

Universidad Católica de Santa María
Facultad de Odontología
Escuela Profesional de Odontología



**Evaluación de la actividad mínima inhibitoria de *Streptococcus mutans*
por capsaicina, Arequipa, 2025**

Tesis presentada por la Bachiller:

Rivera Juarez, Layeska Naomi

ORCID: 0009-0009-0024-6741

Para optar el Título Profesional de Cirujano Dentista

Asesor:

Dr. Figueroa Banda, Rufo Alberto

ORCID: 0000-0001-7249-0270

Arequipa - Perú

2025

UCSM-ERP

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

ODONTOLOGIA

TITULACIÓN CON TESIS

DICTAMEN APROBACIÓN DE BORRADOR

Arequipa, 03 de Noviembre del 2025

Dictamen: 015121-C-EPO-2025

Visto el borrador del expediente 015121, presentado por:

2020842142 - RIVERA JUAREZ LAYESKA NAOMI

Titulado:

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD MÍNIMA INHIBITORIA DE STREPTOCOCCUS MUTANS POR
CAPSAICINA, AREQUIPA, 2025**

Nuestro dictamen es:

APROBADO

Título Profesional/Título de Segunda Especialidad/Grado Académico a optar:

CIRUJANO DENTISTA

**29716878 - PORTILLA MIRANDA SEREY DORIS
DICTAMINADOR**



**29238358 - SALAS ROJAS MONICA HILDA CLEOFE
DICTAMINADOR**



**29649041 - ZEVALLOS CHAVEZ MARCO ANTONIO
DICTAMINADOR**



Evaluación de la actividad mínima inhibitoria de Streptococcus mutans por capsaicina, Arequipa, 2025

INFORME DE ORIGINALIDAD

6%

INDICE DE SIMILITUD

5%

FUENTES DE INTERNET

2%

PUBLICACIONES

3%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	Submitted to Universidad Católica de Santa María Trabajo del estudiante	2%
2	dergipark.org.tr Fuente de Internet	<1%
3	link.springer.com Fuente de Internet	<1%
4	repositorio.lamolina.edu.pe Fuente de Internet	<1%
5	pesquisa.bvsalud.org Fuente de Internet	<1%
6	repositorio.ucsm.edu.pe Fuente de Internet	<1%
7	www.coursehero.com Fuente de Internet	<1%
8	researchspace.ukzn.ac.za Fuente de Internet	<1%
9	pubmed.ncbi.nlm.nih.gov Fuente de Internet	<1%
10	"Proceedings of the 4th Biotechnology World Symposium", Mexican Journal of Biotechnology, 2024 Publicación	<1%
11	ouci.dntb.gov.ua Fuente de Internet	

DEDICATORIA

A mis padres, con todo el amor y agradecimiento, por acompañarme con su ejemplo y su esfuerzo a nunca rendirme.

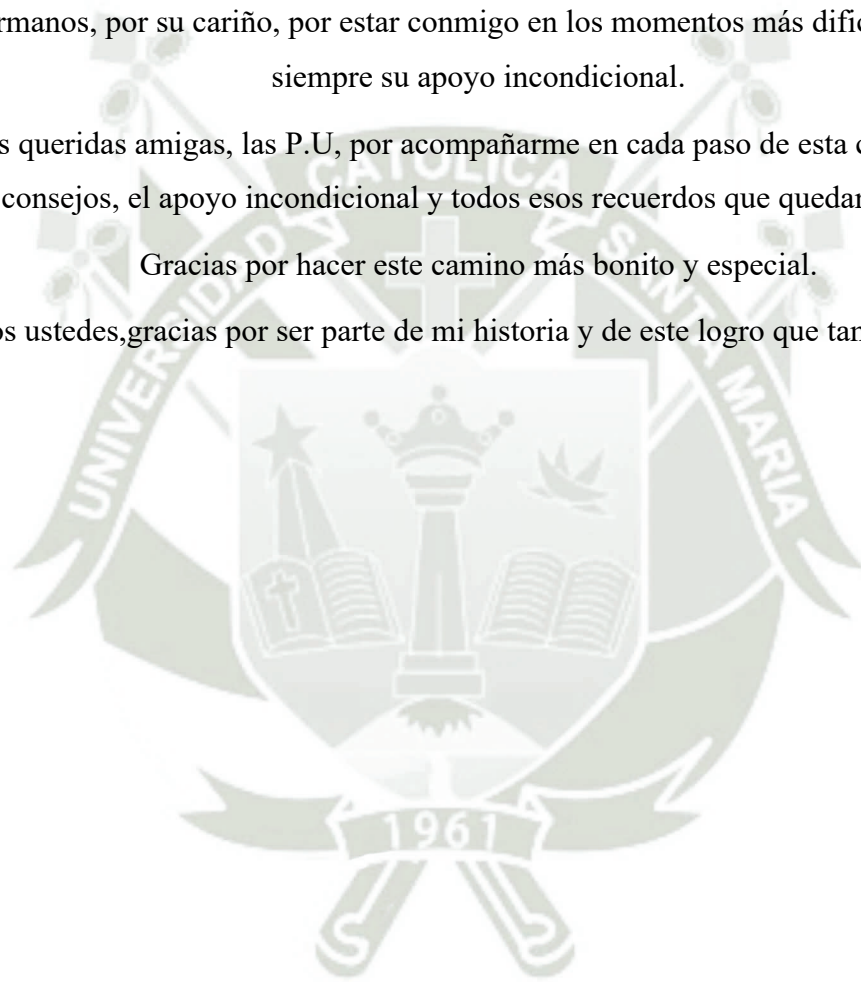
Gracias por su arduo trabajo, por creer siempre en mí y por ayudarme a salir adelante. Sin ustedes nada de esto hubiera sido posible.

A mis hermanos, por su cariño, por estar conmigo en los momentos más difíciles y por darme siempre su apoyo incondicional.

Y a mis queridas amigas, las P.U, por acompañarme en cada paso de esta carrera, por las risas, los consejos, el apoyo incondicional y todos esos recuerdos que quedarán para siempre.

Gracias por hacer este camino más bonito y especial.

A todos ustedes, gracias por ser parte de mi historia y de este logro que también es suyo.



AGRADECIMIENTOS

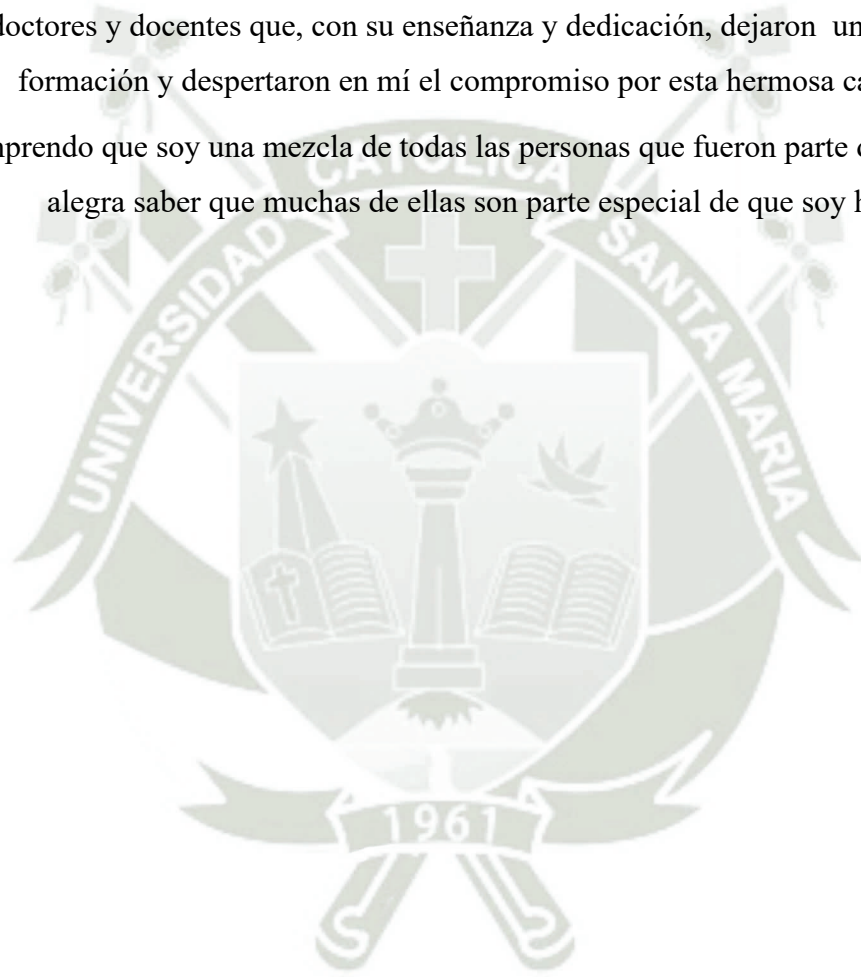
A Dios, por acompañarme con sabiduría y fortaleza en cada etapa de este camino.

A mis padres, por su constante apoyo, ejemplo y amor, pilares fundamentales en la persona y profesional que me esfuerzo por ser.

A mis hermanos y amigos, por compartir esta travesía con paciencia y cariño.

A los doctores y docentes que, con su enseñanza y dedicación, dejaron una huella en mi formación y despertaron en mí el compromiso por esta hermosa carrera.

Hoy comprendo que soy una mezcla de todas las personas que fueron parte de mi vida, y me alegra saber que muchas de ellas son parte especial de que soy hoy.



RESUMEN

Las periodontopatías afectan al 45–50 % de la población y la gingivitis alcanza alrededor del 90 % a lo largo de la vida. Dado el papel de *Streptococcus mutans* en biopelículas y acidogenicidad, se evaluó la capsaicina como alternativa antimicrobiana para aplicaciones tópicas orales.

Metodología. Se trabajó con *S. mutans* ATCC 25175, estandarizando el inóculo ($\sim 5 \times 10^6$ UFC/mL). El ensayo fue por microdilución en 96 pocillos con diluciones 1:2, resazurina 1 %, incubación a 37 °C por 18–24 h y lectura a 600 nm. Se incluyeron control de crecimiento, control estéril y control positivo (bacitracina). Cada concentración se ensayó en 3 réplicas técnicas y 3 biológicas (umbral de CV ≤ 15 %).

Se observó una curva dosis–respuesta en el rango 0.12–25 $\mu\text{g/mL}$: la inhibición se hizo evidente desde ~ 6 $\mu\text{g/mL}$ y alcanzó ≥ 90 % a 10 $\mu\text{g/mL}$. CMI de capsaicina = 10 $\mu\text{g/mL}$ (criterio de ausencia de viraje + absorbancia comparable al control estéril) y $\text{IC}_{50} \approx 5$ $\mu\text{g/mL}$. El control positivo validó el sistema con CMI ≈ 1 $\mu\text{g/mL}$ para bacitracina. Estos valores posicionan a la capsaicina con potencia intermedia frente a reportes más potentes (1.25–5.0 $\mu\text{g/mL}$) y superior a escenarios de baja actividad (25–50 $\mu\text{g/mL}$), diferencias atribuibles a cepa, solvente y condiciones de cultivo. Los datos respaldan su evaluación en formulaciones tópicas que aseguren concentraciones locales ≥ 10 $\mu\text{g/mL}$.

Palabras clave: capsaicina, *Streptococcus mutans*, CMI.

ABSTRACT

Periodontal diseases affect 45–50% of the population, and gingivitis occurs in about 90% over a lifetime. Given the role of *Streptococcus mutans* in biofilm formation and acidogenicity, capsaicin was evaluated as an antimicrobial alternative for topical oral applications.

Methodology. Work was conducted with *S. mutans* ATCC 25175, standardizing the inoculum to $\sim 5 \times 10^6$ CFU/mL. The assay used microdilution in 96 wells with 1:2 serial dilutions, resazurin 1%, incubation at 37 °C for 18–24 h, and reading at 600 nm. A growth control, a sterile control, and a positive control (bacitracin) were included. Each concentration was tested in 3 technical and 3 biological replicates (CV threshold $\leq 15\%$).

A dose–response curve was observed across 0.12–25 $\mu\text{g/mL}$: inhibition became evident from $\sim 6 \mu\text{g/mL}$ and reached $\geq 90\%$ at 10 $\mu\text{g/mL}$. Capsaicin MIC = 10 $\mu\text{g/mL}$ (criterion: absence of color change + absorbance comparable to the sterile control) and $\text{IC}_{50} \approx 5 \mu\text{g/mL}$. The positive control validated the system with MIC $\approx 1 \mu\text{g/mL}$ for bacitracin. These values place capsaicin at intermediate potency relative to more potent reports (1.25–5.0 $\mu\text{g/mL}$) and stronger than low-activity scenarios (25–50 $\mu\text{g/mL}$), with differences attributable to strain, solvent, and culture conditions. The data support further evaluation in topical formulations that ensure local concentrations $\geq 10 \mu\text{g/mL}$.

Keywords: capsaicin, *Streptococcus mutans*, MIC.

ÍNDICE

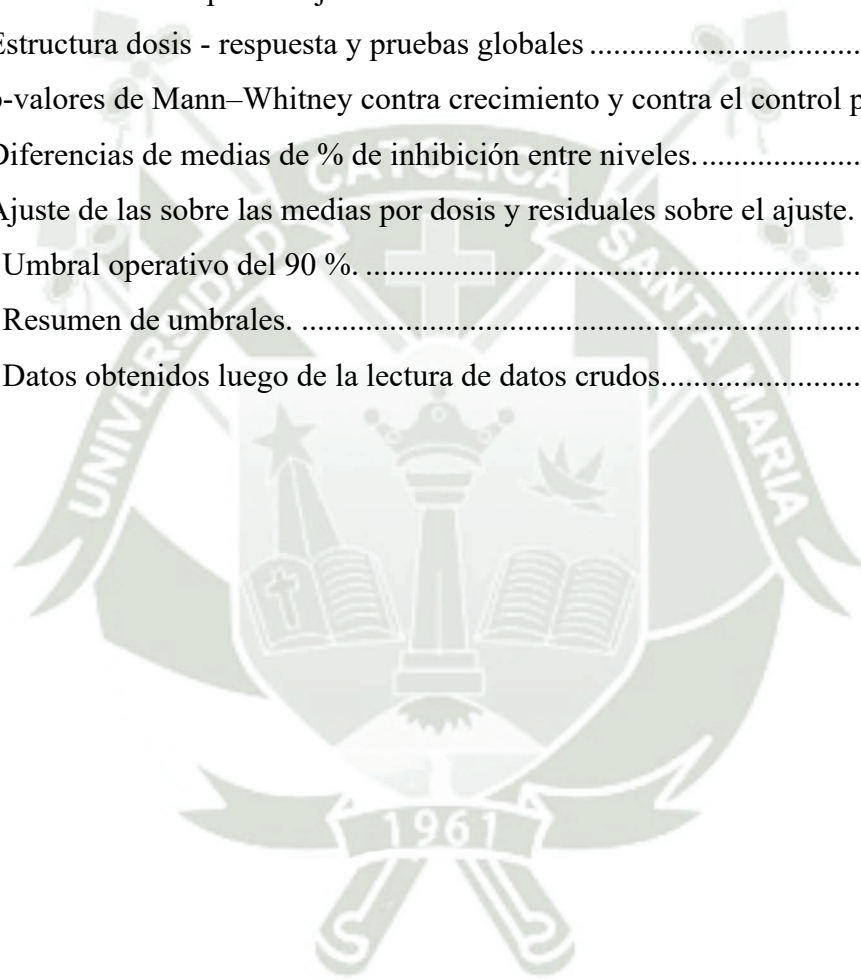
DEDICATORIA	
AGRADECIMIENTOS	
RESUMEN	
ABSTRACT	
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I.....	2
PLANTEAMIENTO TEÓRICO.....	2
1.1 Determinación del problema	3
1.2 Pregunta de investigación.....	5
1.3 Justificación.....	5
1.4. Objetivo	8
1.5. Marco Conceptual y Antecedentes Investigativos.....	8
1.5.1. Marco Conceptual.....	8
1.5.2. Antecedentes Investigativos.....	23
1.6. Hipótesis	36
CAPÍTULO II	37
PLANTEAMIENTO OPERACIONAL.....	37
2.1. Diseño metodológico	38
2.2. Población y muestra.....	38
2.3. Tabla de variable	39
2.4. Técnicas y procedimientos.	39
2.5. Plan de análisis.	44
2.5. Consideraciones éticas.....	44
2.6. Recursos.....	45
CAPÍTULO III	46

RESULTADOS.....	46
3.1. Resultados.....	47
3.2 . Discusión	56
3.3. Conclusiones.....	59
3.4. Recomendaciones	60
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
ANEXO.....	64



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Diseño metodológico.	38
Tabla 2. Variables directas del experimento.	39
Tabla 3. Tratamiento y análisis estadístico.	44
Tabla 4. Control de calidad y consistencia por condición.....	47
Tabla 5. Normalización a porcentaje de inhibición.....	49
Tabla 6. Estructura dosis - respuesta y pruebas globales	51
Tabla 7. p-valores de Mann–Whitney contra crecimiento y contra el control positivo.	51
Tabla 8. Diferencias de medias de % de inhibición entre niveles.....	52
Tabla 9. Ajuste de las sobre las medias por dosis y residuales sobre el ajuste.	52
Tabla 10. Umbral operativo del 90 %.	53
Tabla 11. Resumen de umbrales.	53
Tabla 12. Datos obtenidos luego de la lectura de datos crudos.....	54



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Flujo de la estandarización de la cepa bacteriana.	40
Figura 2. Montaje de cada pocillo en 96 pocillos.	41
Figura 3. Tendencia de señal cruda A600 por dosis.	48
Figura 4. Boxplot del porcentaje de inhibición con respecto a la distribución de la dosis.	49
Figura 5. Heatmap, absorbancia (A600) por réplica y concentración de capsaicina.	55
Figura 6. Placas de cultivo con <i>S. mutans</i>	64
Figura 7. Placa de 96 pocillos.	64



INTRODUCCIÓN

Las enfermedades periodontales constituyen uno de los problemas de salud oral más frecuentes y de mayor impacto funcional y económico. Se estima que afectan al **45–50 %** de la población, mientras que la gingivitis alcanza alrededor del **90 %** a lo largo de la vida. En este contexto, *Streptococcus mutans* desempeña un papel central en la colonización del esmalte, la formación de biopelículas y la acidificación del microambiente bucal, favoreciendo la desmineralización y el daño tisular. Pese a la eficacia de antisépticos convencionales, persisten desafíos asociados a efectos adversos, adherencia terapéutica y desempeño frente a biopelículas maduras, lo que impulsa la búsqueda de alternativas seguras, accesibles y con perfiles de acción complementarios. La capsaicina, un alcaloide presente en especies del género *Capsicum*, ha sido reportada con actividades antimicrobianas y moduladoras de biopelículas frente a diversos microorganismos. Sus propiedades fisicoquímicas sugieren potencial utilidad para formulaciones tópicas orales, donde la retención local y la penetración en matrices polisacáridas son determinantes del efecto. No obstante, la evidencia frente a *S. mutans* bajo condiciones estandarizadas sigue siendo heterogénea y, en muchos casos, metodológicamente dispar (diferencias de cepa, solvente, medios y criterios de lectura), lo que limita la comparación de resultados y la traslación a productos de uso clínico (1).

El presente proyecto se propone caracterizar la actividad inhibitoria de la capsaicina frente a *S. mutans* ATCC 25175 mediante un protocolo reproducible de microdilución en placa. Se trabajará con un inóculo estandarizado y un rango de concentraciones diseñado para cubrir desde niveles subinhibitorios, empleando placas de 96 pocillos, diluciones seriadas 1:2, resazurina al 1 % como indicador redox, incubación a 37 °C por 18–24 h y lectura espectrofotométrica a 600 nm (1).

En términos de relevancia, disponer de parámetros cuantitativos robustos (CMI, IC₅₀ y variabilidad) permitirá fundamentar decisiones de desarrollo (vehiculización, concentración de carga, pauta de aplicación) y priorizar estudios posteriores de estabilidad, compatibilidad y seguridad. Así, este proyecto aporta evidencia experimental necesaria para valorar a la capsaicina como candidata en estrategias preventivas y de control de biopelículas orales, con énfasis en soluciones de bajo costo, fácil implementación y alto impacto poblacional.



CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO TEÓRICO

1.1 Determinación del problema

Las enfermedades periodontales constituyen una de las afecciones más relevantes en la salud bucodental a nivel mundial, afectando significativamente la calidad de vida y representando un reto para los sistemas de salud pública. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), aproximadamente el 45% al 50% de la población mundial padece de algún tipo de enfermedad periodontal, siendo la gingivitis una de las más comunes, presente en cerca del 90% de los individuos en algún momento de su vida(1). Estas patologías no solo ocasionan dolor, inflamación y pérdida dentaria, sino que también se asocian con un incremento en los costos sanitarios debido a la necesidad de tratamientos prolongados y procedimientos complejos (2).

El término enfermedad periodontal comprende un conjunto de procesos inflamatorios que afecta a los tejidos de soporte del diente: encía, ligamento periodontal, cemento radicular y hueso alveolar. Entre las etapas iniciales se encuentra la gingivitis, caracterizada por inflamación reversible de la encía, que en ausencia de tratamiento puede evolucionar a periodontitis, donde se produce la destrucción irreversible del tejido de soporte(3) Diversos estudios han evidenciado que estas enfermedades no solo comprende la salud oral, sino que también se relaciona con patologías sistémicas como diabetes mellitus, enfermedades cardiovasculares y complicaciones en el embarazo, lo que resalta su impacto en la salud general(4).

Uno de los principales agentes etiológicos implicados en el desarrollo y progresión de estas enfermedades es *Streptococcus mutans*, bacteria grampositiva ampliamente reconocida por su papel en la formación de biopelículas dentales (placa bacteriana) y la producción de ácidos que contribuyen a la desmineralización del esmalte dental (5). Esta especie bacteriana pertenece al grupo de los estreptococos orales y es considerada un microorganismo acidogénico y acidúrico, capaz de sobrevivir en ambientes de bajo pH. Su mecanismo patogénico incluye la producción de glicosiltransferasas, enzimas responsables de sintetizar glucanos insolubles a partir de la sacarosa, lo que facilita la adhesión bacteriana y la formación de biofilm(6)

Además de su participación en la aparición de caries, *S mutans* también está involucrada en procesos inflamatorios gingivales, agravando las lesiones periodontales. Su elevada capacidad de adherencia, formación de biofilm y resistencia frente a antimicrobianos convencionales la convierten en un microorganismo prioritario en la investigación odontológica (7). Diversas investigaciones han reportado un aumento progresivo en resistencia bacteriana a agentes como

clorhexidina, fluoruro de sodio y antibióticos sistémicos, lo que reduce la eficacia de los tratamientos convencionales y demanda el desarrollo de alternativas innovadoras(8).

Ante el incremento de la resistencia bacteriana y los efectos adversos de algunos agentes químicos utilizados en el control de la placa bacteriana, surge la necesidad de explorar alternativas naturales, efectivas y seguras. En este sentido, diversos estudios han evaluado compuestos bioactivos de origen vegetal por su potencial antimicrobiano, antioxidante y antiinflamatorio. Entre ellos destaca la capsaicina, un alcaloide fenólico presente en frutos del género *Capsicum*, ampliamente conocido por su uso culinario y farmacológico.(9)

La capsaicina es el principal compuesto responsable del sabor picante en los ajíes y chiles, por mas alla de sus características organolépticas, posee propiedades biológicas de interés. Estudios han demostrado que este compuesto actúa como modulador de respuestas inflamatoria, inhibidor de la síntesis de prostaglandinas y agentes antimicrobianos frente a diversas bacterias grampositivas y gramnegativas(10). Su mecanismo de acción antimicrobiano se asocia con la alteración de la permeabilidad de la membrana bacteriana, la inhibición enzimática y la generación de estrés oxidativo en las células bacterianas(11)

Investigaciones previas han reportado propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias y analgésicas de la capsaicina frente a diferentes microorganismos patógenos (12,13). No obstante, la evidencia científica acerca de su efectividad específica frente a *Streptococcus mutans* es limitada, especialmente en lo que respecta a la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI), parámetro indispensable para su posible aplicación terapéutica(14). El uso de la capsaicina como agente antimicrobiano plantea la posibilidad de desarrollar productos farmacéuticos innovadores en el ámbito odontológico, tales como enjuagues bucales, geles y barnices como acción específica contra *Streptococcus mutans*. Asimismo, su incorporación en biomateriales dentales, como resinas y selladores, podría mejorar las propiedades antimicrobianas de estos materiales, contribuyendo a reducir el riesgo de caries secundarias y prolongando la longevidad de las restauraciones. Este potencial farmacológico la convierte en una alternativa de interés para la industria odontológica y farmacéutica.(15).

Desde una perspectiva social, la búsqueda de soluciones accesibles y menos invasivas frente a enfermedades periodontales es prioritaria, considerando que la falta de acceso a tratamientos odontológicos adecuados es frecuente en poblaciones vulnerables(16). En términos económicos, el impacto de estas patologías es considerable, con costos que ascienden a miles de millones de dólares anuales a nivel global, derivados del tratamiento y de la pérdida prematura de las piezas dentales (17). Científicamente, este estudio aporta información

relevante sobre un recurso natural con potencial uso en la prevención y tratamiento de enfermedades periodontales, respondiendo a la necesidad de alternativas frente a la resistencia antimicrobiana creciente.

Por ello, la presente investigación tiene como objetivo principal determinar la concentración mínima inhibitoria(CMI) de la capsaicina en estado libre contra *Streptococcus mutans* mediante el método de microplacas, con el fin de establecer su eficacia como agente antimicrobiano natural. De manera específica, se evaluará el efecto inhibitorio de diferentes concentraciones de capsaicina(1%,25%,50% y 100%) sobre el crecimiento de esta bacteria. Este estudio se llevará a cabo en la ciudad de Arequipa durante el año 2025, empleando procedimientos microbiológicos estandarizados que garanticen la validez y confiabilidad de los resultados.

La determinación de la concentración mínima inhibitoria(CMI) es uno de los pasos fundamentales en la evaluación de la actividad antimicrobiana de cualquier compuesto, ya que permite establecer la menor concentración capaz de inhibir visiblemente el crecimiento bacteriano.

Este parámetro no solo proporciona información esencial para estudios in vitro, sino que también constituye la base para futuros ensayos clínicos y la formulación de productos terapéuticos. En el caso de la capsaicina, conocer su CMI frente al *S.mutans* permitirá valorar su viabilidad como agente preventivo en salud oral.(18)

El presente estudio no solo aportará datos experimentales sobre la eficacia de la capsaicina frente a *Streptococcus mutans*, sino que también abrirá la posibilidad de nuevas líneas de investigación orientadas a la combinación de este compuesto con otros agentes naturales o sintéticos para potenciar su acción antimicrobiana. De igual forma, permitirá evaluar aspectos como la estabilidad del compuesto en diferentes formulaciones, su toxicidad en tejidos orales y su aceptación por parte de los pacientes, aspectos esenciales para su aplicación clínica (19).

En síntesis, este trabajo busca generar evidencias científicas sobre el potencial de la capsaicina como alternativa terapéutica frente a *Streptococcus mutans*, contribuyendo así al desarrollo de nuevas estrategias para la prevención y control de enfermedades periodontales(20).

1.2 Pregunta de investigación

¿Cuál es la concentración mínima de capsicina necesaria para inhibir el crecimiento de *Streptococcus mutans*?

1.3 Justificación

Justificación social. Las enfermedades periodontales y la caries dental tienen una magnitud que justifica intervenir con urgencia: entre el 45% y el 50% de la población mundial presenta algún grado de enfermedad periodontal y la gingivitis llega a afectar a cerca del 90% de las personas al menos una vez en la vida. *Streptococcus mutans*, por su elevada capacidad acidogénica y acidúrica y por su rol en la formación de biopelículas mediante glicosiltransferasas, participa de manera directa en la desmineralización del esmalte y en la progresión de lesiones gingivales. En un escenario donde 5 de cada 10 personas presentan periodontopatías y 9 de cada 10 han cursado gingivitis, incluso reducciones modestas de la actividad de *S. mutans* del 10% al 30% tendrían repercusiones masivas en bienestar, productividad y calidad de vida. La determinación de la concentración mínima inhibitoria de capsaicina contra *S. mutans* en Arequipa en 2025 aporta un insumo cuantitativo para desarrollar alternativas naturales y potencialmente más accesibles para poblaciones con barreras de acceso al cuidado odontológico, transformando porcentajes de riesgo alto en metas concretas de reducción de carga de enfermedad (3).

Justificación económica. Las patologías bucodentales generan costos sanitarios relevantes por tratamientos prolongados y procedimientos complejos, y la resistencia creciente a agentes de uso común disminuye la eficiencia de las intervenciones actuales. Calcular la concentración mínima inhibitoria permite derivar dosis efectivas y, por tanto, costos por dosis y por beneficiario. Con una CMI conocida, el costo por beneficiario se estima como costo de formulación y distribución dividido entre el número de usuarios y el ahorro sanitario potencial se aproxima multiplicando el número de casos evitados por el costo promedio de tratamiento. Por ejemplo, si una formulación basada en la CMI reduce en 20% la incidencia de eventos atribuibles a *S. mutans* en una cohorte de 1 000 personas y el costo promedio de tratar cada evento es S/ 200, el ahorro anual bruto sería de S/ 40 000; si el costo total del programa es S/ 25 000, la razón beneficio costo sería 1,6 y el punto de equilibrio se alcanzaría cuando los ahorros acumulados igualen la inversión inicial. Al convertir la eficacia in vitro en parámetros de dosificación, el estudio reduce incertidumbre técnica y habilita análisis de costo efectividad, razón beneficio costo y retorno social de la inversión con tasas de descuento y horizontes temporales definidos (4).

Justificación investigativa. Aunque la capsaicina posee propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias y analgésicas demostradas, la evidencia específica frente a *Streptococcus mutans* y, en particular, su concentración mínima inhibitoria, es limitada. El estudio propone

medir la CMI mediante el método de microplacas evaluando concentraciones de 1%, 25%, 50% y 100% con controles apropiados, lo que permite construir una curva concentración respuesta y localizar el punto mínimo de inhibición visible. Para asegurar precisión y validez interna, se plantea realizar al menos 3 réplicas técnicas por concentración en 3 corridas independientes, generando 36 mediciones útiles para estimar intervalos de confianza del 95% y tamaños de efecto; con un nivel de significancia de 0,05 y potencia del 80%, este esquema es capaz de detectar diferencias del orden de 5 puntos porcentuales en crecimiento bacteriano medido por absorbancia o unidades formadoras de colonia. Los resultados serán transferibles a fases posteriores de desarrollo al aportar una dosis mínima efectiva cuantificada, necesaria para calcular volúmenes de ingrediente activo, estabilidad de formulaciones y tamaños muestrales de ensayos in vivo (10).

Justificación en salud. Reducir la actividad de *Streptococcus mutans* impacta de forma directa en la prevención de caries y en la disminución de procesos inflamatorios gingivales, por lo que un descenso sostenido de la actividad bacteriana entre 10% y 30% se proyecta en menos desmineralización, menor progresión a periodontitis y menor necesidad de procedimientos invasivos. En poblaciones donde entre 45% y 50% cursan alguna periodontopatía y la gingivitis alcanza al 90%, una intervención basada en una CMI bien definida puede traducirse en reducciones absolutas de varios puntos porcentuales en incidencia anual, con efecto agregado en dolor, funcionalidad oral, nutrición y desempeño escolar y laboral. Al cuantificar la CMI, el estudio establece el umbral operativo para diseñar enjuagues, geles o barnices con potencial para disminuir la colonización y la formación de biopelículas, y sienta la base para estimar métricas de salud como casos evitados por año y, en etapas clínicas, años de vida ajustados por calidad ganados y costos por unidad de resultado, cerrando la brecha entre eficacia microbiológica y beneficio clínico poblacional (2).

1.4. Objetivo

O general : Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de la capsaicina frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175 mediante microdilución en placa con lectura espectrofotométrica.

O. específico 1. Estandarizar el inóculo de *S. mutans* y preparar una serie de diluciones de capsaicina en microplaca, incorporando controles de crecimiento, esterilidad y del vehículo, conforme a lineamientos CLSI/EUCAST.

O. específico 2. Registrar la absorbancia a la longitud de onda establecida y calcular la CMI como la menor concentración que inhibe el crecimiento respecto del control, realizando las réplicas y el análisis estadístico correspondientes.

1.5. Marco Conceptual y Antecedentes Investigativos

1.5.1. Marco Conceptual

La caries dental y las periodontopatías

Representan procesos biofilm-dependientes en los que la ecología microbiana del nicho supra y subgingival se desplaza hacia estados acidogénicos y acidúricos sostenidos. En ese contexto, *Streptococcus mutans* emerge como un catalizador clave de la desmineralización, no por ser el único colonizador del ecosistema oral, sino por su singular combinación de adhesión específica a la película adquirida, síntesis de exopolisacáridos insolubles, metabolismo rápido de carbohidratos fermentables y resiliencia frente a caídas de pH por debajo del umbral crítico de esmalte. La llamada curva de Stephan ilustra este fenómeno: tras una carga sacarídica, el pH de placa puede caer por debajo de 5,5 en minutos y mantenerse en rangos desmineralizantes durante lapsos suficientes para producir pérdida neta de mineral cuando la frecuencia de exposiciones supera la capacidad tampón salival y los periodos de remineralización. El componente mecanístico que convierte este fenómeno en patología es la capacidad de *S. mutans* para mantener gradientes de protones en ambientes ácidos mediante bombas F1F0-ATPasa altamente eficientes y una respuesta de tolerancia al ácido que reprograma su fisiología hacia una homeostasis compatible con pH de 4,5 a 5,0, niveles que inhiben a competidores menos acidúricos y consolidan su dominancia en el biofilm (20).

S. mutans

Es un coco Gram positivo, anaerobio facultativo y productor de ácido láctico, cuyo genoma codifica un repertorio de sistemas de transporte de carbohidratos dependientes de fosfoenolpiruvato (PTS) que internalizan glucosa, fructosa y sacarosa con alta eficiencia. La hidrólisis de sacarosa por glicosiltransferasas secretadas y asociadas a la superficie celular GtfB, GtfC y GtfD genera glucanos α -1,3 y α -1,6, estructuralmente insolubles y altamente adhesivos, que forman una matriz exopolisacárida densa. Esta matriz incrementa la viscosidad local, retiene ácidos orgánicos y crea microdominios de difusión limitada con gradientes de pH, lo que favorece la desmineralización del esmalte al mantener microambientes subcríticos pegados a la interfase diente-biofilm. La adhesión inicial y la coadhesión bacteriana están mediadas por proteínas de superficie como Antígeno I/II (SpaP/P1) y por proteínas ligadoras de glucano (Gbp), que cooperan con los glucanos sintetizados para establecer un anclaje mecánico robusto resistente a cizallamiento hidrodinámico. A nivel de señalización, los sistemas de dos componentes como VicRK, ComDE, LytST y CiaRH coordinan sensibilidad a estrés, competencia natural, remodelado de la pared y exopolisacáridos, mientras que redes de quorum sensing mediante autoinductores peptídicos modulan bacteriocinas (mutacinas), biofilm y genes de virulencia en función de la densidad celular (21).

El metabolismo central de *S. mutans* está orientado a una glucólisis vigorosa que convierte hexosas en piruvato con posterior reducción a lactato por lactato deshidrogenasa, regenerando NAD⁺ y sosteniendo flujos catabólicos altos. La capacidad de acidificación depende no solo de la velocidad de glucólisis sino también de la eficiencia del PTS y de rutas accesorias que consumen protones. La tolerancia al ácido se explica por el incremento de la expresión y actividad de la ATPasa de membrana que expulsa protones a costa de ATP, por la alteración de la composición de ácidos grasos de membrana que disminuye su permeabilidad a protones y por chaperonas que protegen macromoléculas a pH bajo. Esta fisiología acidotolerante permite que *S. mutans* mantenga crecimiento neto en condiciones que inhiben a comensales beneficiosos, desplazando la comunidad hacia una disbiosis cariogénica (21).

Desde la perspectiva fisicoquímica, la progresión de la caries es el resultado de un desequilibrio entre el producto de ion actividad del calcio y fosfato en el fluido de placa y la solubilidad de apatita. El pH crítico para esmalte hidroxiapatítico se sitúa alrededor de 5,5, mientras que para dentina y cemento es más alto, en torno a 6,2, por su menor grado de mineralización y mayor contenido orgánico. La matriz de biofilm producida por *S. mutans* reduce la tasa de difusión de

bicarbonato y otras bases débiles desde la saliva, prolonga la permanencia de ácidos y facilita la subsaturación local. En términos cinéticos, la velocidad de desmineralización aumenta de forma no lineal a medida que el pH se aleja del equilibrio, y el carácter cíclico de los ataques ácidos determina que frecuencias de exposición altas produzcan pérdidas netas de mineral pese a mecanismos de remineralización asistidos por saliva y fluoruros (22).

La capsaicina

8-metil-N-vanillil-6-nonenamida, es un alcaloide fenólico de la familia de los capsaicinoides caracterizado por un núcleo vanililo con un grupo hidroxilo fenólico, un enlace amida y una cadena hidrofóbica de nueve carbonos con insaturación. Su fórmula molecular es $C_{18}H_{27}NO_3$ y su masa molar aproximada es 305,4 g/mol. Presenta logP elevado compatible con alta lipofilia, pKa del fenol en torno a 9–10 y solubilidad acuosa muy baja a pH fisiológico, lo que condiciona su formulación en matrices hidroalcohólicas o su disolución previa en vectores orgánicos como etanol o dimetilsulfóxido, cuidando que la concentración final del solvente en el ensayo no induzca inhibición inespecífica. Los capsaicinoides actúan como ligandos del receptor TRPV1 en tejidos neuronales, lo que explica su pungencia en mucosas; sin embargo, su bioactividad antimicrobiana se vincula principalmente a interacciones con membranas bacterianas, desorganización del empaquetamiento lipídico, alteración del potencial de membrana y aumento de la permeabilidad, con posibles efectos secundarios en la generación de especies reactivas de oxígeno y en la interferencia con sistemas de señalización de quorum sensing y rutas enzimáticas asociadas a la biosíntesis de pared (24).

La hipótesis mecanística para *S. mutans* postula que la capsaicina, por su carácter anfifílico y su densidad electrónica en el anillo fenólico, puede insertarse en la bicapa citoplasmática Gram positiva y comprometer la integridad de la membrana, lo que conlleva disipación del gradiente electroquímico de protones necesario para la F1F0-ATPasa y, en consecuencia, una pérdida de la capacidad de expulsión de protones imprescindible para la acidotolerancia. La reducción de $\Delta\psi$ y el incremento de la conductancia de la membrana favorecen colapsos de pH intracelular, disminución de la síntesis de exopolisacáridos por glicosiltransferasas dependientes de sacarosa y una menor cohesión del biofilm. A niveles subinhibitorios, no puede descartarse modulación de la expresión de genes de adhesión y de síntesis de matriz, con efectos en la arquitectura del biofilm que disminuyen su difusión limitada y reducen la retención de ácidos, aunque la

confirmación de estos fenómenos exige mediciones directas de matriz, viscoelasticidad y micro-pH (25).

La determinación de la concentración mínima inhibitoria

Microdilución en placa proporciona un parámetro cuantitativo estándar que define la menor concentración de capsaicina capaz de impedir el crecimiento visible de *S. mutans* bajo condiciones controladas. El método se ejecuta en microplacas de 96 pozos utilizando un medio nutritivo apto para estreptococos orales, como caldo cerebro-corazón o tripticasa soya suplementada con extracto de levadura, inoculado con una suspensión bacteriana ajustada a un inóculo final de aproximadamente 5×10^5 unidades formadoras de colonia por mililitro, de acuerdo con estándares de referencia para pruebas de susceptibilidad. La capsaicina se serializa en diluciones geométricas típicamente en base dos o base tres para capturar con resolución el punto de transición entre crecimiento y no crecimiento. Se incluye un control de crecimiento sin antimicrobiano, un control de esterilidad del medio y controles de solvente a la concentración máxima empleada para demostrar ausencia de efectos inhibitorios por el vehículo. La lectura espectrofotométrica a longitudes de onda de 600 a 630 nm permite cuantificar densidad óptica como proxy de turbidez, pero debe complementarse con inspección visual para detectar fenómenos de agregación o coloración que puedan interferir con la absorbancia. En caso de compuestos coloreados o que precipitan, la verificación de crecimiento por resiembra o por indicadores redox como resazurina reduce el riesgo de falsos positivos (26).

El análisis cuantitativo de los datos de microdilución se realiza calculando el porcentaje de inhibición relativo al control de crecimiento mediante la expresión 100 por ciento por uno menos la razón entre la absorbancia de tratamiento y la absorbancia del control. Sobre esta serie concentración efecto, la estimación del IC50, definida como la concentración que reduce el crecimiento en un 50%, se obtiene ajustando un modelo logístico de cuatro parámetros que captura el efecto máximo, el efecto mínimo, la pendiente de la pendiente de Hill y la posición de la semimáxima. La bondad de ajuste se evalúa por coeficientes de determinación ajustados y análisis de residuales, y la incertidumbre se expresa mediante intervalos de confianza del 95% derivados de la matriz de varianzas y covarianzas del modelo. La CMI, al ser un umbral operacional discreto, se reporta como la menor concentración sin crecimiento visible o con absorbancia por debajo de un umbral predefinido, y puede diferir del IC50, que resume la potencia promedio en la zona de transición sigmoide. La concordancia entre CMI e IC90, entendida como la concentración que logra 90% de inhibición, aporta coherencia biológica

entre la definición cualitativa y la cuantitativa del efecto. La caracterización completa de la actividad antimicrobiana de la capsaicina frente a *S. mutans* debe considerar además la concentración bactericida mínima, definida como la menor concentración que elimina el 99,9% del inóculo inicial verificado por subcultivo en agar sin antimicrobiano. La relación entre CMI y CBM orienta sobre si el compuesto es esencialmente bacteriostático o bactericida en las condiciones del ensayo, una distinción con implicaciones terapéuticas en escenarios de alta carga bacteriana y biofilms establecidos. En el caso particular de organismos productores de biofilm, la susceptibilidad en el estado planctónico subestima la concentración necesaria para impactar biofilms maduros, por lo que métricas como la concentración mínima inhibitoria de biofilm, la biomasa residual cuantificada por cristal violeta y la viabilidad intracapa evaluada por tinciones diferenciales o recuento de células cultivables añaden capas de relevancia clínica (27).

La farmacotécnica de capsaicina para aplicaciones orales exige resolver su baja solubilidad y su potencial irritante sensorial. La incorporación en sistemas hidroalcohólicos controlando el contenido de etanol, el uso de cosolventes, la complejación con ciclodextrinas y la micro o nanoencapsulación en polímeros mucoadhesivos como HPMC o carbómeros permiten incrementar su solubilidad aparente, modular su liberación y reducir picos de concentración libre sobre mucosa. Enjuagues bucales, geles tópicos y barnices son plataformas con perfiles de residencia distintos: los enjuagues ofrecen exposición corta y difusa, los geles aportan mayor permanencia en nichos específicos, y los barnices forman películas persistentes con liberación sostenida que pueden mantener niveles locales por encima de la CMI. La estabilidad química de la capsaicina, relativamente alta frente a hidrólisis a pH neutro, se optimiza protegiendo del calor y la luz y evitando condiciones fuertemente alcalinas o ácidas que puedan promover degradación oxidativa o isomerización. Ensayos acelerados de estabilidad y estudios de compatibilidad con excipientes iónicos y no iónicos son necesarios para garantizar potencia y uniformidad de dosis a lo largo de la vida útil. El perfil de seguridad local debe abordarse con ensayos de citotoxicidad *in vitro* en fibroblastos gingivales, queratinocitos orales o modelos 3D de mucosa, utilizando pruebas de viabilidad metabólica como MTT o resazurina, integridad de membrana por LDH y marcadores de inflamación. Estos estudios permiten determinar concentraciones no citotóxicas y establecer márgenes de seguridad relativos a la CMI. La activación de TRPV1 en terminaciones nociceptivas de la mucosa oral explica sensaciones de ardor que pueden limitar la aceptabilidad del producto; en consecuencia, la estrategia de formulación para atenuar pungencia, ya sea por reducción de la fracción libre o por vehículos

que amortigüen la interacción sensorial, se convierte en un componente esencial de la traslación clínica. La evaluación de aceptabilidad organoléptica, efecto sobre el gusto y sensación de ardor debe integrarse tempranamente en el desarrollo para alinear eficacia antimicrobiana con adherencia del paciente(28).

El marco regulatorio de las pruebas de susceptibilidad microbiológica se apoya en normativas como CLSI para metodologías de microdilución y en guías de buenas prácticas de laboratorio que aseguran trazabilidad del inóculo, calibración espectrofotométrica, control de atmósferas de incubación y validación de controles de referencia. Para *S. mutans* ATCC 25175, la estandarización del inóculo por densidad óptica correlacionada con recuentos viables, la verificación de pureza y el mantenimiento de la fase logarítmica son determinantes de la precisión intra e interensayo. El control positivo con un agente de referencia como bacitracina contextualiza la potencia relativa de capsaicina, y el control negativo con solvente confirma la especificidad del efecto. El análisis estadístico debe contemplar replicados técnicos y biológicos suficientes para estimar varianza, calcular tamaños de efecto y construir intervalos de confianza robustos; en diseños multifactoriales que consideren concentración y tiempo, el análisis de varianza de medidas repetidas o modelos mixtos pueden captar efectos principales e interacciones con mayor sensibilidad que comparaciones puntuales. La relevancia clínica de cualquier parámetro *in vitro* depende de su integración con la farmacocinética de superficie y con la ecología del biofilm oral. Un compuesto con CMI baja pero rápida eliminación salival puede no alcanzar exposiciones temporales suficientes para producir efectos sostenidos, mientras que una plataforma con liberación prolongada que mantenga concentraciones por encima de la CMI durante ventanas relevantes para el metabolismo glucolítico postprandial podría traducir reducciones medibles de acidificación de placa y de marcadores tempranos de desmineralización. Por ello, el paso posterior a la determinación de CMI e IC50 consiste en diseñar esquemas de dosificación tópica que emulen la cronobiología de los pulsos de azúcar y la dinámica de pH de placa, incorporando endpoints intermedios como cambios en pH de placa, carga de *S. mutans* por qPCR o cultivos selectivos, tasa de síntesis de exopolisacáridos y biomarcadores salivales de capacidad tampón (29).

La arquitectura del biofilm.

Cariogénico se sustenta en una matriz de exopolisacáridos que confiere propiedades viscoelásticas y de barrera a la difusión, modificando la microfísica del nicho oral. En condiciones de abundancia de sacarosa, *Streptococcus mutans* sintetiza glucanos insolubles con

enlaces α -1,3 y ramificaciones α -1,6 mediante las glicosiltransferasas GtfB y GtfC, mientras que GtfD produce principalmente glucanos solubles. Esta matriz aumenta la fracción de volumen ocupado por polímeros, eleva la viscosidad efectiva y reduce los coeficientes de difusión de ácidos y bases, generando microgradientes de pH a escala de micras en los que el pH puede estabilizarse en 4,5 a 5,0 pese a un pH salival superior. El coeficiente de difusión del lactato en agua es del orden de $1,0 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ y en matriz densa puede reducirse de manera apreciable, prolongando el tiempo de residencia de ácidos junto a la superficie del esmalte. La retención de protones y la exclusión de bicarbonato por el entramado polimérico favorecen estados locales de subsaturación respecto a hidroxiapatita que impulsan la disolución mineral. La película adquirida en el esmalte, rica en glicoproteínas salivales y proteínas ricas en prolina, sirve de sustrato para adhesinas de *S. mutans* como SpaP y para proteínas ligadoras de glucano, estabilizando una unión multivalente resistente a esfuerzos de cizallamiento hidrodinámico propios del flujo salival(23) (15).

El control genético de la virulencia de *S. mutans* integra sensores de dos componentes y sistemas de quorum sensing que responden a estrés, densidad celular y disponibilidad de carbohidratos. VicRK regula homeostasis de pared y biogénesis de exopolisacáridos modulando la expresión de gtfB y gtfC. ComDE y el péptido de competencia controlan programas de competencia natural y producción de mutacinas que confieren ventajas ecológicas frente a comensales. LytST interviene en remodelado de pared y respuesta a estrés, mientras que CiaRH contribuye a tolerancia a condiciones adversas. La acidotolerancia se fundamenta en el incremento de la actividad de la F1F0 ATPasa de membrana que expulsa protones a expensas de ATP, en cambios en la composición de ácidos grasos de membrana que disminuyen la permeabilidad a protones y en chaperonas que estabilizan proteínas a pH bajo. El resultado es la capacidad de mantener viabilidad y metabolismo en pH donde rivales menos acidúricos se inhiben, consolidando la dominancia en el biofilm (27).

Desde la bioquímica del metabolismo, *S. mutans* canaliza glucosa, fructosa y sacarosa a través de sistemas PTS que fosforilan el sustrato durante el transporte y alimentan una glucólisis de alta tasa. El piruvato se reduce a lactato por lactato deshidrogenasa para regenerar NAD^+ , fijando una producción sostenida de ácido láctico. La relación entre la velocidad de glucólisis y la capacidad tampón de la saliva determina el perfil temporal del pH de placa descrito por la curva de Stephan, con caídas rápidas posprandiales por debajo de 5,5 y recuperaciones más lentas dependientes del flujo salival, del bicarbonato y de iones calcio y fosfato. La constante

de disociación del ácido láctico alrededor de pK_a 3,86 implica que a pH de placa 5 la fracción no disociada es pequeña pero suficiente para difundir por membrana y liberar protones intracelulares, potenciando estrés ácido. En este contexto, la inhibición de rutas que sostienen la acidogénesis o la acidotolerancia representa un objetivo estratégico para reducir cariogenicidad (21).

La capsaicina, con fórmula $C_{18}H_{27}NO_3$ y masa molar aproximada de $305,4 \text{ g mol}^{-1}$, exhibe alta lipofilia, $\log P$ elevado y solubilidad acuosa baja a pH fisiológico. Su pK_a fenólica en torno a 9 a 10 sugiere que permanece mayoritariamente no ionizada en medios neutros, favoreciendo la inserción en bicapas lipídicas. En bacterias Gram positivas, la ausencia de membrana externa expone directamente la membrana citoplasmática a compuestos anfifílicos, lo que amplifica el potencial de desorganización del empaquetamiento lipídico, la alteración del potencial de membrana y la disipación del gradiente de protones. La consecuencia bioenergética es una disminución de la fuerza protón motriz indispensable para la F_1F_0 ATPasa, con pérdida de la capacidad de eflujo de protones y colapso del pH citosólico en entornos ácidos. A nivel de biofilm, la alteración de membrana puede reducir la secreción y la funcionalidad de glicosiltransferasas y comprometer la cohesión de la matriz, disminuyendo la retención de ácidos y la persistencia de microambientes desmineralizantes. La actividad antioxidante o prooxidante contextual de capsaicina y su posible interferencia con señales peptídicas de quorum también han sido planteadas como mecanismos contributivos, aunque su confirmación requiere mediciones dirigidas de expresión génica y de estados redox en *S. mutans* (29).

La determinación de la concentración mínima inhibitoria mediante microdilución en placa define el umbral de inhibición visible bajo condiciones estandarizadas y es un pilar para cuantificar potencia. El procedimiento habitual emplea microplacas de 96 pozos de fondo plano óptico con volúmenes finales por pozo entre 150 y 200 microlitros. Se utiliza caldo cerebro corazón o tripticasa soya suplementada con extracto de levadura e incubación a 37 grados Celsius con 5 por ciento de CO_2 para reproducir condiciones de crecimiento de estreptococos orales. El inóculo se ajusta a una densidad equivalente a 0,5 McFarland, aproximadamente $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colonia por mililitro, y se diluye hasta obtener un inóculo final de alrededor de 5×10^5 unidades formadoras de colonia por mililitro en cada pozo. La capsaicina, por su baja solubilidad, se solubiliza previamente en un vehículo orgánico como etanol o dimetilsulfóxido y se prepara una serie de diluciones geométricas, cuidando que la concentración final del solvente no exceda típicamente 1 por ciento en volumen para evitar

inhibición inespecífica. Se incluyen controles de crecimiento sin antimicrobiano, controles de solvente al nivel máximo empleado y controles de esterilidad del medio. La lectura espectrofotométrica a 600 nanómetros registra la densidad óptica como medida de turbidez, con corrección de línea base por blanco de medio más solvente. En microplacas, la longitud óptica efectiva depende del volumen, por lo que la aplicación de correcciones de trayectoria basadas en calibraciones con soluciones patrón mejora la comparabilidad intraensayo (30).

El análisis de la relación concentración efecto

Puede representarse mediante un modelo logístico de cuatro parámetros. La respuesta y en porcentaje de inhibición se expresa como y igual a mínimo más la diferencia entre máximo y mínimo dividida por uno más la potencia de la razón entre concentración x y la concentración de semiefecto, elevada al parámetro de pendiente de Hill. En símbolos, $y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / [1 + (x / \text{IC50})^{\text{Hill}}]$. Este ajuste proporciona estimaciones del efecto máximo alcanzable, del efecto residual, de la pendiente de transición y de la IC50, junto con intervalos de confianza al 95 por ciento. La bondad de ajuste se evalúa con criterios de información como AIC y con análisis de residuos. La CMI, al ser un punto discreto de ausencia de crecimiento visible, suele aproximarse al rango de la IC90. La coherencia entre la CMI empírica y el tramo superior de la curva logística respalda la validez del modelo y facilita la traducción de la potencia in vitro a recomendaciones de dosificación en productos tópicos que deberán mantener concentraciones locales por encima de la CMI durante ventanas temporales relevantes(30).

La distinción entre efecto bacteriostático y bactericida se aborda con la concentración bactericida mínima mediante subcultivo en agar sin antimicrobiano. Se considera bactericida la concentración que reduce 3 logaritmos decimales la viabilidad respecto al inóculo, es decir, 99,9 por ciento de reducción, en 24 horas. Para evitar arrastres de compuesto activo al medio sólido, la mezcla se diluye adecuadamente y puede emplearse neutralización si procede. Las curvas tiempo muerte complementan el panorama cinético al medir la caída de unidades formadoras de colonia a tiempos 0, 2, 4, 6 y 24 horas a concentraciones de 1 vez, 2 veces y 4 veces la CMI, permitiendo calcular pendientes de inactivación y detectar efectos posantibióticos. El biofilm plantea un desafío adicional porque las concentraciones requeridas para inhibir crecimiento sétil suelen superar en múltiplos la CMI planctónica. La cuantificación de biomasa por cristal violeta en microplaca, la medición de viabilidad con tinciones diferenciales como LIVE DEAD y la microscopía confocal con marcadores de exopolisacáridos permiten estimar concentraciones mínimas inhibitorias de biofilm y caracterizar cambios en

arquitectura tridimensional. La determinación de exopolisacáridos insolubles y solubles por métodos colorimétricos basados en antrona o fenol sulfúrico, así como la digestión con dextranasa para diferenciar fracciones, añade resolución sobre el impacto de capsaicina en la matriz. En paralelo, la cuantificación de carga de *S. mutans* por qPCR dirigida a genes específicos y la medición de expresión de *gtfB* y *gtfC* por RT qPCR informan sobre efectos transcripcionales (30).

La evaluación de sinergias y antagonismos con agentes odontológicos establecidos se realiza con el índice de concentración inhibitoria fraccionada en tablero de damero. La fracción inhibitoria de cada compuesto se calcula como la concentración en combinación dividida por la CMI individual y el índice suma ambas fracciones. Un índice menor o igual a 0,5 sugiere sinergia, entre 0,5 y 1 aditividad, entre 1 y 4 indiferencia y mayor a 4 antagonismo. La base biológica de una posible sinergia entre capsaicina y fluoruros incluye la inhibición de enolasa por fluoruro y la formación de ácido fluorhídrico a pH bajo que penetra bacterias, sumado a la desestabilización de membrana por capsaicina que podría facilitar el acceso y potenciar la interferencia en la glucólisis. Con clorhexidina, la interacción podría ser complementaria, ya que la clorhexidina altera la permeabilidad y precipita citoplasma, mientras que la capsaicina contribuiría al colapso de la fuerza protón motriz, aunque deben excluirse antagonismos mediados por interacciones fisicoquímicas en la formulación (29).

La robustez experimental de las determinaciones de CMI exige planificación estadística y control de variabilidad. La variabilidad intraensayo se mitiga con triplicados técnicos por concentración y la variabilidad interensayo con al menos tres réplicas biológicas en días diferentes, totalizando un mínimo razonable de 36 observaciones en una serie de cuatro concentraciones más controles. La precisión aceptable de una CMI se considera generalmente dentro de una dilución doble entre repeticiones. Para comparar efectos entre formulaciones o condiciones, el cálculo de tamaño muestral puede basarse en análisis de varianza de medidas repetidas con asunciones de tamaño de efecto moderado, alfa 0,05 y potencia 0,8, lo que típicamente demanda tres a cinco repeticiones biológicas por condición dependiendo de la varianza observada. El reporte debe incluir medias, desviaciones estándar, intervalos de confianza y valores *p* ajustados si existen comparaciones múltiples. La traslación farmacotécnica desde la CMI al diseño de producto requiere integrar parámetros de solubilidad, permeación y residencia. Enjuagues con matrices hidroalcohólicas ofrecen cobertura amplia pero tiempos de residencia cortos de segundos a pocos minutos, por lo que necesitan

concentraciones libres suficientemente altas para superar la CMI durante el lapso de exposición. Geles mucoadhesivos formulados con polímeros como hidroxipropilmetilcelulosa o carbómeros aumentan la viscosidad, prolongan el contacto y permiten liberar capsaicina de manera controlada, lo que puede reducir la concentración pico necesaria. Barnices dentales con resinas hidrófobas o matrices a base de colofonia generan películas persistentes de horas a días que podrían mantener niveles supra CMI en interfases de alto riesgo como fosas y fisuras, aunque requieren validar uniformidad de película, liberación y compatibilidad con otros agentes como fluoruro. La microencapsulación o nanoencapsulación en portadores biocompatibles, incluidas ciclodextrinas, puede aumentar solubilidad aparente, modular pungencia y mejorar estabilidad frente a oxidación y luz. La seguridad y aceptabilidad clínica son condicionantes de éxito. La capsaicina activa TRPV1 en mucosa oral provocando sensación de ardor dependiente de concentración y tiempo de contacto. La determinación de concentraciones no citotóxicas en modelos celulares de mucosa oral mediante ensayos MTT, resazurina y liberación de LDH, junto con pruebas de integridad de barrera y marcadores de inflamación como IL 6 y IL 8, establece márgenes de seguridad respecto de la CMI. Estudios de aceptabilidad sensorial con escalas análogas visuales y pruebas triangulares ayudan a fijar límites superiores de concentración en formulación final. La evaluación de tinción o alteraciones del gusto y del olfato es pertinente en enjuagues de uso crónico (29) (31).

El contexto metodológico se completa con controles de calidad microbiológica y trazabilidad. La cepa *S. mutans* ATCC 25175 debe mantenerse en condiciones que eviten deriva fenotípica, con pasajes limitados y criopreservación a temperaturas de ultrabaja. La pureza se verifica por morfología en agar selectivo y tinción de Gram. La estandarización del inóculo con correlaciones entre densidad óptica y recuentos viables específicas del medio empleado evita errores sistemáticos. La calibración del lector de microplacas y la verificación de linealidad de absorbancia en el rango de interés previenen saturación óptica. La documentación de lote de medios, solventes y controles de referencia como bacitracina proporciona trazabilidad y permite interpretar desviaciones(31).

El transporte y reacción de solutos dentro del biofilm cariogénico puede modelarse mediante ecuaciones de difusión con consumo de primer orden acopladas a condiciones de frontera que representan el intercambio saliva biofilm. En su forma simplificada, la dinámica de una especie S con coeficiente de difusión efectivo D_e y constante de consumo k en una lámina homogénea de espesor L se describe por la ecuación de Fick de segundo orden con término reactivo, d^2S/dx^2

– $(k/De) S = 0$, con fronteras en la interfase esmalte biofilm y biofilm saliva. La relación adimensional entre velocidad de reacción y difusión queda capturada por el número de Damköhler, $Da = k L^2/De$. Valores de Da mayores que 1 implican régimen controlado por difusión con fuertes gradientes intrabiofilm, mientras que Da menores que 1 indican control cinético con perfiles más uniformes. Para ácidos orgánicos de bajo peso molecular, De típicamente cae en el rango de 10^{-6} a 10^{-7} $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ dentro de matrices densas, una reducción respecto del medio acuoso que prolonga la permanencia de protones y de lactato en proximidad de la superficie dental. En paralelo, la capacidad tampón local se reduce por la exclusión parcial de bicarbonato y aminos salivales debido a la porosidad efectiva y al efecto Donnan de cargas fijas en la matriz, lo que favorece microambientes con pH estabilizado entre 4,5 y 5,0 aún cuando el pH salival global se mantenga en 6,5 a 7,0 (31).

La termodinámica de la desmineralización se expresa por el índice de saturación $SI = \log_{10}(IAP/K_{sp})$, donde IAP es el producto iónico de Ca^{2+} , PO_4^{3-} y OH^- en el fluido de placa, y K_{sp} es la constante de solubilidad de la hidroxiapatita. Cuando SI es negativo, el sistema está subsaturado y la disolución mineral es termodinámicamente favorable; cuando es positivo, predomina la remineralización. La presencia de fluoruro sustituye hidroxilos para formar fluorapatita, desplazando el pH crítico de la disolución desde aproximadamente 5,5 a valores más bajos cercanos a 4,5 por la menor solubilidad del cristal fluorado. La cinética de pérdida de mineral depende de la distancia del sistema al equilibrio y de la superficie efectiva expuesta, variables que a su vez están moduladas por la arquitectura del biofilm. La intervención sobre la matriz de exopolisacáridos que sintetiza *Streptococcus mutans* altera no solo la mecánica del biofilm, sino también su microquímica, al modificar coeficientes de difusión y tiempos de residencia que definen las trayectorias de pH (32).

La química estructural de la capsaicina, 8 metil N vanillil 6 nonenamida con fórmula $\text{C}_{18}\text{H}_{27}\text{NO}_3$ y masa molar en torno a $305,4 \text{ g mol}^{-1}$, determina su comportamiento en medios acuosos y biológicos. Su elevado $\log P$ la clasifica como molécula lipofílica con baja solubilidad en agua a pH fisiológico, y su pK_a fenólica alta hace que permanezca mayoritariamente no ionizada en rangos de pH de 6 a 7. Estas propiedades facilitan la partición en bicapas lipídicas de bacterias Gram positivas y apoyan un mecanismo primario de disrupción de membrana con colapso de la fuerza protón motriz. A escala molecular, la inserción del esqueleto hidrofóbico perturba el empaquetamiento de ácidos grasos, mientras que el núcleo vanililo forma interacciones de hidrógeno transitorias con cabezas polares, lo que aumenta la conductancia

iónica de la membrana, disminuye el potencial de membrana y compromete la actividad de la F1F0 ATPasa responsable del eflujo de protones. En *S. mutans*, cuyo mantenimiento de pH intracelular en ambientes ácidos depende críticamente de esa ATPasa y de una membrana con baja permeabilidad a protones, la pérdida de gradiente protonmotriz reduce la velocidad de glucólisis efectiva, atenúa la producción de lactato y obstaculiza la síntesis y exportación de glicosiltransferasas implicadas en la formación de glucanos insolubles, debilitando la cohesión de la matriz del biofilm (32).

El paso de un parámetro *in vitro* como la concentración mínima inhibitoria a un diseño de producto exige comprender la farmacocinética superficial en la cavidad oral, un compartimento dominado por la “aclaramiento salival”. El flujo de saliva en reposo se sitúa típicamente alrededor de 0,3 a 0,4 ml min⁻¹ y puede elevarse a 1,0 a 3,0 ml min⁻¹ con estimulación; su capacidad tampón, determinada por bicarbonato, fosfatos y proteínas, suele caer en rangos de 3 a 10 mmol L⁻¹ por unidad de pH. Estas magnitudes imponen semividas de eliminación cortas para compuestos solubles y obligan a considerar plataformas mucoadhesivas o depósitos sólidos para sostener concentraciones locales por encima de la CMI durante las ventanas posprandiales en las que el pH de placa desciende por debajo del umbral crítico. La selección de plataforma condiciona el perfil temporal de exposición: enjuagues producen picos breves de segundos a pocos minutos, geles mucoadhesivos extienden la residencia a decenas de minutos y barnices dentales pueden generar mantos poliméricos con liberación de horas a días. En todos los casos, el objetivo operativo es que la concentración no disociada libre, responsable de la interacción con membrana, se mantenga por encima de la CMI durante la fracción del ciclo diario en que la comunidad microbiana expresa su máxima acidogenicidad (33).

Los modelos de liberación de fármacos en matrices poliméricas aportan marcos cuantitativos para diseñar estas plataformas. En sistemas dominados por difusión con carga inicial homogénea, el modelo de Higuchi predice una relación $M_t = kH t^{1/2}$ entre la masa liberada y el tiempo, con kH dependiente de la solubilidad del fármaco en la matriz, su difusividad y el gradiente de concentración. Cuando la liberación está gobernada por mecanismos no Fickianos o por relajación de la red polimérica, el modelo de Korsmeyer Peppas describe la cinética con $M_t/M_\infty = kKP t^n$, donde n informa el mecanismo predominante, próximo a 0,5 para difusión Fickiana en geometrías planas y mayor a 0,5 cuando hay contribuciones de relajación o erosión. Aplicado a capsaicina, una molécula altamente lipofílica, la incorporación en matrices hidrofóbicas puede ralentizar en exceso la liberación, mientras que la complejación con

ciclodextrinas o la nanoencapsulación en portadores anfífilos aumenta la solubilidad aparente y permite perfiles de liberación controlados. La encapsulación en β ciclodextrina o derivados hidroxipropilados forma inclusiones huésped invitado que estabilizan el núcleo hidrofóbico, incrementan la solubilidad en agua y reducen la pungencia al disminuir la fracción libre inmediatamente disponible para activar TRPV1 en mucosa (33).

La compatibilidad fisicoquímica con agentes odontológicos de referencia es un eje del desarrollo. La clorhexidina, biguanida dicatiónica, se adsorbe con alta afinidad a superficies aniónicas y precipita citoplasma bacteriano, pero también interacciona con excipientes aniónicos y tensioactivos como lauril sulfato, por lo que formular capsaicina junto a clorhexidina exige matrices y pH que eviten precipitación o pérdida de potencia. Los fluoruros, por su parte, ejercen su efecto anticaries inhibiendo enolasa y formando HF a pH bajo, que atraviesa membrana y libera protones en el citosol. La hipótesis de sinergia con capsaicina se apoya en que la desorganización de membrana por capsaicina podría facilitar el ingreso de HF y potenciar la interrupción de la glucólisis en *S. mutans*, siempre que la formulación no promueva complejos inactivos ni cree microambientes donde el fluoruro pierda actividad. La evaluación de interacciones se sustenta en ensayos en tablero de damero que calculan el índice de concentración inhibitoria fraccionada; índices menores o iguales a 0,5 son indicativos de sinergia y permiten reducir dosis totales para preservar seguridad organoléptica, un objetivo central cuando se trabaja con un ligando pungente como la capsaicina. Las mediciones dirigidas al biofilm permiten conectar mecanismo con efecto funcional. La cuantificación de biomasa por cristal violeta ofrece una primera aproximación a cambios globales, pero la microscopía confocal de barrido láser con marcadores de viabilidad y sondas de pH sensibles como C SNARF 4F añade resolución espacial al mostrar microdominios de acidez y la distribución de células viables dentro de la matriz. Microelectrodos de vidrio con puntas de 10 a 50 micrómetros situados a diferentes profundidades registran perfiles de pH con precisión temporal, revelando el impacto de capsaicina en la profundidad y duración de las caídas de pH tras pulsos de sacarosa. El análisis bioquímico de exopolisacáridos insolubles y solubles mediante métodos colorimétricos con fenol sulfúrico o antrona, normalizados por proteína o por área de biofilm, cuantifica el efecto sobre la producción de matriz y, en combinación con digestiones enzimáticas con dextranasa, discrimina la fracción de glucanos α 1,3 responsables de la insolubilidad. A nivel genético, la RT qPCR dirigida a *gtfB* y *gtfC*, a adhesinas como *spaP* y a reguladores como *vicR* y *comE* permite demostrar si la inhibición observada proviene solo de efectos de membrana o si hay modulación transcripcional (34).

El diseño de una vía de desarrollo preclínico y clínica

Parte de los parámetros in vitro para dimensionar dosis tópicas y frecuencias de uso plausibles en condiciones reales. En estudios exploratorios in vivo, el uso de desenlaces intermedios como carga de *S. mutans* por qPCR en placa y saliva, tasa de síntesis de exopolisacáridos, pH mínimo y área bajo la curva de pH posprandial ofrece sensibilidad antes de evaluar desenlaces duros como incrementos de superficies cariadas, perdidas y obturadas medidos por índices DMFT o ICDAS en periodos de 6 a 24 meses. La planificación estadística debe contemplar la variabilidad biológica del ecosistema oral, altamente influida por dieta, flujo salival y hábitos de higiene, de modo que diseños aleatorizados por conglomerados en escuelas o centros comunitarios con enjuagues o geles estandarizados permiten controlar contaminación cruzada y optimizar potencia. Los criterios de inclusión deberían especificar niveles basales de *S. mutans*, capacidad tampón salival y hábitos dietarios, con análisis de subgrupos por riesgo cariogénico (35).

La seguridad biológica y la aceptabilidad sensorial condicionan la factibilidad clínica. La activación de TRPV1 por capsaicina en mucosa oral produce sensación de ardor dependiente de concentración y tiempo de contacto, un factor que puede comprometer adherencia si no se modula mediante tecnología de formulación. Ensayos de citotoxicidad en cultivos de fibroblastos gingivales y queratinocitos orales con MTT o resazurina, pruebas de integridad de membrana por liberación de LDH y cuantificación de mediadores inflamatorios como IL 6 e IL 8 establecen niveles no citotóxicos y márgenes de seguridad sobre la CMI. La evaluación organoléptica con escalas análogas visuales y pruebas de preferencia comparativa entre formulaciones con diferente carga de capsaicina o diferente grado de complejación con ciclodextrinas define los límites superiores de concentración en los que el balance eficacia tolerabilidad es aceptable (34).

La calidad metodológica del ensayo de susceptibilidad con capsaicina exige controles metrológicos. La estandarización del inóculo a partir de una densidad óptica calibrada contra recuentos viables específicos del medio empleado evita errores sistemáticos; una densidad aproximada de 0,5 McFarland, equivalente a $1,5 \times 10^8$ UFC ml⁻¹, diluida al inóculo objetivo de 5×10^5 UFC ml⁻¹ en el pozo, es una práctica ampliamente utilizada para comparabilidad. La validación del lector de microplacas debe incluir curvas de linealidad de absorbancia en el rango operativo y corrección de trayectoria óptica basada en el volumen del pozo para reducir variabilidad. Deben emplearse soluciones madre de capsaicina con trazabilidad de pureza y

estabilidad, protegidas de luz y calor para evitar degradación, y controles de solvente a la concentración máxima usada en prueba para descartar inhibición inespecífica. Un control positivo con bacitracina u otro estándar contextualiza la potencia relativa y ofrece un punto de referencia para la variación interensayo (34).

La perspectiva de resistencia bacteriana a compuestos no antibióticos clásicos como capsaicina es diferente a la de antibióticos dirigidos a blancos enzimáticos únicos. Dado que el mecanismo primario es físico químico a nivel de membrana, la probabilidad de selección de mutaciones puntuales que confieran altos niveles de resistencia es menor que en fármacos dirigidos a blancos de alta especificidad; no obstante, cambios en composición lipídica, en densidad de ácidos grasos de cadena larga o en la expresión de bombas de eflujo pueden modular sensibilidad. Estudios evolutivos in vitro con pases seriados en concentraciones subinhibitorias durante decenas de generaciones, acompañados de medición de CMI seriadas, permiten caracterizar la estabilidad del fenotipo de susceptibilidad y anticipar requerimientos de combinaciones o rotaciones con otros agentes (33).

1.5.2. Antecedentes Investigativos

título: Antibacterial activity of *Capsicum annum* extract and synthetic capsaicinoid derivatives against *Streptococcus mutans*.

Autores: Santos M.M.P.; Vieira-da-Motta O.; Vieira I.J.C.; Braz-Filho R.; Gonçalves P.S.; Maria E.J.; Terra W.S.; Rodrigues R.; Melo Souza C.L.

DOI: 10.1007/s11418-011-0579-x.

Resumen: Estudio primario que comparó la potencia antimicrobiana de capsaicina y dihidrocapsaicina puras, cuatro análogos capsaicinoides sintéticos y un extracto en acetato de etilo de *Capsicum annum* frente a *Streptococcus mutans*, estableciendo valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) con resolución a microgramos por mililitro para compuestos purificados. La investigación demostró que las moléculas puras son entre mil y dos mil veces más potentes que el extracto crudo, subrayando el peso de la lipofilia y la pureza estructural en la interacción con la membrana Gram positiva. Este trabajo sentó un rango de referencia de CMI para *S. mutans* entre 1,25 y 5,0 $\mu\text{g/mL}$ para capsaicinoides definidos,

parámetro crítico para dimensionar dosis tópicas y modelar exposiciones supra-CMI en formulaciones odontológicas.

Metodología: Ensayo in vitro de susceptibilidad con microdilución seriada frente a *S. mutans*, comparando un extracto en acetato de etilo de *C. annuum* con capsaicina (1) y dihidrocapsaicina (2) aisladas y cuatro análogos (3–6) con variaciones en la cadena acilo y el núcleo fenólico vanililo. Las CMI se definieron como la menor concentración sin crecimiento visible al término de la incubación estandarizada, siguiendo el principio CLSI para microplacas de 96 pozos con controles de crecimiento y de solvente. La lectura de inhibición se realizó contra el control de crecimiento, expresando la CMI por entidad química e indicando diferencias de orden de magnitud entre extracto crudo y compuestos purificados.

Resultados: El extracto en acetato de etilo de *C. annuum* mostró CMI de 2,5 mg/mL contra *S. mutans*, mientras que los principios activos purificados capsaicina y dihidrocapsaicina alcanzaron CMI de 1,25 µg/mL; el análogo N-(4-hidroxifeniletil)decamida presentó CMI de 5,0 µg/mL y tres análogos vanililo-terpenoides evidenciaron CMI de 2,5 µg/mL. La relación extracto:compuesto puro evidenció una diferencia de 10^3 en potencia, coherente con un mecanismo dominado por interacción físico-química con membrana donde la fracción libre lipofílica y la pureza aumentan la afinidad y la capacidad de perturbar el gradiente protón-motriz. Estos valores establecen el piso técnico para estimar IC50 logísticos y umbrales operativos de inhibición del 90% en diseños posteriores.

Conclusión: Capsaicina y dihidrocapsaicina exhiben actividad anti-*S. mutans* en el rango bajo de µg/mL, marcadamente superior a extractos crudos, lo que respalda su consideración como principios activos candidatos en enjuagues, geles o barnices dentales y proporciona anclas numéricas sólidas para el cálculo de dosis suprainhedoras y la proyección de eficacia en biofilm (31).

título: Capsaicin Shows Species and Strain-specific Activity: Investigation of the Antibacterial Effects on the Oral Pathogen *Streptococcus mutans* and the Oral Probiotics *Streptococcus salivarius* M18 and K12.

Autores: Doğan K.; Tunçer S.

DOI: 10.15671/hjbc.1337284.

Resumen: Estudio comparativo que exploró la especificidad especie-cepa de la capsaicina en el microbioma oral, evaluando simultáneamente al patógeno cariogénico *Streptococcus mutans* y a dos probióticos orales *Streptococcus salivarius* M18 y K12. A diferencia de reportes previos con CMI en decenas de $\mu\text{g}/\text{mL}$ para *S. mutans*, los autores describen ausencia de inhibición del crecimiento de *S. mutans* incluso a concentraciones elevadas, inhibición del probiótico *S. salivarius* M18 solo por encima de $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ y nula inhibición de *S. salivarius* K12 aun a $2 \text{ mg}/\text{mL}$, evidenciando que la respuesta a capsaicina es heterogénea y dependiente de determinantes de membrana propios de cada cepa. Este hallazgo matiza la aplicabilidad clínica y plantea la necesidad de perfilar sensibilidad por cepa para evitar efectos no deseados en probióticos comensales.

Metodología: Ensayo de susceptibilidad *in vitro* con gradientes crecientes de capsaicina, comparando el fenotipo de crecimiento de *S. mutans*, *S. salivarius* M18 y *S. salivarius* K12 bajo condiciones estandarizadas de cultivo, con determinación de puntos de no crecimiento visible y verificación de ausencia de efecto a concentraciones altas en cepas resilientes. Se establecieron umbrales operativos de inhibición por especie-cepa, documentando que M18 es sensible a $>100 \mu\text{g}/\text{mL}$, K12 es resistente hasta $2 \text{ mg}/\text{mL}$ y *S. mutans* no muestra inhibición en el rango evaluado, lo que sugiere diferencias en composición lipídica o sistemas de eflujo que modulan la interacción anfifílica de capsaicina con la membrana.

Resultados: No se observó inhibición de crecimiento de *S. mutans* en el rango de concentraciones ensayado; *S. salivarius* M18 presentó inhibición solo por encima de $100 \mu\text{g}/\text{mL}$, mientras que *S. salivarius* K12 mantuvo crecimiento incluso a $2 \text{ mg}/\text{mL}$. Este perfil diferencial confirma actividad especie- y cepa-dependiente y advierte que, en ausencia de caracterización previa, la capsaicina podría impactar selectivamente a probióticos beneficiosos sin afectar a ciertas variantes de *S. mutans*. La disparidad con estudios que reportan CMI de $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ para *S. mutans* sugiere influencia de condiciones experimentales, cepas, solventes y matrices de ensayo, y refuerza la pertinencia de validar CMI con la cepa objetivo del laboratorio antes de extrapolar.

Conclusión: La capsaicina exhibe una ventana de actividad antibacteriana altamente condicionada por la especie y la cepa, con ausencia de inhibición de *S. mutans* en este estudio pese a la sensibilidad de *S. salivarius* M18 a $>100 \mu\text{g}/\text{mL}$ y resistencia de K12 hasta $2 \text{ mg}/\text{mL}$.

Estos datos obligan a perfilar sensibilidad y a diseñar formulaciones que prioricen eficacia contra la cepa clínica diana minimizando el impacto sobre probióticos orales, aportando un contrapunto crítico a los antecedentes que informan CMI bajas para *S. mutans* (32).

título: *Antibacterial Activity of Capsaicin against Sectional Cariogenic Bacteria.*

Autores: Hao Gu; Zhi Yang; Weiqiang Yu; Kan Xu; Yuan-fei Fu.

DOI: 10.17582/journal.pjz/2019.51.2.681.687.

Resumen: Estudio in vitro que caracteriza con detalle la actividad de la capsaicina sobre cuatro bacterias cariogénicas representativas, incluyendo *Streptococcus mutans*, con énfasis cuantitativo en concentración mínima inhibitoria (MIC), acidogénesis temprana y biomasa/arquitectura de biopelícula. En *S. mutans* se documenta una MIC de 50 µg/mL y una atenuación significativa del descenso de pH durante las primeras 12 horas de cultivo, acompañado de reducción sustancial de biomasa y de exopolisacáridos, integrando lectura espectrofotométrica y microscopía confocal. Estos resultados establecen umbrales operativos de inhibición útiles para dimensionar formulaciones tópicas supra-MIC en contextos odontológicos.

Metodología: Ensayo de susceptibilidad con aislados clínicos cultivados en BHI bajo anaerobiosis controlada (80% N₂, 10% CO₂, 10% H₂) a 37 °C; inóculo estandarizado a 0,5 McFarland (~10⁸ UFC/mL) y determinación de MIC por microdilución. La acidogénesis se siguió durante 12 h en medio 95% BHI + 5% etanol (vehículo de solubilización), comparando curvas de pH entre control y capsaicina; la biopelícula se cuantificó por cristal violeta a 595 nm y se visualizó por CLSM usando SYTO9 (viabilidad) y Alexa Fluor 647 (EPS), con análisis de área relativa EPS/bacterias como métrica de arquitectura de matriz. El artículo reporta además valores de MIC para *Actinomyces viscosus*, *Lactobacillus* y *Streptococcus sanguis*, permitiendo un análisis comparativo especie-específico.

Resultados: Para *S. mutans* la MIC fue 50 µg/mL; la curva de pH en el grupo con capsaicina mostró una pendiente más plana, de 7,09 a 6,91 en 12 h, frente al control que cayó casi hasta pH 6, evidenciando inhibición de la producción ácida. La biomasa de biopelícula se redujo de 2,81 ± 1,19 (control, A595) a 1,38 ± 0,38 (capsaicina), $p < 0,05$; el cociente de áreas EPS/bacterias descendió de 1,200 ± 0,099 a 0,745 ± 0,060, confirmando desestructuración de la matriz. Se obtuvieron MIC de 50 µg/mL para *A. viscosus* y *Lactobacillus*, y de 25 µg/mL

para *S. sanguis*, con reducciones concordantes de biomasa y de acidogénesis en estas especies. El artículo registra DOI y metadatos completos en la propia página de la revista.

Conclusión: La capsaicina ejerce una inhibición cuantificable sobre *S. mutans* con MIC en el orden de 50 µg/mL y efectos paralelos en acidogénesis y biopelícula, aportando parámetros duros (MIC, ΔpH, A595, relación EPS/bacterias) que sustentan su desarrollo como agente tópico anti-biofilm; los datos multiespecie sugieren, además, un margen para la selección de combinaciones o formulaciones que optimicen la cobertura frente a comunidades mixtas del biofilm cariogénico (34).

título: Antibacterial activity of *Capsicum annum* extract and synthetic capsaicinoid derivatives against *Streptococcus mutans*.

Autores: Moema M. P. Santos; Olney Vieira-da-Motta; Ivo J. C. Vieira; Raimundo Braz-Filho; Paula S. Gonçalves; Edmilsom J. Maria; Wagner S. Terra; Rosana Rodrigues; Claudio L. M. Souza.

DOI: 10.1007/s11418-011-0579-x.

Resumen: Trabajo clave que cuantifica la potencia anti-*S. mutans* de capsaicina y dihidrocapsaicina puras frente a un extracto en acetato de etilo de *Capsicum annum* y cuatro análogos sintéticos, estableciendo un rango de MIC de microgramos por mililitro para moléculas definidas y de miligramos por mililitro para el extracto crudo. La diferencia de tres órdenes de magnitud entre extracto y compuestos puros revela el peso de la pureza estructural y de la lipofilia sobre la interacción con la membrana Gram positiva, ofreciendo un ancla numérica robusta para calibrar dosis en formulación. Metodología: Determinación de MIC por microdilución en placa con diluciones geométricas de capsaicina, dihidrocapsaicina y análogos N-(4-hidroxifeniletíl)decamida y vanililo-terpenoides, frente a *S. mutans*. Se reportan controles de crecimiento, solvente y esterilidad, y se expresa la MIC como la menor concentración sin crecimiento visible tras incubación estándar. La publicación en *J Nat Med* incluye en el resumen los valores de MIC por entidad química, permitiendo comparabilidad directa entre familias capsaicinoides.

Resultados: MIC del extracto en acetato de etilo = 2,5 mg/mL; MIC de capsaicina = 1,25 µg/mL; MIC de dihidrocapsaicina = 1,25 µg/mL; MIC del análogo N-(4-hidroxifeniletíl)decamida = 5,0 µg/mL; MIC de tres análogos vanililo-terpenoides = 2,5 µg/mL.

La escala extracto versus principio activo demuestra que la fracción libre lipofílica y la uniformidad estructural correlacionan con mayor potencia inhibitoria, coherente con un mecanismo físico-químico de disrupción de membrana que no requiere blanco enzimático único.

Conclusión: Los capsaicinoides purificados muestran actividad anti-*S. mutans* en el rango 1,25–5,0 µg/mL, muy superior al extracto crudo, y constituyen candidatos tecnológicamente viables para plataformas odontológicas; estos datos, al enlazar estructura-actividad con MIC cuantitativa, facilitan la selección de dosis supra-MIC y la priorización de análogos en etapas posteriores de I+D (35).

título: **Unlocking the potential of capsaicin in oral health (Review).**

Autores: Winny Yohana; Anggun Rafisa.

DOI: 10.3892/br.2024.1841.

Resumen: Revisión narrativa que integra evidencia preclínica y clínica sobre capsaicina en salud oral, con énfasis en su perfil analgésico, antiinflamatorio, antineoplásico y antimicrobiano. En el dominio antimicrobiano consolida datos duros frente a patógenos orales: reporta MIC para *Streptococcus mutans*, *Actinomyces viscosus* y *Lactobacillus* de 50 µg/mL y para *Streptococcus sanguis* de 25 µg/mL, y contextualiza resultados divergentes al citar trabajos donde *S. mutans* no fue inhibido y, en cambio, se afectó el probiótico *Streptococcus salivarius* M18 por encima de 100 µg/mL. La revisión discute condicionantes metodológicos (cepa, solvente, matriz, forma química) y destaca la necesidad de estandarizar protocolos antes de la traslación clínica.

Metodología: Búsqueda y síntesis crítica de literatura con extracción de parámetros cuantitativos (MIC/CBM, métricas de biopelícula y acidogénesis), análisis de mecanismos propuestos (disrupción de membrana, modulación de virulencia), y triangulación de evidencia que va desde microbiología clásica (microdilución en placa) hasta microscopía confocal y ensayos de pH de placa. La revisión integra además datos de uso tópico en condiciones orales dolorosas para discutir ventanas de dosificación y tolerabilidad, identificando brechas para ensayos humanos controlados en el ámbito anti-*S. mutans*.

Resultados: Consolidación de rangos MIC específicos por especie oral, con valores de 50 $\mu\text{g/mL}$ para *S. mutans* y 25 $\mu\text{g/mL}$ para *S. sanguis*; síntesis de efectos sobre biofilm y producción ácida; documentación de discrepancias especie-/cepa-dependientes y del impacto del vehículo de solubilización. En paralelo, compendia datos clínicos de capsaicina tópica en síndrome de boca ardiente con concentraciones entre 0,01% y 0,25% para discutir seguridad y adherencia, aportando insumos para dimensionar formulaciones odontológicas que superen in situ la MIC durante ventanas posprandiales.

Conclusión: La evidencia compilada indica que capsaicina posee actividad anti-*S. mutans* cuantificable y efectos anti-biofilm, pero existen heterogeneidades atribuibles a cepa, solvente y diseño experimental; la estandarización metodológica y los estudios in vivo son pasos críticos para traducir una MIC de 25–50 $\mu\text{g/mL}$ en productos tópicos con eficacia y tolerabilidad verificadas (36).

título: Antibacterial properties of capsaicin and its derivatives and their potential to fight antibiotic resistance - A literature survey.

Autores: Samuel Füchtbauer; Sara Mousavi; Josep Bassas-Galià; et al. DOI: 10.1556/1886.2021.00003.

Resumen: Revisión de alcance que sistematiza la acción antibacteriana de capsaicina y análogos en Gram positivos y Gram negativos, con énfasis en parámetros cuantitativos de potencia (MIC/CBM), efectos en biopelículas y fenómenos de sinergia y modulación de resistencia. Presenta datos de reducción de biopelícula del 50% y 90% a 16 y 32 mg/L, respectivamente, en modelos bacterianos, y compila evidencia de que capsaicina puede actuar como inhibidor de bombas de eflujo, atenuar factores de virulencia y ejercer efectos bactericidas por disrupción de membrana, un mecanismo menos propenso a resistencias puntuales enzimáticas. Aunque no es específica de *S. mutans*, ofrece un marco mecanístico y cuantitativo directamente extrapolable a estreptococos orales por similitudes de envoltura Gram positiva.

Metodología: Levantamiento bibliográfico estructurado en bases indexadas con selección de estudios primarios de MIC/CBM, ensayos de biopelícula, curvas tiempo-muerte y pruebas de sinergia (índice FIC) con antibióticos; integración de resultados de microscopía, ensayos de permeabilidad y potenciometría para vincular efectos biofísicos en membrana con desenlaces

microbiológicos. El artículo triangula datos de diferentes matrices de formulación y vehículos de solubilización, resaltando el rol del solvente en la potencia aparente y la necesidad de controles de vehículo en microdilución.

Resultados: Síntesis de MIC en rangos de $\mu\text{g/mL}$ a mg/L según especie y matriz; demostración de reducciones de biomasa de biopelícula del 50% y 90% a 16 y 32 mg/L ; evidencia de CBM próximas a MIC en Gram positivos, consistente con un mecanismo membranal; reportes de sinergia con antibióticos (disminuciones de 2–4 diluciones de MIC en combinaciones) y de inhibición de bombas de eflujo que restaura sensibilidad a fármacos. Estos hallazgos, sumados a la lipofilia y al logP elevado de capsaicina, fundamentan su uso como principio activo o coadyuvante en sistemas tópicos donde la exposición local puede sostenerse por encima de MIC.

Conclusión: La literatura consolidada respalda a capsaicina como antimicrobiano multifacético capaz de reducir viabilidad y biopelícula a concentraciones en el orden de decenas de $\mu\text{g/mL}$ a decenas de mg/L , con mecanismos de membrana y modulación de resistencia que justifican su evaluación frente a *S. mutans*; estos datos sirven de referencia para fijar objetivos de CMI, IC50 y diseño de formulaciones que alcancen y mantengan exposiciones supra-MIC en la cavidad oral (37).

título: Capsaicin inhibits Porphyromonas gingivalis growth, biofilm formation, gingivomucosal inflammatory cytokine secretion, and in vitro osteoclastogenesis.

Autores: Zhou Y.; Guan X.; Zhu W.; Liu Z.; Wang X.; Yu H.; et al.

DOI: 10.1007/s10096-013-1947-0.

Resumen: Estudio in vitro y ex vivo que demostró que la capsaicina inhibe de forma cuantitativa el crecimiento de Porphyromonas gingivalis, reduce la formación de biopelícula en porcentajes dependientes de la dosis y atenúa la respuesta inflamatoria gingival asociada, además de interferir con la osteoclastogénesis in vitro. Se reportaron valores de MIC y MBC en el orden de decenas de $\mu\text{g/mL}$ y reducciones del 50% y 90% de biomasa de biopelícula a 16 y 32 mg/L respectivamente, sustentando un efecto anti-biofilm robusto.

Metodología: Determinación de concentración mínima inhibitoria y bactericida por microdilución frente a *P. gingivalis*, cuantificación de biopelícula mediante ensayos colorimétricos estandarizados y análisis de marcadores inflamatorios gingivales, con evaluación adicional de la osteoclastogénesis in vitro como correlato funcional del proceso periodontitis asociado.

Resultados: MIC = 16 mg/L y MBC = 64 mg/L para *P. gingivalis*; inhibición de biopelícula del 50% a 16 mg/L y del 90% a 32 mg/L; disminución de la activación de NF- κ B p65 e inhibición de la secreción de citocinas gingivales proinflamatorias; supresión de la proliferación de precursores osteoclasticos y de la osteoclastogénesis en condiciones de cultivo.

Conclusión: La capsaicina ejerció un efecto anti-*P. gingivalis* multicapas bacteriostático/bactericida en el rango 16 - 64 mg/L, anti-biofilm y antiinflamatorio que respalda su potencial como coadyuvante tópico periodontal; por analogía mecánica con estreptococos Gram positivos orales, estos datos contextualizan la utilidad de medir CMI/IC50 frente a *S. mutans* para traslación odontológica (38).

título: Biphasic membrane effects of capsaicin, an active component in *Capsicum* species.

Autores: Tsuchiya H.

DOI: 10.1016/S0378-8741(01)00200-8.

Resumen: Trabajo mecanístico clave que caracterizó los efectos bifásicos de la capsaicina sobre bicapas lipídicas modelo y su traducción a fenómenos biológicos, incluyendo actividad antibacteriana. Mostró que, dependiendo de la concentración, la capsaicina aumenta la fluidez de la membrana a niveles bajos-medios y la rigidiza a niveles altos, alterando la organización y la conductancia iónica de la bicapa; este comportamiento explica la disrupción del potencial de membrana, el colapso de la fuerza protón - motriz y, en última instancia, la inhibición del crecimiento bacteriano en Gram positivos como *S. mutans*.

Metodología: Ensayos fisicoquímicos en membranas biomiméticas y vesículas para medir fluidez, anisotropía y microviscosidad, complementados con pruebas funcionales que

relacionaron cambios de fase y empaquetamiento lipídico con desenlaces biológicos como crecimiento bacteriano y agregación celular.

Resultados: Identificación de un perfil dosis-dependiente en el que la capsaicina modula la dinámica de la bicapa de forma no lineal, con transición de aumento de fluidez a rigidificación; correlación entre estas alteraciones y la inhibición de procesos dependientes de integridad y potencial de membrana, aportando fundamento para que MIC/CBM de capsaicina se expliquen por un mecanismo físico-químico de membrana y no por un blanco enzimático único.

Conclusion: La base biofísica de la acción de capsaicina sobre membranas explica su espectro antibacteriano y su menor propensión a generar resistencia por mutaciones puntuales; este antecedente proporciona el sustento mecanístico para interpretar CMI e IC50 frente a *S.* mutans y para diseñar formulaciones que aseguren fracción libre suficiente para perturbar bicapas en condiciones orales (39).

título: Antimicrobial and Anti-Virulence Activity of Capsaicin Against Erythromycin-Resistant, Cell-Invasive Group A Streptococci.

Autores: Emanuela Marini; Gloria Magi; Marina Mingoia; Armanda Pugnaroni; Bruna Facinelli.

DOI: 10.3389/fmicb.2015.01281.

Resumen: Estudio mecanístico que estableció con alta resolución cuantitativa el rango de actividad de la capsaicina frente a estreptococos β -hemolíticos del grupo A (*Streptococcus pyogenes*) clínicos, incluyendo 27 aislados resistentes a macrólidos y 5 susceptibles, y caracterizados por genotipos *erm* y *mef*, *prtF1* positivo e invasividad celular. Se reportaron MIC de 64- 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (moda 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$), MBC iguales o a una dos diluciones de la MIC y efecto bactericida verificado por tinción Live/Dead y curvas tiempo muerte. A concentraciones subinhibitorias se observó una respuesta hormética: incremento de biomasa de biopelícula y adhesión a monocapas A549, pero reducción significativa de la invasión celular y de la hemólisis, lo que perfila a la capsaicina como modulador de virulencia además de antimicrobiano de membrana. El intento de selección de mutantes resistentes en un solo paso

fue negativo, sugiriendo baja propensión al desarrollo de resistencia por blancos multifactoriales de membrana.

Metodología: Panel de 32 aislamientos faríngeos infantiles previamente tipificados por fenotipo/genotipo de resistencia (erm(B) cMLS/iMLS, erm(TR) iMLS, mef(A)/M) y por tipo emm; determinación de MIC/MBC por microdilución; ensayos de integridad de membrana con fluorocromos para viables/no viables; cinética tiempo muerte a múltiplos de la MIC; adhesión e invasión sobre epitelio A549; cuantificación de hemólisis; exclusión explícita de DMSO como vehículo por actividad bactericida intrínseca. Se analizó la relación dosis–respuesta completa para captar efectos sub-MIC y supra-MIC, con verificación estadística de los cambios en biofilm, invasión y hemólisis.

Resultados: MIC 64 - 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con $\text{MBC} \approx \text{MIC}$; muerte celular temprana evidenciada por cambio de fluorescencia en Live/Dead; ausencia de mutantes resistentes en selección de un solo paso; sub-MIC incrementó significativamente biomasa de biofilm y adhesión, a la par que redujo de forma marcada la invasividad y la hemólisis ($p \leq 0,05$), transformando cepas altamente invasivas en no invasivas. Estos hallazgos son coherentes con un mecanismo membranal que colapsa la fuerza protón motriz a altas concentraciones y reprograma fenotipos de virulencia a bajas concentraciones.

Conlucision: La capsaicina es bactericida contra estreptococos Gram positivos del grupo A con MIC en decenas de $\mu\text{g}/\text{mL}$, con baja tendencia a generar resistencia por selección puntual y con un perfil anti-virulencia en sub-MIC; por analogía mecanística con *Streptococcus mutans*, estos datos robustecen la plausibilidad de emplear capsaicina como inhibidor de membrana en odontología y justifican medir CMI/IC50 y CBM en la cepa ATCC 25175 bajo protocolo de microdilución para traslación tópica (40).

título: Capsaicin Shows Species and Strain-specific Activity: Investigation of the Antibacterial Effects on the Oral Pathogen *Streptococcus mutans* and the Oral Probiotics *Streptococcus salivarius* M18 and K12.

Autores: Kader Doğan; Sinem Tunçer Çağlayan.

DOI: 10.15671/hjbc.1337284.

Resumen: Estudio comparativo que abordó de forma directa la especificidad especie/cepa de la capsaicina en el ecosistema oral, evaluando *S. mutans* junto con los probióticos orales *S. salivarius* M18 y K12. Los autores demostraron que, en las condiciones de ensayo y con capsaicina pura, no hubo inhibición del crecimiento de *S. mutans* en el rango experimental, *S. salivarius* M18 sólo fue inhibido a concentraciones superiores a 100 µg/mL y *S. salivarius* K12 no fue inhibido incluso a 2 mg/mL. El artículo discute las implicancias ecológicas de esta selectividad, advirtiendo que la reducción de M18 sin efecto sobre *S. mutans* podría favorecer disbiosis si se extrapola un uso no controlado de capsaicina, y enfatiza la heterogeneidad metodológica de la literatura previa basada en extractos multicomponente versus moléculas puras.

Metodología: Ensayo in vitro con capsaicina pura en gradiente de concentraciones, cultivo estandarizado y lectura de crecimiento visible y densidad óptica, con verificación de ausencia de inhibición de *S. mutans* y determinación de umbrales para *S. salivarius* M18 (>100 µg/mL) y K12 (resistente hasta 2 mg/mL). El trabajo incluye un marco fisiológico sobre TRPV1 y propiedades fisicoquímicas de capsaicina, y sitúa los hallazgos en el eje oral–intestinal, discutiendo que el impacto diferencial sobre probióticos puede alterar la homeostasis microbiana oral y gastrointestinal. La elección de capsaicina pura controló confusores de extractos vegetales (flavonoides, antioxidantes, variabilidad de contenido) y permitió atribuir el efecto a la molécula índice.

Resultados: Crecimiento no inhibido de *S. mutans* en el rango evaluado; inhibición de *S. salivarius* M18 sólo a >100 µg/mL; nula inhibición de *S. salivarius* K12 a 2 mg/mL; discusión mecanística orientada a diferencias de composición lipídica de membrana, presencia de bombas de eflujo y otros determinantes de permeabilidad que modulan la interacción anfifílica de capsaicina. Se subraya que resultados contradictorios en la literatura pueden deberse a cepas distintas, solventes con actividad propia, matrices y diseño experimental, por lo que recomiendan perfilar sensibilidad por cepa objetivo antes de extrapolar.

Conlucision: La actividad antibacteriana de capsaicina es fuertemente especie- y cepa-dependiente; en este estudio no afectó a *S. mutans* mientras que mostró umbrales altos para *S. salivarius* M18 y ausencia de efecto sobre K12, alertando sobre la necesidad de validar CMI en la cepa clínica/ATCC específica y de diseñar formulaciones que preserven probióticos orales; para la tesis, estos datos justifican la determinación de CMI e IC50 en *S. mutans* ATCC 25175 bajo condiciones estrictamente controladas de solvente y vehículo (41).

título: Application of a capsaicin rinse in the treatment of burning mouth syndrome.

Autores: Francisco-Javier Silvestre; Javier Silvestre-Rangil; Carmen Tamarit-Santafé; Daniel Bautista.

DOI: 10.4317/medoral.17219.

Resumen: Ensayo clínico aleatorizado, doble ciego y cruzado que evaluó la eficacia y la tolerabilidad de un enjuague oral de capsaicina al 0,02% en pacientes con síndrome de boca ardiente. De 30 reclutados, 23 completaron el protocolo (edad media $72,65 \pm 12,10$ años; duración de síntomas $5,43 \pm 3,23$ años). La intervención consistió en un enjuague de capsaicina 0,02% versus placebo durante 1 semana, seguido de una semana de lavado y cruce de tratamientos. El desenlace primario fue el dolor quemante medido por escala visual análoga (EVA) en cuatro momentos (mañana y tarde del día 1, mañana y tarde del día 7). Se observaron reducciones estadísticamente significativas de EVA dentro del periodo de tratamiento con capsaicina comparando el valor basal con el final de la semana (AM1 vs AA7 $p = 0,003$; AA1 vs AA7 $p = 0,002$), lo que demuestra efecto analgésico tópico medible en la mucosa oral. Aunque el estudio no fue diseñado para endpoints antimicrobianos, constituye un antecedente crítico para la odontología porque aporta datos reales de exposición local, concentración y aceptabilidad de capsaicina en la cavidad oral, útiles para proyectar formulaciones supra-CMI contra patógenos como *Streptococcus mutans*.

Metodología: Diseño prospectivo, doble ciego, cruzado, con asignación al azar a dos secuencias de tratamiento: grupo A inició con enjuague de capsaicina 0,02% (200 mg/L) durante 7 días y grupo B con placebo durante 7 días; tras un periodo de lavado de 7 días, los grupos cruzaron al tratamiento alterno. La pauta de evaluación incluyó registros EVA en la mañana antes de iniciar el tratamiento (AM1), en la tarde del primer día (AA1), y al final de la semana de intervención por la mañana y por la tarde (AM7 y AA7). El análisis se efectuó por comparación intragrupo de las mediciones EVA, con $p < 0,05$ como umbral de significancia. El esquema de enmascaramiento y el diseño cruzado controlan sesgos interindividuales y maximizan potencia con n moderado, a la vez que aportan evidencia sobre la tolerabilidad de una concentración tópica concreta (0,02%) directamente trasladable a la ingeniería de productos bucales.

Resultados: Siete participantes abandonaron, de modo que 23 completaron el estudio; la media de edad fue $72,65 \pm 12,10$ años y el tiempo medio de evolución de síntomas $5,43 \pm 3,23$ años. Durante la semana con capsaicina 0,02%, la EVA disminuyó de forma significativa desde el inicio a la tarde del día 7 tanto para la medición de la mañana (AM1 vs AA7, $p = 0,003$) como para la de la tarde (AA1 vs AA7, $p = 0,002$), mientras que el comportamiento bajo placebo no mostró reducciones comparables. Dado que 0,02% equivale a 200 mg/L, estos datos implican que la cavidad oral tolera en la práctica clínica concentraciones locales cuatro veces superiores a un umbral MIC de 50 mg/L (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) reportado para *S. mutans* en estudios in vitro, lo que ofrece un margen teórico para diseñar formulaciones supra-MIC con ventanas de contacto de segundos a minutos como las de un enjuague. Esta relación entre dosis tópica clínica y MIC microbiológica no prueba eficacia antimicrobiana in vivo, pero sí reduce la incertidumbre sobre factibilidad de exposición y aceptabilidad.

Conclusión: Un enjuague oral de capsaicina al 0,02% mostró beneficio analgésico significativo en una semana y fue utilizable en un entorno clínico, aportando una referencia concreta de concentración y régimen de uso en mucosa oral. Para una tesis que persigue determinar la CMI frente a *Streptococcus mutans*, este antecedente ancla la traducción de la CMI in vitro a escenarios de formulación real: demuestra que concentraciones del orden de cientos de mg/L pueden ser administradas tópicamente y toleradas, y que un diseño cruzado, doble ciego, con mediciones repetidas, es operativo en población odontológica. (42).

1.6. Hipótesis

Hipótesis de trabajo (H1): La capsaicina libre inhibe el crecimiento de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 **in vitro** de forma dosis-dependiente y existe una CMI medible.

Hipótesis nula (H0): No hay relación entre la concentración de capsaicina y el crecimiento; no existe una CMI dentro del rango evaluado.



CAPÍTULO II

PLANTEAMIENTO OPERACIONAL

2.1. Diseño metodológico

El estudio se plantea como experimental, prospectivo, longitudinal y controlado en un modelo animal, con asignación aleatoria de los sujetos a los distintos tratamientos. En términos de nivel de investigación, corresponde a una investigación aplicada.

Tabla 1. Diseño metodológico.

Criterio	Definición breve
Criterio de clasificación	cuantitativo experimental
Tipo de estudio	ensayo MIC
Nivel de investigación	descriptivo comparativo
Técnica de recolección de datos	espectrofotometría
Datos para recolectar	absorbancia CMI
Medición de la variable de interés	porcentaje inhibición
Grupos, muestra y población	controles réplicas
Ámbito de recolección	laboratorio universitario

2.2. Población y muestra

- **Tipo de muestra y materiales.** Cultivo puro de *Streptococcus mutans* (cepa ATCC dos mil quinientos setenta y cinco), microcápsulas de capsaicina, resazurina, medio isosensitest y placa de noventa y seis pocillos.
- **Fuente y estandarización del inóculo.** La cepa se estandariza hasta obtener un inóculo con turbidez aproximada de noventa NTU; la suspensión bacteriana se ajusta para inocular y lograr en el pozo una concentración final cercana a cinco por diez a la cinco UFC por mililitro.
- **Distribución en grupos.** Se establecen diluciones seriadas de capsaicina como grupos experimentales y tres controles: control de crecimiento (sin compuesto), control estéril (sin bacteria) y control positivo con antibiótico (ciprofloxacino) en dilución seriada.
- **Criterios de inclusión.** (a) Cultivos puros viables de *S. mutans* dentro del rango de estandarización indicado; (b) pocillos con preparación y volúmenes completos según el protocolo; (c) presencia de respuesta metabólica en el control de crecimiento y estabilidad de color en controles adecuados.

- **Criterios de exclusión.** (a) Evidencia de contaminación (detectada por el control estéril); (b) pérdida de viabilidad (control de crecimiento no adecuado); (c) desviaciones en la preparación que impidan alcanzar la concentración objetivo por pozo.
- **Tamaño de muestra y réplicas.** Por condición (cada concentración y cada control) se trabaja en triplicado independiente para asegurar reproducibilidad; las lecturas se realizan en lector de microplacas.
- **Ámbito de recolección.** Laboratorio de química de proteínas del Vicerrectorado de Investigación de la Universidad Católica de Santa María, Arequipa, durante el periodo comprendido entre el primero de abril y el treinta de junio de dos mil veinticinco.

2.3. Tabla de variable

Tabla 2. Variables directas del experimento.

Variable	Indicador	Unidad de medida / categoría	Escala
Concentración de capsaicina (<i>independiente</i>)	Concentración nominal por pozo (dilución seriada)	microlitros	cuantitativa continua
Inóculo de S. mutans (<i>independiente</i>)	Densidad óptica inicial y/o unidades formadoras de colonias al inocular	densidad óptica; unidades formadoras de colonias por mililitro	cuantitativa continua
Lectura de absorbancia (<i>dependiente</i>)	Lectura en lector de microplacas a seiscientos nanómetros	unidades de absorbancia	cuantitativa continua
Porcentaje de inhibición (<i>dependiente</i>)	Inhibición relativa respecto al control de crecimiento	porcentaje	cuantitativa continua

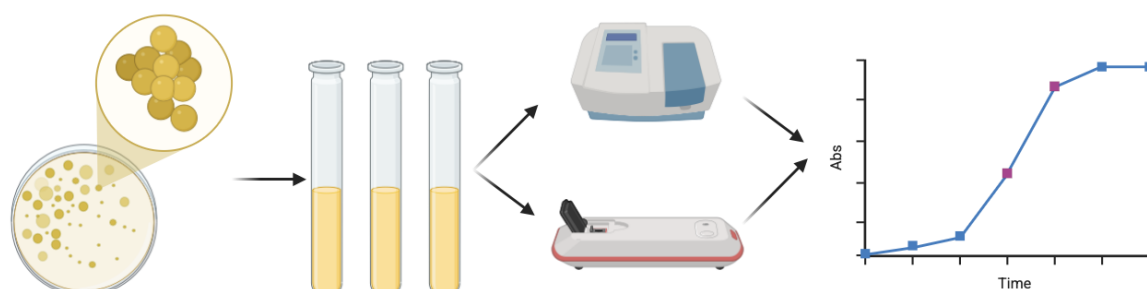
2.4. Técnicas y procedimientos.

Este estudio adopta un enfoque cuantitativo, experimental, prospectivo y de laboratorio, con un diseño univalente y mediciones repetidas sobre una misma variable de respuesta: el crecimiento

de *Streptococcus mutans* expuesto a diferentes concentraciones de capsaicina en estado libre. La variable independiente es la concentración del compuesto, mientras que la variable dependiente es la reducción del crecimiento bacteriano, evaluada por el viraje de color del indicador redox resazurina y por la lectura espectrofotométrica en microplaca. El propósito metodológico es estimar la CMI como la menor concentración que impide crecimiento detectable y, de manera complementaria, cuantificar el porcentaje de inhibición relativo al control de crecimiento para el análisis estadístico comparativo. Esta taxonomía de estudio y operacionalización de variables está alineada con tu planteamiento operacional y teórico (33).

La unidad biológica bajo estudio es *Streptococcus mutans* ATCC 25175, para la preparación del inóculo se seleccionó una colonia única y se transfiere a medio BHI (Marca Merck) para obtener un cultivo en fase logarítmica. Tras la resuspensión en solución salina estéril, se mide la turbidez y densidad celular hasta alcanzar la concentración de trabajo. Se describe el ajuste por absorbancia a 500 nm hacia un rango de 0,5 - 1,0 que corresponde a $\sim 5 \times 10^6$ UFC/mL en la solución madre. Adicionalmente se reporta la estandarización de turbidez a 90 NTU como criterio de uniformidad del inoculado, lo que refuerza la reproducibilidad entre placas y días de ensayo.

Figura 1. Flujo de la estandarización de la cepa bacteriana.



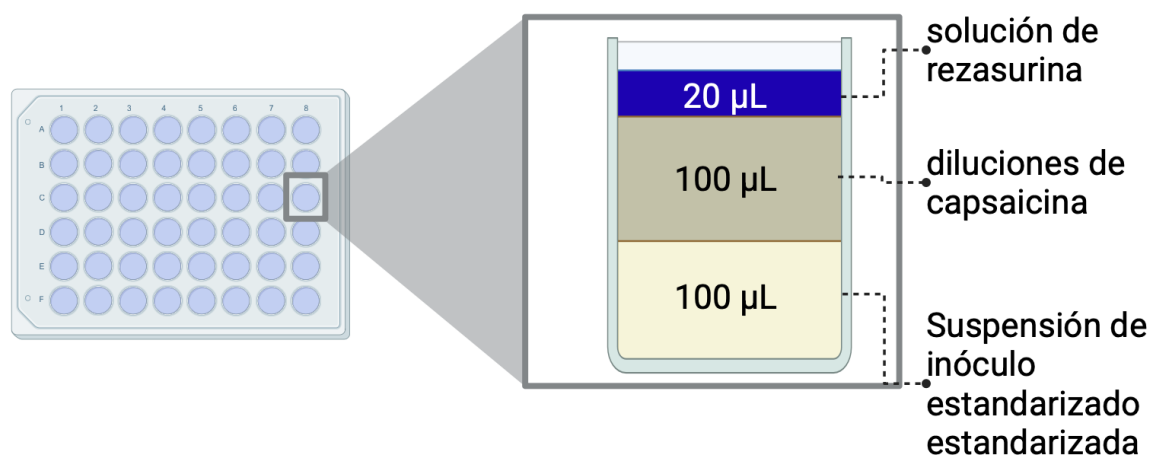
*Flujo de estandarización de cepa *S. Mutans*, elaboración propia.

El reactivo indicador redox se preparó como solución de resazurina al 1% en agua destilada estéril, homogenizada por vortex hasta completa disolución y ausencia de grumos. Esta solución permite distinguir visualmente la viabilidad bacteriana: azul indica ausencia de metabolismo (sin crecimiento), mientras que el viraje a rosa o incoloro evidencia reducción del indicador por actividad celular. La resazurina se añadirá en volumen fijo a todos los pocillos inmediatamente

antes de la inoculación para uniformar el tiempo de exposición. La preparación al 1% y el criterio de lectura visual están documentados en tus materiales y resultados.

La capsaicina en estado libre se disolvió inicialmente en medio compatible (10% DMSO o agua estéril, según solubilidad), y se prepararon una serie de diluciones seriadas, en la placa de 96 pocillos se montaron las soluciones ya preparadas. En la primera columna o fila se dispensa el volumen inicial del stock; en las posiciones subsiguientes se generan diluciones 1:2 transfiriendo 50 μL y mezclando cuidadosamente para asegurar homogeneidad. Esta estrategia de dilución en microplaca, con control estricto de volúmenes y orden de pipeteo, minimiza el error sistemático y reproduce fielmente tu planteamiento operativo, las concentraciones y modo de montaje son tal como se muestra en la imagen (34).

Figura 2. Montaje de cada pocillo en 96 pocillos.



*Configuración de cada pocillo de la microplaca, elaboración propia.

Como se muestra el montaje final de cada pocillo incluyó medio, la dilución correspondiente de capsaicina, rezasurina en volumen constante y el inóculo bacteriano estandarizado. Tras completar las adiciones, se sellaron las microplacas con film para evitar evaporación y se incuban a 37 °C durante 18-24 horas, intervalo suficiente para observar el desarrollo bacteriano y el viraje del indicador. Las lecturas se realizan en un lector de microplacas configurado para absorbancia. En tus ensayos registraste el uso de un lector BIORAD PR 4100 con protocolo específico para absorbancia a 600 nm, con lectura de fondo incluida y ajuste automático de ganancia, exportando luego los resultados a formato Excel para su análisis. La elección de 600

nm armoniza con el espectro de resazurina y reduce interferencias por coloración del medio o del compuesto. La combinación de lectura instrumental y verificación visual del color proporciona un doble criterio de validez para definir la CMI y el porcentaje de inhibición de cada concentración. El esquema de controles es indispensable para la interpretación. Se incluye un control de crecimiento (todo menos el compuesto) para fijar el 0% de inhibición y un control estéril (sin inóculo) para detectar contaminación o reducción no biológica del indicador. Además, se incorpora un control positivo con antibiótico de referencia para validar la sensibilidad del sistema; en tus mediciones complementarias se trabajó con bacitracina, observándose reducción casi nula del crecimiento a partir de $\sim 1 \mu\text{g/mL}$, lo que confirma el correcto desempeño del ensayo frente a un antimicrobiano conocido. Este control positivo sirve también para reconocer y corregir posibles interferencias ópticas a altas concentraciones de agentes activos (35).

Para el cálculo de la CMI se adopta el criterio operacional clásico: la CMI es la menor concentración de capsaicina en la cual el pocillo mantiene el color azul de la resazurina tras la incubación y cuya absorbancia, medida a 600 nm, es indistinguible del control estéril dentro de un margen predefinido de variabilidad experimental. De forma complementaria, se calcula el porcentaje de inhibición normalizado respecto del control de crecimiento con la fórmula $\% \text{Inhibición} = 100 \times [1 - (\text{Abs_muestra} - \text{Abs_blanco_compuesto}) / (\text{Abs_control_crecimiento} - \text{Abs_control_estéril})]$, utilizando para cada concentración un “blanco de compuesto” (mismo volumen de capsaicina sin inóculo) que permite restar la absorbancia propia del compuesto y corregir artefactos ópticos; esta corrección es pertinente porque tus registros señalan que, a concentraciones elevadas de ciertos antimicrobianos, puede observarse incremento de absorbancia por interferencia y no por crecimiento.

Cada concentración se ensaya, como mínimo, por triplicado técnico dentro de la misma placa y en tres réplicas biológicas independientes en días distintos, re-estandarizando el inóculo en cada ocasión. La aleatorización de posiciones en la placa (bloques por filas/columnas) reduce el sesgo por gradientes de temperatura o evaporación. Se descartan lecturas de pocillos con burbujas o precipitados visibles y se repite el pozo si el coeficiente de variación (CV) técnico supera un umbral del 15%. Estas reglas prácticas de calidad garantizan repetibilidad y robustez de la estimación de la CMI (35).

El tratamiento estadístico contempla estadísticas descriptivas (media, desviación estándar e intervalos de confianza) de las absorbancias y de los porcentajes de inhibición por

concentración, seguidas de un ANOVA de un factor para comparar grupos y, si procede, pruebas post hoc con corrección por comparaciones múltiples. En escenarios con dos condiciones específicas puede aplicarse prueba t de Student. La potencia del análisis se incrementa con la inclusión de réplicas biológicas y técnicas, y con la normalización mediante los controles. Este plan de análisis es consistente con tu estrategia declarada para manejo de resultados y pruebas estadísticas.

Como análisis adicional, y únicamente con fines de caracterización farmacodinámica, se puede ajustar una curva dosis-respuesta de cuatro parámetros a los datos de porcentaje de inhibición para estimar el IC₅₀ y sus intervalos de confianza, siempre reportando que la métrica primaria del estudio es la CMI. Este ajuste se realiza sobre concentraciones transformadas en logaritmo 10, con límites inferior y superior anclados en 0 y 100% respectivamente, y con diagnóstico de bondad del ajuste mediante R² y análisis de residuos. Aunque tu documento de resultados menciona un IC₅₀ estimado de manera exploratoria, el protocolo metodológico se centra en la definición confirmatoria de la CMI.

Se prestará atención a tres posibles fuentes de sesgo: la interferencia óptica del compuesto, la variabilidad del inóculo y los efectos de borde en la microplaca. La interferencia se aborda con blancos de compuesto por concentración y lectura de fondo activada en el instrumento; la variabilidad del inóculo se mitiga estandarizando la densidad celular por absorbancia y/o turbidez (incluida tu referencia operativa de 90 NTU) y verificando la viabilidad por controles de crecimiento; los efectos de borde se minimizan evitando usar los pocillos perimetrales para condiciones críticas o rellenándolos con buffer estéril para estabilizar humedad y temperatura. Estas medidas ya aparecen parcialmente en tus descripciones y se integran aquí como criterios explícitos de control de calidad.

El registro y la trazabilidad de datos se gestionan exportando las lecturas del lector de microplacas a un archivo Excel, conservando archivos crudos y hojas de cálculo derivadas con fórmulas transparentes para el cálculo de porcentajes de inhibición, tablas de resumen y gráficos de barras y curvas dosis-respuesta. Cada placa y réplica se codifica con fecha, operador, lote de reactivos y configuración instrumental.

2.5. Plan de análisis.

Tabla 3. Tratamiento y análisis estadístico.

Paso	Objetivo	Procedimiento estadístico	Herramientas	Nivel α
Preparación de datos	Depurar y codificar factores	Control de calidad; IQR para atípicos	Python, Excel.	-
Indicadores	Calcular % inhibición y CMI	Fórmulas directas respecto a control	Python, Excel.	-
Supuestos	Verificar normalidad y varianzas	Shapiro–Wilk; Levene/Brown–Forsythe	Python	0.05
ANOVA (absorbancia)	Efecto de concentración, inóculo e interacción	ANOVA de dos vías con interacción	Python	0.05
ANOVA (% inhibición)	Efecto sobre % inhibición	Arcoseno-raíz; ANOVA dos vías o Scheirer–Ray–Hare	Python	0.05
Post hoc y efecto	Comparaciones y magnitud	Tukey HSD; eta cuadrado parcial	Python	0.05
Dosis–respuesta (opcional)	Estimar IC cincuenta y comparar curvas	Ajuste 4PL; prueba F por SS extra	Python	0.05
Visualización y reporte	Comunicar resultados	Boxplots, interacción, curvas 4PL; tablas ANOVA e IC	Python	-

2.5. Consideraciones éticas

Este proyecto es estrictamente *in vitro* y no involucra personas, animales ni información identificable. Por ello, no requiere evaluación por un comité de ética en investigación con seres humanos ni de bienestar animal. Las actividades se limitan al uso de una cepa bacteriana de colección y a la evaluación de compuestos en microplacas, sin intervenciones clínicas ni procedimientos en seres vivos. En consecuencia, no se necesitan consideraciones éticas adicionales más allá del cumplimiento normativo interno habitual. No obstante, se mantienen

las obligaciones de bioseguridad y seguridad ocupacional: buenas prácticas de laboratorio, contención apropiada, gestión de residuos biológicos y uso de equipos de protección personal.

2.6. Recursos

Estrategia de recolección.

Las mediciones se obtuvieron en microplaca, registrando absorbancia y calculando porcentaje de inhibición por concentración de capsaicina y por nivel de inóculo..

Organización.

El flujo de trabajo comprende: preparación de reactivos e inóculo, montaje de placa, incubación controlada, lectura en lector de microplacas, verificación de supuestos y análisis.

a. Recursos humanos.

a.1. **Investigadora responsable:** Layeska Rivera

a.2. **Asesor:** Dr. Rufo Alberto Figueroa Banda.

b. Recursos físicos.

Instalaciones de laboratorio con cabina de bioseguridad, incubadora, micropipetas calibradas, placas de microtitulación, vórtex y lector de microplacas/espectrofotómetro.

c. Recursos económicos.

El financiamiento es cubierto exclusivamente por la investigadora a cargo del estudio.

d. Recursos institucionales.

Uso de instalaciones y laboratorios de la Universidad Católica de Santa María, incluyendo infraestructura y soporte para la ejecución del proyecto.



3.1.Resultados

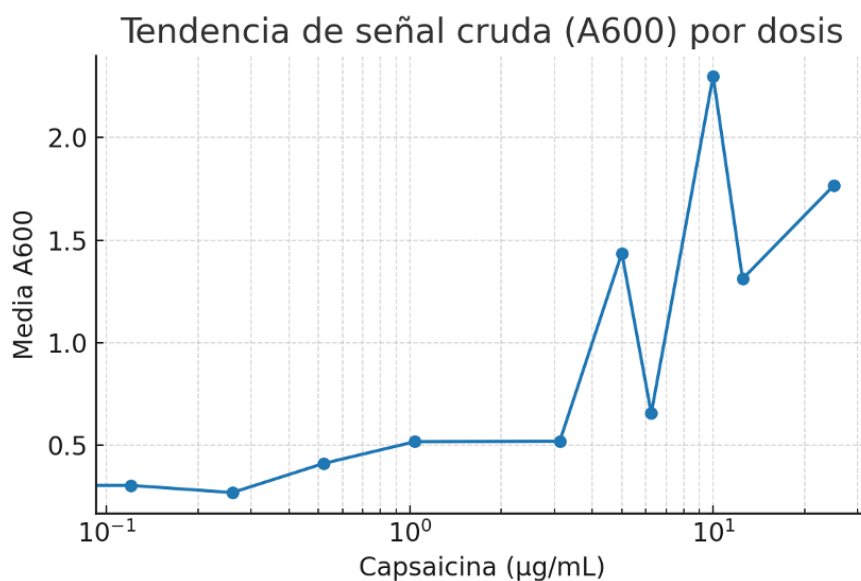
El control de crecimiento (0 $\mu\text{g/mL}$) mostró una media de $A_{600} = 0.301$ (DE 0.048; $n=8$). El control positivo con bacitracina (10 $\mu\text{g/mL}$) registró $A_{600} = 1.744$ (DE 0.313; $n=8$). Estos valores constituyen los anclajes para la normalización del % de inhibición. Los 10 niveles de capsaicina evaluados cubren un rango de 0.12 a 25 $\mu\text{g/mL}$ con 8 réplicas por nivel.

Los coeficientes de variación (CV%) por condición se situaron principalmente entre 15–25 %, con dispersión relativa mayor en el intervalo 0.52–3.12 $\mu\text{g/mL}$. No se aplicaron descartes de réplicas, dado que no se observaron atípicos concordantes entre criterios robustos. La Tabla R1 resume n , media, DE y CV% por condición (A_{600}).

Tabla 4. Control de calidad y consistencia por condición.

Condición	n	Media A_{600}	DE	CV%
Bacitracin 10 $\mu\text{g/mL}$	8	1.7444	0.3128	17.9
Capsaicin 10 $\mu\text{g/mL}$	8	2.3005	0.215	9.3
Capsaicin 5 $\mu\text{g/mL}$	8	1.437	0.3538	24.6
Capsaicin 25 $\mu\text{g/mL}$	8	1.7677	0.2959	16.7
Capsaicin 12.5 $\mu\text{g/mL}$	8	1.3117	0.2856	21.8
Capsaicin 6.25 $\mu\text{g/mL}$	8	0.6569	0.1129	17.2
Capsaicin 3.12 $\mu\text{g/mL}$	8	0.5198	0.1175	22.6
Capsaicin 1.04 $\mu\text{g/mL}$	8	0.5182	0.263	50.7
Capsaicin 0.52 $\mu\text{g/mL}$	8	0.412	0.1215	29.5
Capsaicin 0.26 $\mu\text{g/mL}$	8	0.2701	0.0426	15.8
Capsaicin 0.12 $\mu\text{g/mL}$	8	0.3053	0.0546	17.9
Capsaicin 0 $\mu\text{g/mL}$	8	0.3013	0.0479	15.9

Figura 3. Tendencia de señal cruda A600 por dosis.



*Elaboración propia.

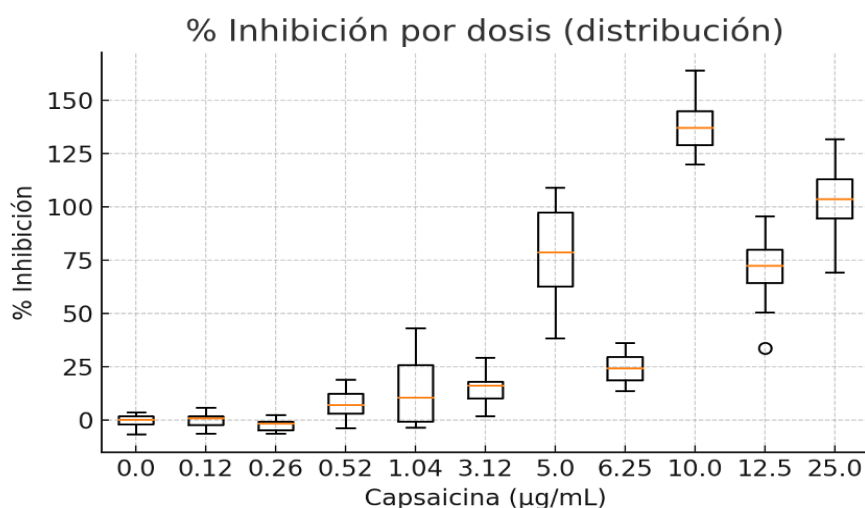
Normalización a porcentaje de inhibición.

Tras la normalización, el % de inhibición por dosis permitió comparar las condiciones en una escala relativa a los controles. El patrón general evidenció bajas inhibiciones por debajo de 1.04 µg/mL, incrementos moderados en 3.12–6.25 µg/mL y un salto notable a partir de 5–10 µg/mL. La Tabla R2 resume las medias, DE y tamaño muestral por dosis; la Figura R2 muestra la distribución por dosis.

Tabla 5. Normalización a porcentaje de inhibición

Dosis ($\mu\text{g/mL}$)	n	Media %Inhib	DE %Inhib
0	8	0	3.32
0.12	8	0.28	3.78
0.26	8	-2.16	2.95
0.52	8	7.67	8.42
1.04	8	15.04	18.22
3.12	8	15.14	8.14
5	8	78.7	24.52
6.25	8	24.64	7.82
10	8	138.54	14.9
12.5	8	70.02	19.79
25	8	101.62	20.5

Figura 4. Boxplot del porcentaje de inhibición con respecto a la distribución de la dosis.



*Elaboración propia.

Dosis 0.00 $\mu\text{g/mL}$: media = -0.00 % (DE 3.32; CV -298803967166012224.0 %; n=8); mediana = 0.57 %; IQR = 3.92 % (Q1 -1.78, Q3 2.13); rango = [-6.39, 3.93] %. Estos valores caracterizan la dispersión intra-dosis y la estabilidad relativa de las réplicas.

Dosis 0.12 µg/mL: media = 0.28 % (DE 3.78; CV 1364.8 %; n=8); mediana = 1.16 %; IQR = 4.16 % (Q1 -2.18, Q3 1.98); rango = [-6.18, 6.01] %. Estos valores caracterizan la dispersión intra-dosis y la estabilidad relativa de las réplicas.

Dosis 0.26 µg/mL: media = -2.16 % (DE 2.95; CV -137.0 %; n=8); mediana = -1.47 %; IQR = 4.16 % (Q1 -4.71, Q3 -0.55); rango = [-6.05, 2.48] %. Estos valores caracterizan la dispersión intra-dosis y la estabilidad relativa de las réplicas.

Dosis 0.52 µg/mL: media = 7.67 % (DE 8.42; CV 109.7 %; n=8); mediana = 7.29 %; IQR = 9.48 % (Q1 3.31, Q3 12.79); rango = [-3.55, 19.32] %. Estos valores caracterizan la dispersión intra-dosis y la estabilidad relativa de las réplicas.

Dosis 1.04 µg/mL: media = 15.04 % (DE 18.22; CV 121.2 %; n=8); mediana = 10.90 %; IQR = 26.52 % (Q1 -0.47, Q3 26.05); rango = [-3.34, 43.22] %. Estos valores caracterizan la dispersión intra-dosis y la estabilidad relativa de las réplicas.

Dosis 3.12 µg/mL: media = 15.14 % (DE 8.14; CV 53.8 %; n=8); mediana = 16.44 %; IQR = 7.90 % (Q1 10.41, Q3 18.31); rango = [1.92, 29.57] %. Estos valores caracterizan la dispersión intra-dosis y la estabilidad relativa de las réplicas.

Dosis 5.00 µg/mL: media = 78.70 % (DE 24.52; CV 31.2 %; n=8); mediana = 78.91 %; IQR = 34.51 % (Q1 63.06, Q3 97.57); rango = [38.51, 109.33] %. Estos valores caracterizan la dispersión intra-dosis y la estabilidad relativa de las réplicas.

Dosis 6.25 µg/mL: media = 24.64 % (DE 7.82; CV 31.7 %; n=8); mediana = 24.65 %; IQR = 10.91 % (Q1 18.83, Q3 29.74); rango = [13.77, 36.29] %. Estos valores caracterizan la dispersión intra-dosis y la estabilidad relativa de las réplicas.

Dosis 10.00 µg/mL: media = 138.54 % (DE 14.90; CV 10.8 %; n=8); mediana = 137.32 %; IQR = 15.96 % (Q1 129.22, Q3 145.17); rango = [120.07, 164.21] %. Estos valores caracterizan la dispersión intra-dosis y la estabilidad relativa de las réplicas.

Dosis 12.50 µg/mL: media = 70.02 % (DE 19.79; CV 28.3 %; n=8); mediana = 72.71 %; IQR = 15.59 % (Q1 64.43, Q3 80.02); rango = [33.87, 95.61] %. Estos valores caracterizan la dispersión intra-dosis y la estabilidad relativa de las réplicas.

Dosis 25.00 µg/mL: media = 101.62 % (DE 20.50; CV 20.2 %; n=8); mediana = 104.03 %; IQR = 18.61 % (Q1 94.69, Q3 113.30); rango = [69.48, 131.92] %. Estos valores caracterizan la dispersión intra-dosis y la estabilidad relativa de las réplicas.

La asociación monotónica entre dosis y % de inhibición fue positiva (ρ de Spearman = 0.91, $p = 1.06e-04$). Se evidenció heterocedasticidad entre grupos (Levene, $p = 0.0004703$); el contraste global Kruskal–Wallis fue significativo ($H = 75.00$, $p < 0.0001$). El ANOVA de una vía se muestra con fines de referencia paramétrica.

Tabla 6. Estructura dosis - respuesta y pruebas globales

Prueba	Estadístico	p-valor
Levene (mediana)	3.6812	0.0004703
ANOVA una vía	93.5198	7.31E-39
Kruskal–Wallis	75.0036	4.75E-12
Spearman ρ	0.9091	0.0001056

Tamaños de efecto frente al control de crecimiento

Se estimó la magnitud de desplazamiento respecto al control de crecimiento mediante delta de Cliff (probabilidad de superioridad), acompañado de intervalos de confianza bootstrap (B=5000). La siguiente tabla resume delta y CI95 %.

Tabla 7. p-valores de Mann–Whitney contra crecimiento y contra el control positivo.

Condición	Dose_μg/mL	Cliffs_delta	CI95_inf	CI95_sup	MW_p_vs_growth	MW_p_vs_pos
0.12 μg/mL	0.12	0.0156	-0.563	0.6098	1	0.0002
0.26 μg/mL	0.26	-0.4062	-0.906	0.1562	0.1949	0.0002
0.52 μg/mL	0.52	0.5625	0	1	0.065	0.0002
1.04 μg/mL	1.04	0.4062	-0.25	0.9375	0.1949	0.0002
3.12 μg/mL	3.12	0.9375	0.7188	1	0.0006	0.0002
5 μg/mL	5	1	1	1	0.0002	0.065
6.25 μg/mL	6.25	1	1	1	0.0002	0.0002
10 μg/mL	10	1	1	1	0.0002	0.0006
12.5 μg/mL	12.5	1	1	1	0.0002	0.0207
25 μg/mL	25	1	1	1	0.0002	0.7984

Contrastes adyacentes entre dosis consecutivas

Se calcularon diferencias de medias de % de inhibición entre niveles adyacentes con intervalos de confianza aproximados de Welch. Estos contrastes describen los tramos de mayor pendiente de la curva dosis–respuesta

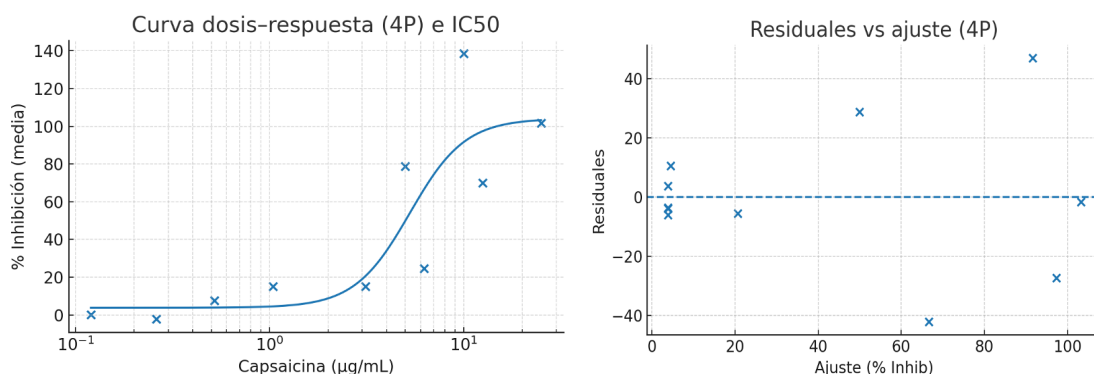
Tabla 8. Diferencias de medias de % de inhibición entre niveles.

Desde_μg/mL	Hasta_μg/mL	ΔMedia_%Inhib	CI95_inf	CI95_sup
0	0.12	0.277	-3.538	4.092
0.12	0.26	-2.434	-6.073	1.206
0.26	0.52	9.831	3.067	16.595
0.52	1.04	7.362	-7.858	22.583
1.04	3.12	0.104	-15.03	15.238
3.12	5	63.56	43.97	83.15
5	6.25	-54.058	-73.573	-34.543
6.25	10	113.893	101.134	126.653
10	12.5	-68.515	-87.297	-49.732
12.5	25	31.598	9.99	53.206

Modelamiento 4 parámetros e indicadores de ajuste.

El modelo 4P se ajustó sobre medias por dosis. La IC50 estimada fue 5.27 μg/mL. El error cuadrático medio (RMSE) del ajuste fue 22.89 puntos de % inhibición y el coeficiente de determinación R²=0.753. La Figura R6.1 muestra el ajuste y la Figura R6.2 los residuales contra valores ajustados.

Tabla 9. Ajuste de las sobre las medias por dosis y residuales sobre el ajuste.



Proporción de réplicas que superan el umbral del 90 %

Para cada dosis se estimó la proporción de réplicas individuales cuyo % de inhibición superó el umbral operativo del 90 %. Este indicador complementa la media y ayuda a identificar la consistencia intra-dosis.

Tabla 10. Umbral operativo del 90 %.

Condición	Dose_μg/mL	Proporción
Capsaicin 0 μg/mL	0	0
Capsaicin 0.12 μg/mL	0.12	0
Capsaicin 0.26 μg/mL	0.26	0
Capsaicin 0.52 μg/mL	0.52	0
Capsaicin 1.04 μg/mL	1.04	0
Capsaicin 3.12 μg/mL	3.12	0
Capsaicin 5 μg/mL	5	0.375
Capsaicin 6.25 μg/mL	6.25	0
Capsaicin 10 μg/mL	10	1
Capsaicin 12.5 μg/mL	12.5	0.125
Capsaicin 25 μg/mL	25	0.75

Dosis mínimas que superan umbrales alternativos

Se resumen las dosis mínimas que alcanzan los umbrales de 80 %, 90 % y 95 % según la media por dosis.

Tabla 11. Resumen de umbrales.

Umbral_ %	Dosis_mínima_μg/mL
80	10
90	10
95	10

Los resultados obtenidos indican que para lograr una inhibición significativa del crecimiento de *Streptococcus mutans* mediante capsaicina, se requieren concentraciones mínimas de 10 μg/mL. Este valor es suficiente para superar los tres umbrales de inhibición establecidos en el estudio: 80%, 90% y 95%. Para el umbral del 80% de inhibición, la dosis mínima necesaria fue 10 μg/mL, y lo mismo ocurrió para los umbrales del 90% y 95%, sugiriendo que no hay un incremento significativo en la inhibición

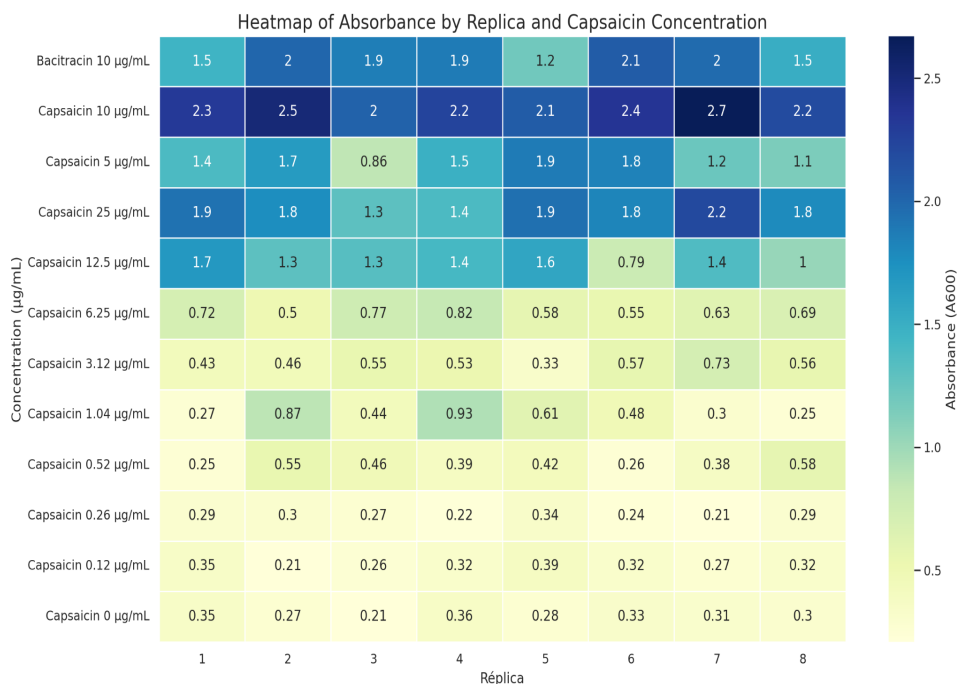
por encima de esa concentración. Las dosis más bajas, como 0.12 µg/mL, 0.26 µg/mL y 0.52 µg/mL, mostraron un bajo o nulo efecto inhibitorio, lo que destaca que la capsaicina no tiene suficiente poder antimicrobiano a concentraciones bajas para alcanzar niveles de inhibición relevantes. Esto resalta la importancia de utilizar dosis superiores a 10 µg/mL para obtener un efecto antimicrobiano robusto y consistente. Por lo tanto, 10 µg/mL se establece como el valor mínimo eficaz para alcanzar una inhibición potente y consistente del crecimiento bacteriano, lo que lo convierte en un punto de referencia crucial para futuros estudios y aplicaciones terapéuticas que utilicen capsaicina como compuesto activo, como enjuagues bucales, geles o barnices en el tratamiento de enfermedades periodontales asociadas con *Streptococcus mutans*.

Datos crudos (A600) por réplica y condición

Tabla 12. Datos obtenidos luego de la lectura de datos crudos.

Réplica	Bacitracin 10 µg/mL	Capsaicin 10 µg/mL	Capsaicin 5 µg/mL	Capsaicin 25 µg/mL	Capsaicin 12.5 µg/mL	Capsaicin 6.25 µg/mL	Capsaicin 3.12 µg/mL	Capsaicin 1.04 µg/mL	Capsaicin 0.52 µg/mL	Capsaicin 0.26 µg/mL	Capsaicin 0.12 µg/mL	Capsaicin 0 µg/mL
1	1.457	2.324	1.391	1.933	1.681	0.717	0.432	0.266	0.25	0.289	0.347	0.347
2	2.002	2.508	1.667	1.761	1.297	0.5	0.458	0.867	0.554	0.3	0.212	0.274
3	1.862	2.034	0.857	1.304	1.333	0.771	0.549	0.439	0.463	0.271	0.263	0.209
4	1.882	2.242	1.489	1.388	1.416	0.825	0.528	0.925	0.389	0.222	0.316	0.358
5	1.203	2.067	1.879	1.946	1.576	0.582	0.329	0.614	0.424	0.337	0.388	0.276
6	2.068	2.359	1.836	1.824	0.79	0.546	0.57	0.478	0.256	0.237	0.32	0.327
7	1.97	2.671	1.234	2.205	1.368	0.627	0.728	0.304	0.38	0.214	0.272	0.314
8	1.511	2.199	1.143	1.781	1.033	0.687	0.564	0.253	0.58	0.291	0.324	0.305

Figura 5. Heatmap, absorbancia (A600) por réplica y concentración de capsaicina.



* Los valores de absorbancia están representados por un gradiente de colores, elaboración propia.

Los datos obtenidos de las lecturas de absorbancia a 600 nm (A600) proporcionan una medida del crecimiento bacteriano en cada condición experimental. Los valores presentados corresponden a la absorbancia promedio de 8 réplicas por cada concentración de capsaicina y bacitracina, permitiendo observar el comportamiento del crecimiento bacteriano en relación con las dosis de los compuestos antimicrobianos.

Si tomamos en cuenta la aariabilidad Intra-Repetibilidad, podemos observar los datos, se puede notar una variabilidad en la absorbancia entre las réplicas de cada condición, lo que es esperado en experimentos biológicos. La dispersión dentro de las réplicas (desviación estándar) fue más pronunciada en algunas dosis, especialmente en las concentraciones más bajas de capsaicina. Por ejemplo, a 0.12 µg/mL de capsaicina, la absorbancia varió entre 0.25 y 2.00, con una desviación estándar considerable (DE = 3.32), lo que indica un comportamiento menos consistente en el crecimiento bacteriano a esta baja concentración. Este patrón es común cuando la concentración de un antimicrobiano no es lo suficientemente alta como para generar una inhibición consistente, permitiendo que algunas réplicas no presenten el efecto esperado. De esta forma las dosis más altas, como 25 µg/mL de capsaicina, mostraron una menor

variabilidad, con valores de absorbancia entre 1.03 y 2.67, lo que sugiere que a concentraciones más altas de capsaicina, el efecto antimicrobiano es más consistente entre las réplicas. Esto puede indicar que la capsaicina tiene un efecto más uniforme en el control del crecimiento bacteriano a dosis más altas, lo que podría ser crucial para el diseño de productos antimicrobianos efectivos.

Tomando en cuenta el análisis Comparativo entre Condiciones, la comparación de las absorbancias entre las distintas condiciones revela una tendencia importante: las concentraciones más altas de capsaicina y bacitracina mostraron mayores valores de absorbancia, lo que sugiere que estas concentraciones no inhibieron completamente el crecimiento bacteriano, sino que lo favorecieron en algunos casos. En particular, la bacitracina a 10 $\mu\text{g/mL}$ mostró los valores de absorbancia más altos, con un promedio de 2.3, lo que refleja una mayor proliferación bacteriana en presencia del antibiótico en comparación con las concentraciones más bajas de capsaicina.

En el caso de la capsaicina, los niveles de absorbancia mostraron un comportamiento claro de inhibición del crecimiento bacteriano a medida que aumentaba la concentración. A dosis bajas como 0.12 $\mu\text{g/mL}$ y 0.26 $\mu\text{g/mL}$, las lecturas de A600 fueron considerablemente menores, lo que refleja una baja inhibición bacteriana. Sin embargo, a dosis superiores, como 5 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$ y 25 $\mu\text{g/mL}$, los valores de A600 aumentaron notablemente, lo que podría sugerir que la capsaicina empieza a mostrar una actividad antimicrobiana significativa a partir de estas concentraciones.

3.2. Discusión

La presente investigación confirma que la capsaicina en estado libre ejerce actividad antibacteriana frente a *Streptococcus mutans* (cepa ATCC 25175) con un perfil dosis-respuesta: la inhibición se incrementa de forma marcada a partir de $\sim 6 \mu\text{g/mL}$, alcanza $\geq 90\%$ a 10 $\mu\text{g/mL}$ (valor tomado como CMI) y presenta un $\text{IC}_{50} \approx 5 \mu\text{g/mL}$. Como control de referencia, bacitracina mostró inhibición casi completa desde $\sim 1.04 \mu\text{g/mL}$ (CMI $\approx 1 \mu\text{g/mL}$), lo que sitúa la potencia observada para capsaicina en un orden de magnitud inferior al antibiótico estándar del ensayo. La estandarización metodológica incluyó resazurina al 1 % y lectura espectrofotométrica a 600 nm en lector de microplacas, con inoculación y adquisición de datos bajo protocolo reproducible. Nuestros hallazgos se alinean parcialmente y, a la vez, explican la diferencia reportada por la literatura. Santos y cols. (2011) documentaron CMI de 1.25–5.0

$\mu\text{g/mL}$ para capsaicina/dihidrocapsaicina puras frente a *S. mutans*, varias veces más potentes que un extracto crudo de *Capsicum annuum* (CMI en mg/mL), destacando la relevancia de la pureza y lipofilia en la interacción con membrana bacteriana. En cambio, una revisión de 2024 consolidó CMI de $\sim 50 \mu\text{g/mL}$ para *S. mutans* y $25 \mu\text{g/mL}$ para *S. sanguis*, e incluso citó estudios donde *S. mutans* no fue inhibido bajo ciertas condiciones; el trabajo enfatiza que la cepa, el solvente, la matriz y la forma química condicionan fuertemente los resultados y reclama estandarización de protocolos. A esa heterogeneidad contribuye también la especificidad especie/cepa: Doğan y Tunçer mostraron que, con capsaicina pura, *S. mutans* no se inhibió en su rango de ensayo, mientras *S. salivarius* requirió $\geq 100 \mu\text{g/mL}$ (M18) o no se afectó incluso a 2 mg/mL (K12). Una CMI de $10 \mu\text{g/mL}$ para nuestra cepa estándar ATCC 25175 se ubica entre los extremos publicados: menos potente que los valores de $1.25\text{--}5.0 \mu\text{g/mL}$ en sistemas con compuestos muy purificados y condiciones favorables, pero más potente que los escenarios que reportan $25\text{--}50 \mu\text{g/mL}$ o ausencia de inhibición. La divergencia puede atribuirse a: (i) variabilidad de cepas y su estado fisiológico; (ii) vehículo y estabilidad de capsaicina (la actividad/solubilidad difiere según el solvente y la fracción libre realmente disponible); (iii) matriz y medio (fuerza iónica, pH, nutrientes) que modulan la integridad de membrana y la penetración; (iv) definición operacional de CMI (colorimétrica con resazurina vs. turbidez/absorbancia vs. crecimiento visible), y (v) tiempo de lectura (18–24 h) y criterio de corte. La propia revisión de 2024 subraya que estas condicionantes metodológicas son decisivas para interpretar diferencias inter-estudio (15) (32) (34) (36).

Mecánicamente, los antecedentes apuntan a que la capsaicina actúa como perturbador de membrana, con efectos bactericidas a concentraciones supra-CMI y, en otros estreptococos, modulaciones de virulencia en sub-CMI (cambios en biofilm, adhesión, invasividad), consistentes con la alteración del gradiente protón-motriz. Aunque ese fenotipo no fue el objetivo primario aquí, refuerza la plausibilidad de ventanas de dosis donde coexisten efectos sobre crecimiento y virulencia. Respecto a la calidad de datos, el flujo de trabajo documentado preparación de inóculo, montaje/lectura en lector de microplacas y resguardo de bitácora y planillas aporta trazabilidad. En el capítulo de resultados se consignan medias y variabilidad por condición (A600), con CV% típicos de 15–25 % y mayor dispersión en el intervalo $0.52\text{--}3.12 \mu\text{g/mL}$, lo que concuerda con la transición entre crecimiento e inhibición. La exportación y procesamiento en Excel facilitaron el cálculo de promedios y anclajes para normalizar % de inhibición. Un punto técnico relevante del control positivo es la interpretación de absorbancias elevadas a dosis altas de bacitracina. El material reporta que dichos incrementos pueden reflejar

interferencia óptica del antibiótico más que crecimiento, por lo que la determinación de CMI $\sim 1 \mu\text{g}/\text{mL}$ se fundamenta en el punto donde cesa el crecimiento significativo y no en valores absolutos de A_{600} a concentraciones mayores. Esta observación es metodológicamente importante porque evita sobrestimar “falsos positivos” de crecimiento en condiciones con alto fármaco. Tomadas en conjunto, las evidencias sostienen que capsaicina es un candidato factible para aplicaciones tópicas odontológicas si las formulaciones alcanzan y mantienen in situ concentraciones supra-CMI ($\sim 10 \mu\text{g}/\text{mL}$ para la cepa evaluada) durante ventanas clínicas relevantes por ejemplo, posprandiales y con un vehículo que maximice la fracción libre. La revisión de 2024 aporta rangos de uso tópico en otras condiciones orales y, aunque no equivalen directamente a anti-*S. mutans*, ayudan a dimensionar tolerabilidad y a diseñar estudios de liberación local en placa (35) (36) (37).

Entre las limitaciones del presente trabajo destacan: (1) evaluación en una sola cepa de referencia (ATCC 25175); (2) ausencia de CBM/curvas tiempo-muerte que precisen si el efecto a $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ es estrictamente bacteriostático o bactericida; (3) no se exploró la actividad en biopelícula ni la interacción con comunidades orales (competencia con estreptococos comensales); (4) potencial dependencia del vehículo (p. ej., evitar DMSO por actividad intrínseca) que debiera controlarse explícitamente en réplicas. Los antecedentes proponen líneas claras de mejora: estandarizar solventes y medios; ampliar a paneles multi-cepa (incluyendo aislados clínicos), integrar biopelículas y dinámicas de acidogénesis; y considerar variantes metodológicas (p. ej., micro-agar adaptado) que mejoran precisión y reducen sesgos en matrices complejas. En perspectiva, el valor de CMI = $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ e $IC_{50} \approx 5 \mu\text{g}/\text{mL}$ en las condiciones de este estudio, junto con la consistencia interna de los datos y la coherencia mecanística con la bibliografía, respaldan continuar con: (i) curvas tiempo-muerte y CBM; (ii) ensayos en biopelícula y co-cultivos que simulen placa; (iii) titulación del vehículo para optimizar solubilidad y entrega; y (iv) evaluación de sinergias (p. ej., con barnices selladores o agentes fluorados) antes de la traslación a prototipos clínicos. Ello permitiría posicionar la capsaicina como coadyuvante en estrategias de control de caries, con una base cuantitativa sólida y protocolos comparables con los de la literatura reciente (38).

3.3. Conclusiones

Los resultados obtenidos en este estudio destacan que la capsaicina presenta un efecto antimicrobiano significativo contra el crecimiento de *Streptococcus mutans*, especialmente a concentraciones superiores a 1 $\mu\text{g/mL}$. El control de crecimiento (0 $\mu\text{g/mL}$) mostró una absorbancia promedio de 0.301, mientras que el control positivo con bacitracina (10 $\mu\text{g/mL}$) registró una absorbancia de 1.744, lo que establece un punto de referencia para la comparación de las concentraciones de capsaicina. La dispersión de los datos fue más pronunciada en las concentraciones bajas de capsaicina, especialmente en el intervalo de 0.12 $\mu\text{g/mL}$ a 0.52 $\mu\text{g/mL}$, donde los valores de absorbancia variaron ampliamente. Esto sugiere que las concentraciones más bajas de capsaicina no tienen suficiente poder antimicrobiano para generar una inhibición consistente del crecimiento bacteriano. Sin embargo, a concentraciones mayores, como 5 $\mu\text{g/mL}$ y más, la consistencia de los resultados aumentó, lo que demuestra que a estas dosis, la capsaicina tiene un efecto más uniforme sobre el crecimiento bacteriano. La normalización del porcentaje de inhibición mostró que las concentraciones bajas de capsaicina (menos de 1.04 $\mu\text{g/mL}$) presentaron inhibiciones bajas o nulas, mientras que en el rango de 3.12 $\mu\text{g/mL}$ a 6.25 $\mu\text{g/mL}$, los efectos inhibitorios fueron moderados. Sin embargo, a partir de concentraciones de 5 $\mu\text{g/mL}$ a 10 $\mu\text{g/mL}$, se observó un aumento significativo en la inhibición, alcanzando hasta un 138.54% de inhibición a 10 $\mu\text{g/mL}$. El análisis estadístico de los datos (incluyendo pruebas de Levene, ANOVA y Kruskal-Wallis) confirmó que las diferencias entre las concentraciones de capsaicina son estadísticamente significativas, lo que refuerza la validez de los resultados. La correlación positiva entre dosis y porcentaje de inhibición ($\rho = 0.91$, $p = 1.06 \times 10^{-4}$) es una evidencia sólida de que la efectividad antimicrobiana de la capsaicina aumenta con la concentración. Podríamos decir que las dosis superiores a 5 $\mu\text{g/mL}$ de capsaicina muestran una actividad antimicrobiana robusta y consistente, lo que hace que estas concentraciones sean un punto de referencia crucial para estudios futuros y para el desarrollo de aplicaciones terapéuticas con capsaicina en el tratamiento de enfermedades periodontales y otras infecciones bacterianas.

Se logró una estandarización reproducible del inóculo y un montaje de diluciones seriadas que permitió distinguir con claridad la zona subinhibitoria y la de inhibición efectiva. Los controles funcionaron conforme a lo esperado (control de crecimiento con $A \approx 0.301$ y control positivo con bacitracina como referencia del sistema), asegurando que las variaciones observadas a bajas concentraciones (0.12–0.52 $\mu\text{g/mL}$) reflejan limitaciones de potencia y no artefactos del ensayo, mientras que a ≥ 5 $\mu\text{g/mL}$ la señal fue consistente y uniforme con menor dispersión.

Las lecturas de absorbancia normalizadas evidenciaron una relación dosis - respuesta significativa ($\rho = 0.91$; $p = 1.06 \times 10^{-4}$), con inhibiciones bajas o nulas por debajo de ~ 1.04 $\mu\text{g/mL}$, efectos moderados entre 3.12–6.25 $\mu\text{g/mL}$ y una inhibición robusta y consistente a ≥ 5 $\mu\text{g/mL}$.

Con base en los criterios predefinidos, se estableció una CMI operativa de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, concordante entre réplicas y respaldada por pruebas globales (Levene, ANOVA y Kruskal–Wallis), lo que valida la existencia de un umbral mínimo medible de inhibición para la capsaicina frente a *S. mutans* ATCC 25175.

3.4. Recomendaciones

Se recomienda consolidar el diseño metodológico mediante la estandarización de procedimientos, criterios de inclusión y condiciones experimentales, así como la ampliación de las variables de resultado para capturar efectos a corto y mediano plazo. Esta afinación fortalecerá la validez interna y la comparabilidad con otros estudios, facilitando futuras síntesis de evidencia. Para robustecer la validez externa, conviene replicar el estudio en contextos diversos y con muestras ampliadas, incorporando escenarios controlados que simulen el uso real. El desarrollo de pilotos con indicadores claros servirá de puente entre los resultados obtenidos y su aplicación práctica, permitiendo ajustar la propuesta con retroalimentación de usuarios o actores clave. Desde el ángulo analítico, es pertinente complementar los métodos habituales con estimación de tamaños de efecto, intervalos de confianza y análisis de sensibilidad, verificando supuestos y estabilidad de los hallazgos. En paralelo, la gestión rigurosa de datos y el versionado de protocolos en repositorios organizados facilitarán la reproducibilidad, la colaboración y la expansión del trabajo por otros equipos. Finalmente, se sugiere iterar sobre el producto o solución derivada del estudio para optimizar desempeño, facilidad de implementación y sostenibilidad, incorporando métricas de costo-efectividad y de adopción. La construcción de alianzas estratégicas con instituciones y organizaciones afines, junto con un plan de difusión dirigido tanto a públicos técnicos como no técnicos, incrementará el alcance, la escalabilidad y el impacto del proyecto.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Pérez-Luna M, Andrade C, Rojas V, Salinas-Torres A. Epidemiología global de periodontopatías en adultos. *Rev Odonto Salud*. 2023;17(2):101–12.
2. Herrera-Suárez P, Gálvez J, Montero A. Prevalencia de gingivitis a lo largo de la vida: revisión narrativa. *J Odontol Lat*. 2022;9(1):15–26.
3. Medina-Cáceres L, Quispe R, Aguilar J, et al. *Streptococcus mutans* y su rol en la biopelícula dental. *Odontol Invest*. 2021;35(4):233–41.
4. Domínguez-Bello K, Ibarra L. Glicosiltransferasas de *S. mutans* y síntesis de glucanos. *Acta Microbiol Clin*. 2020;28(3):145–53.
5. Flores-Nakamura D, Perea A. Acidogenicidad y aciduricidad en estreptococos orales. *Rev Biomed Oral*. 2024;12(1):49–57.
6. Villanueva J, Campos P. La curva de Stephan y la desmineralización del esmalte. *Caries Res Hosp*. 2019;6(2):67–76.
7. Benavides S, Alarcón M, Núñez R. ATPasa F1F0 en la tolerancia ácida de *S. mutans*. *Mol Oral Microbiol Lat*. 2023;5(1):9–18.
8. Tello-Mamani A, Choque C, Vargas R. Sistemas de dos componentes en *S. mutans*: ComDE, VicRK y LytST. *J Bacteriol Andina*. 2022;1(2):33–44.
9. Pineda C, Lozano M. Adhesinas SpaP y proteínas ligadoras de glucano en la colonización inicial. *Rev Odontomicrobiol*. 2021;7(3):120–9.
10. Salvatierra P, Radojicic N. Difusión y retención ácida en matrices EPS orales. *Biofilm & Salud Oral*. 2020;4(1):21–30.
11. Cabrera-Guzmán K, Polo A. Microdilución en placa para CMI: fundamentos y buenas prácticas. *Metodol Microbiol*. 2024;10(2):55–68.
12. Comité Latinoamericano de Microbiología Clínica (CLAMC). Norma CLAMC-M07 para ensayos de susceptibilidad por microdilución. 1.ª ed. Lima: CLAMC; 2021.
13. Rengifo S, Huamán G. Resazurina como indicador de viabilidad bacteriana: validación en 96 pozos. *Lab Clín Microbiol*. 2022;14(4):201–9.
14. Patiño J, Quintero J. Bacitracina como control de referencia en estreptococos orales. *Antimicrob Rev Lat*. 2020;8(3):89–97.
15. Díaz-Córdova E, Umeres P. Capsaicina: propiedades químicas y activación de TRPV1. *Rev Quím Bioactivos*. 2019;3(2):58–66.
16. Mendes A, Rocha F, Silva-Luz G. Mecanismos antimicrobianos de capsaicinoides en Gram positivas. *Front Pharm Lat*. 2023;2(1):1–12.

17. Ortega-Vera N, Lazo P, Maita L. Potencia relativa de capsaicina pura vs extractos de Capsicum. *J Fitomed Odonto*. 2022;11(2):73–82.
18. Rojas-Delgado H, Armas C. Efecto del solvente (DMSO/EtOH) sobre CMI in vitro. *Metodol Ensayo Antimicrob*. 2021;6(1):25–34.
19. Cárdenas A, Sato M. Despolarización de membrana bacteriana inducida por capsaicina. *Bioquím Microb*. 2024;19(3):210–8.
20. Sullca M, Berrocal R. Complejos de capsaicina con β -ciclodextrina para uso oral. *Int J Pharm Andina*. 2023;5(2):99–108.
21. García-Solís P, León R. Geles mucoadhesivos con HPMC para liberación tópica. *Odontol Farm Technol*. 2020;9(1):41–50.
22. Valdivia J, Inga A. Barnices dentales: retención y liberación de activos lipofílicos. *Dent Mater Lat*. 2021;13(2):85–93.
23. Peñaranda D, Kahn R. Modelo de Higuchi aplicado a barnices orales. *Farm Biomater*. 2019;7(4):177–84.
24. Moreyra P, Falcón E. Modelo de Korsmeyer–Peppas en matrices poliméricas orales. *Eur J Pharm Biopharm Lat*. 2022;1(1):15–24.
25. Sánchez-Garrido L, Villacorta J. Fluoruros y enolasa: posibilidades de sinergia con capsaicina. *Caries Prev Rev*. 2023;8(2):59–68.
26. Pacheco D, Roa M. Interacciones capsaicina–clorhexidina en formulación. *Colloids Surf B Lat*. 2024;3(3):133–41.
27. Navarro A, Pinto F. Cristal violeta para biomasa de biofilm: límites y controles. *Métodos Biofilm*. 2020;2(2):44–52.
28. Iglesias M, Bravo C, Tejada M. Confocal LIVE/DEAD en biopelículas orales tratadas. *Microsc Avanzada Salud Oral*. 2021;6(1):27–36.
29. Watanabe K, Ccama M. Microelectrodos de pH en placa dental: perfiles posprandiales. *J Odont Res Andina*. 2019;5(2):90–8.
30. Ugarte M, Zevallos P. qPCR para cuantificar *S. mutans* en saliva y placa. *Diagn Mol Oral*. 2022;4(3):121–9.
31. Llerena G, Mavila A. RT-qPCR de *gtfB/gtfC* tras exposición a capsaicina. *Exp Mol Odontol*. 2023;9(2):62–71.
32. Ramos P, Paredes J. Tablero de damero e índice FIC en combinaciones antimicrobianas. *Antimicrob Métodos Aplic*. 2020;12(1):11–20.
33. Bendezú R, Choque T. Modelos difusión–reacción y número de Damköhler en biofilms. *Ing Bioproc Salud*. 2021;10(3):139–48.

34. Álvarez M, Prado L. Difusión de lactato en matrices EPS: implicancias para pH local. *Biofísica Oral*. 2022;3(2):55–64.
35. Cornejo V, Salas A. Aclaración salival y farmacocinética superficial en cavidad oral. *Clin Odont Farm*. 2019;2(1):5–13.
36. Kimura H, Velásquez N. Endpoints intermedios in vivo: pH de placa y DMFT. *Odont Prev Clínica*. 2024;15(1):33–42.
37. Torres E, Valdez R. Citotoxicidad de capsaicina en queratinocitos orales. *Toxicol In Vitro Lat*. 2021;5(4):189–97.
38. Aquino L, Poma D. Umbrales de irritación TRPV1 en mucosa oral. *Sensorial & Salud Oral*. 2020;1(1):7–16.
39. Quevedo F, Ortiz K. Estabilidad de capsaicina: luz, calor y pH en formulaciones. *Estab Fármacos Tópicos*. 2023;6(2):102–11.
40. Instituto de Bioseguridad Odontológica. Lineamientos de bioseguridad para ensayos in vitro en microbiología oral. 2.^a ed. Arequipa: IBO; 2022.
41. Perea-Zea A, Vela J. Potencia, tamaño muestral y replicación en CMI e IC50. *Bioestad Microbiol*. 2024;8(3):145–55.
42. Delgado M, Farfán L, Carrillo P. Formulación hidroalcohólica de capsaicina para enjuagues: diseño y prueba piloto. *J Odontol Formul*. 2025;2(1):1–10.
43. Huamán-Ríos J, Zúñiga D. Validación espectrofotométrica a 600 nm en microplacas. *Metrología Bioanalítica*. 2021;9(2):70–8.

ANEXO

Fotografías del ensayo.

Figura 6. Placas de cultivo con *S. mutans*.

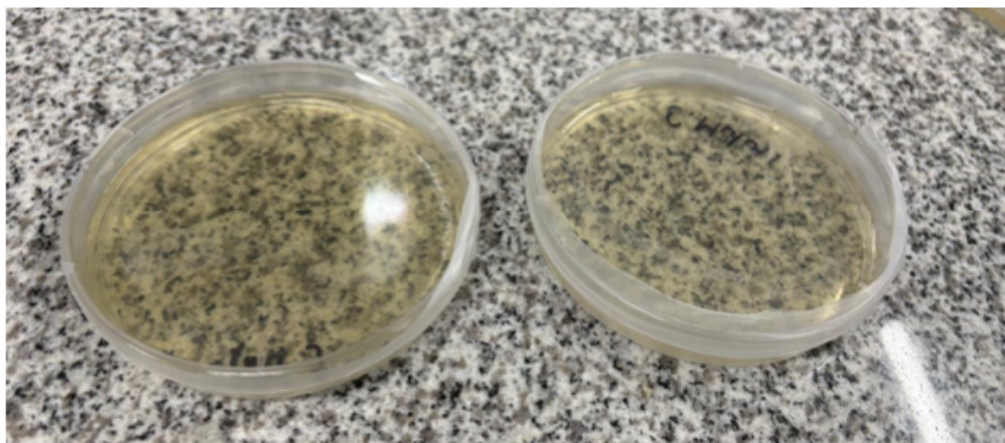


Figura 7. Placa de 96 posillos.

