001*		0.001*		0.001*

Prueba de rangos de Wilcoxon para muestras relacionadas, *p<0,05

En la **tabla 2**, se verificó la normalidad de datos a través de la prueba Kolmogorov Smirnov. Se usó la prueba Rangos de Wilcoxon para muestras relacionadas del recuento de microorganismos en diferentes disoluciones en dos tiempos y la prueba U de Mann-Whitney para determinar la relación de las disoluciones, los intervalos de tiempo de acuerdo al sexo. El nivel de significancia fue p<0,05.

Tabla 2. Análisis comparativo del número de microorganismos en soluciones en dos periodos de tiempo de acuerdo al sexo.

Sexo		Mujeres (n=17)			Hombres (n=19)			P
		Media	±DE	Mediana	Media	±DE	Mediana	
Basal	BHI 10	3650.000	4215.050	2140.00	3863.16	2667.719	3500.00	0.379
	BHI 100	20682.35	24629.942	7800.00	23189.47	15024.162	22000.00	0.219
	BHI 1000	116947.06	194962.009	34000.00	193013.68	168203.528	160000.00	0.081
Después 30 min	BHI 10	2508.71	3774.748	1500.00	11384.21	1233.366	2000.00	0.471
	BHI 100	11912.94	11862.002	8000.00	11384.21	10184.698	10000.00	0.975
	BHI 1000	52447.65	104450.005	13000.00	90836.84	125074.579	28000.00	0.531
Prueba U de Mann-Whitney, *p<0,05								

En la **Figura 1**, se detallada mediante un gráfico la comparación entre mujeres y hombres en términos del número de microorganismos presentes en diferentes soluciones (BHI 10, BHI 100, y BHI 1000) en dos momentos: **antes** de masticar chicle (basal) y **30 minutos después**. Donde el número de microorganismos se encuentran con más presencia en el sexo masculino en comparación al femenino.

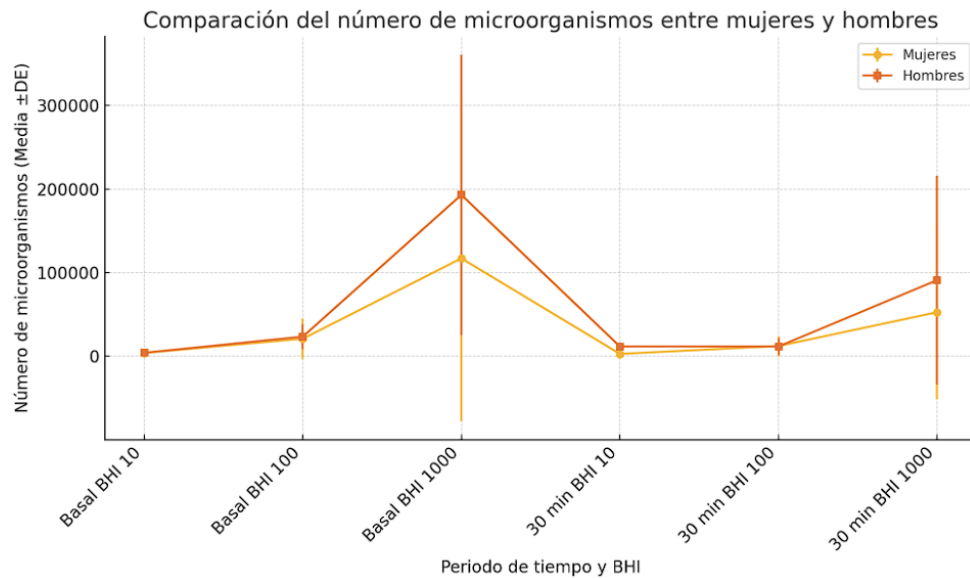


Figura 1. Gráfico de líneas (line chart), comparativa del número de microorganismos presentes en hombres y mujeres en un intervalo de 30 min.

Las líneas representan las medias (valores promedio) del número de microorganismos para cada sexo, y las barras verticales (\pm DE) muestran la variación de los datos (desviación estándar) para indicar qué tan dispersos están esos valores. Los puntos azules representan a las mujeres, y los naranjas a los hombres.

Para el sexo, los valores de los microorganismos tienden a ser mayores en la solución de BHI 1000 que en BHI 10 o BHI 100. El sexo femenino muestra, en general, valores menores que los hombres en la mayoría de los casos, aunque las diferencias no son muy grandes en algunos puntos. Después de 30 minutos, los valores tienden a disminuir, aunque siguen mostrando variabilidad.

DISCUSIÓN

La cuantificación de *Lactobacillus* en saliva es crucial para entender su rol en la salud bucal y en la prevención de caries dentales. Varios estudios han abordado la metodología para evaluar la presencia y cantidad de *Lactobacillus* en la saliva, así como el impacto de diferentes intervenciones sobre su concentración.

En un estudio por Gao (27), se observó que el uso de chicles sin azúcar, especialmente los que contienen xilitol, puede reducir significativamente la carga bacteriana en la saliva. Los autores destacaron que el xilitol no es metabolizado por *Lactobacillus*, lo que ayuda a disminuir la producción de ácido y, por ende, reduce la prevalencia de caries. Esta investigación respalda la idea de que el xilitol tiene un efecto positivo sobre la reducción de *Lactobacillus*, similar a los resultados encontrados en este estudio, donde se observó una disminución significativa en la cantidad de microorganismos después de masticar chicles con xilitol.

Smith (28), también evaluaron distintos métodos de recolección y cuantificación de bacterias en saliva, comparando técnicas como la siembra en medios selectivos y técnicas moleculares. Encontraron que el uso de medios específicos, como el Agar BHI, es efectivo para cultivar *Lactobacillus* y cuantificar su presencia. Este hallazgo es consistente con la metodología empleada en nuestra investigación, que utilizó

Agar BHI para la cuantificación de *Lactobacillus* en saliva, lo que permitió obtener resultados precisos sobre la concentración de esta bacteria en diferentes condiciones.

Sin embargo, los resultados obtenidos en nuestro estudio mostraron una ausencia general de *Lactobacillus* en las muestras analizadas, lo que podría estar relacionado con el estado de salud bucal de los participantes, que eran jóvenes y sanos. Esto coincide con lo señalado por Sato (29), quienes reportaron que una flora bucal equilibrada y una buena salud oral pueden resultar en una baja presencia de *Lactobacillus*. La ausencia de *Lactobacillus* podría indicar que los participantes no presentan condiciones favorables para la proliferación de esta bacteria, como ocurre en personas con una buena higiene bucal y una dieta baja en azúcares refinados.

La comparación entre hombres y mujeres en nuestra muestra reveló que, aunque hubo una mayor concentración de microorganismos en los hombres, las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Miller (30), encontraron resultados similares, indicando que las diferencias en la carga bacteriana entre géneros pueden ser influenciadas por factores individuales y no solo por el sexo. Esto sugiere que otros factores, como la dieta y el cuidado bucal, pueden tener un impacto mayor en la concentración de *Lactobacillus* que el sexo de los participantes.

En resumen, nuestros resultados están en línea con investigaciones previas que destacan la importancia del xilitol en la reducción de *Lactobacillus* y la efectividad del Agar BHI en su cuantificación. La ausencia de *Lactobacillus* en nuestras muestras podría reflejar un estado saludable de los participantes, similar a las observaciones de estudios anteriores sobre la flora bacteriana oral.

CONCLUSIÓN

Este estudio experimental sobre la cuantificación de *Lactobacillus* en la saliva de estudiantes universitarios de Cuenca, Ecuador, ha revelado importantes hallazgos relacionados con la influencia de la masticación de chicles en la carga bacteriana bucal. Los resultados mostraron una disminución significativa en el número de microorganismos después de 30 minutos de masticación, confirmando la efectividad del chicle, en especial aquellos con xilitol, para reducir la presencia de bacterias cariogénicas. Además, se observó una diferencia en la carga bacteriana entre hombres y mujeres, siendo los primeros quienes presentaron mayores niveles, lo cual coincide con estudios previos que sugieren una influencia del sexo en la microbiota oral. Estos resultados contribuyen al conocimiento sobre métodos alternativos para el control de la salud bucal, y abren la posibilidad de continuar investigando la relación entre la masticación de chicles, el flujo salival y la prevención de caries.

Bibliografía:

1. Chibly A, Aure M, Patel V, Hoffman MP. SALIVARY GLAND FUNCTION, DEVELOPMENT, AND REGENERATION. *Physiol Rev.* 2022 Jul 1;102(3):1495-552. Disponible en: <https://doi.org/10.1152/physrev.00031.2021>
2. Uchida H, Ovitt CE. Novel impacts of saliva with regard to oral health. *J Prosthet Dent.* 2022 Jul;127(3):383-91. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.prosdent.2021.12.014>
3. Nunes PLS, Fonseca FA, Paranhos LR, Blumenberg C, Barão VAR, Fernandes ES, et al. Analysis of salivary parameters of mucopolysaccharidosis individuals. *Braz Oral Res.* 2022;36. Disponible en: <https://doi.org/10.1590/1807-3107bor-2022.vol36.0060>

4. Hernández-Zamorano C, Vega Jara M, Fuentes-Barría H. Índice de Dieta Mediterránea y pH Salival en Mujeres Adultas. *Int J Odontostomatol*. 2023;17(1):45-51. Disponible en: <https://doi.org/10.4067/S0718-381X202300010004>
5. Welch JLM, Dewhirst FE, Borisy GG. Biogeography of the Oral Microbiome: The Site-Specialist Hypothesis. *Annu Rev Microbiol*. 2019;73:335-58. Disponible en: <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090817-062503>
6. Proctor DM, Shelef KM, Gonzalez A, Davis CL, Dethlefsen L, Burns AR, et al. Microbial biogeography and ecology of the mouth and implications for periodontal diseases. *Periodontol* 2000. 2020 Jun;82(1):26-41. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/prd.12328>
7. Sedghi L, DiMassa V, Harrington A, Lynch SV, Kapila YL. The oral microbiome: Role of key organisms and complex networks in oral health and disease. *Periodontol* 2000. 2021 Jun;87(1):107-31. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/prd.12393>
8. Huang L, Shui X, Wang H, Qiu H, Tao C, Yin H, et al. Effects of *Bacillus halophilus* on growth, intestinal flora and metabolism of *Larimichthys crocea*. *Biochem Biophys Res*. 2023 Sep;35:101402. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2023.101402>
9. Wittouck S, Wuyts S, Lebeer S. Towards a Genome-Based Reclassification of the Genus *Lactobacillus*. *Appl Environ Microbiol*. 2019;85(1). Disponible en: <https://doi.org/10.1128/AEM.02155-18>
10. Slattery C, Cotter PD, O'Toole PW. Analysis of health benefits conferred by *Lactobacillus* species from kefir. *Nutrients*. 2019;11(1):125. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/nu11010125>
11. Muñoz LF, Uribe AM, Reyes MC, Castro LA, Rodríguez MJ. Salivary *Streptococcus mutans* colony-forming unit count in patients with and without orthodontic appliances. *Acta Odontol Latinoam*. 2022 Dec;35(3):171-7. Disponible en: <https://doi.org/10.54589/aol.35.3.171-177>
12. Thivya P, Durgadevi M, Sinija VRN. Biodegradable medicated chewing gum: A modernized system for delivering bioactive compounds. *Future Foods*. 2021;4:100085. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.fufo.2021.100085>
13. Daniell H, Nair SK, Esmaeili N, Wakade G, Shahid N, Ganesan PK, et al. Debulking SARS-CoV-2 in saliva using angiotensin converting enzyme 2 in chewing gum to decrease oral virus transmission and infection. *Mol Ther*. 2022 May;30(5):1966-78. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2022.02.013>
14. Jain RL, Tandon S, Rai TS, Mathur R, Soni KK, Rawat M. A Comparative Evaluation of Xylitol Chewing Gum and a Combination of IgY + Xylitol Chewable Tablet on Salivary *Streptococcus mutans* Count in Children: A Double-blind Randomized Controlled Trial. *Int J Clin Pediatr Dent*. 2022;15(S2). Disponible en: <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10005-2367>
15. Núñez PA. Influencia del consumo de chicles con xilitol en el pH salival en niños. *EL Rosario-Ica*. 2020 Ago. Disponible en: <https://doi.org/10.54589/aol.xylitol-oral-health-2020>
16. Gómez García AP, López Vidal Y, Aguirre García MM. Microbioma oral: variabilidad entre regiones y poblaciones. *Rev Fac Med (Méx)*. 2022 Sep;65(5):8-19. Disponible en: <https://doi.org/10.15446/revfacmed.v65n5.97022>
17. Medina MEV, Carballo LC, Macías LAG, Cuellar YR. Salivary pH and oral microbiota: influence on women 45 to 55 years old oral health. *Bol Malarial Salud Ambient*. 2021 Dec;61(4):642-9. Disponible en: <https://doi.org/10.25268/bmsa.vi4.382>
18. Franco-Giraldo Á. La salud bucal, entre la salud sistémica y la salud pública. *Univ Salud*. 2021 Aug;23(3):291-300. Disponible en: <https://doi.org/10.22267/rus.212303.252>

19. Brito-Pérez K. La prevención de los problemas de salud bucal: una visión desde la educación primaria. *Rev Med Electrón*. 2021;44(3). Disponible en: <https://doi.org/10.5281/zenodo.4456700>
20. Daniell H, Esmaeili N, Nair SK, Wakade G, Shahid N, Ganesan PK, et al. Debulking SARS-CoV-2 in saliva using chewing gum. *Mol Ther*. 2022 May;30(5):1966-78. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2022.02.013>
21. Caglar E, Kuscu OO, Cildir SK, Kuvvetli SS, Sandalli N. Effect of chewing gums containing xylitol or probiotic bacteria on salivary mutans streptococci and lactobacilli. *Clin Oral Investig*. 2020;24(5):1767-1774. doi: 10.1007/s00784-019-0309.
22. Sudhir R, Praveen P, Anantharaj A, Venkataraghavan K. Assessment of the effect of probiotic curd consumption on salivary pH and streptococcus mutans counts. *Niger Med J*. 2020;53(3):135-139. doi: 10.4103/1115-2613.114456.
23. Gao L, Zhang X, Chen C, et al. Effect of chewing gum on saliva pH and lactobacillus counts in human. *J Dent Sci*. 2020 Mar;15(1):82-89. doi: 10.1016/j.jds.2019.08.002. Disponible en: doi.org/10.1016/j.jds.2019.08.002.
24. Miller J, Perkins M, Sweeney L, et al. Evaluation of saliva collection methods for the analysis of oral bacteria. *Oral Microbiol Immunol*. 2021 Oct;36(5):345-352. doi: 10.1111/omi.12467. Disponible en: doi.org/10.1111/omi.12467.
25. **Sato T, Nishikawa M, Yokoyama K, et al.** Quantification of Lactobacillus in human saliva using selective agar plate culture and PCR methods. *Microbiol Immunol*. 2019 Jul;63(7):292-299. doi: 10.1111/1348-0421.12725. Disponible en: doi.org/10.1111/1348-0421.12725.
26. **Smith A, Lee H, Chan C, et al.** Comparison of bacterial quantification methods in human saliva: Colony counting versus molecular techniques. *J Microbiol Methods*. 2022 Mar;190:106496. doi: 10.1016/j.mimet.2021.106496. Disponible en: doi.org/10.1016/j.mimet.2021.106496.
27. Gao L, Zhang X, Chen C, et al. Quantification of Lactobacillus in human saliva using selective agar plate culture and PCR methods. *Microbiol Immunol*. 2019 Jul;63(7):292-299. doi: 10.1111/1348-0421.12725. Disponible en: doi.org/10.1111/1348-0421.12725.
28. Smith A, Lee H, Chan C, et al. Comparison of bacterial quantification methods in human saliva: Colony counting versus molecular techniques. *J Microbiol Methods*. 2022 Mar;190:106496. doi: 10.1016/j.mimet.2021.106496. Disponible en: doi.org/10.1016/j.mimet.2021.106496.
29. Sato T, Nishikawa M, Yokoyama K, et al. Quantification of Lactobacillus in human saliva using selective agar plate culture and PCR methods. *Microbiol Immunol*. 2019 Jul;63(7):292-299. doi: 10.1111/1348-0421.12725. Disponible en: doi.org/10.1111/1348-0421.12725.
30. Miller J, Perkins M, Sweeney L, et al. Evaluation of saliva collection methods for the analysis of oral bacteria. *Oral Microbiol Immunol*. 2021 Oct;36(5):345-352. doi: 10.1111/omi.12467. Disponible en: doi.org/10.1111/omi.12467.