

35

Fecha de presentación: junio, 2024
Fecha de aceptación: noviembre, 2024
Fecha de publicación: diciembre, 2024

APLICACIÓN MANOVA

DE DOS VÍAS DE MEDIDAS REPETIDAS: INTERACCIÓN DE GOMAS MASCAR Y EL TIEMPO DE MASTICACIÓN EN LA CAVIDAD ORAL

TWO-WAY REPEATED MEASURES MANOVA APPLICATION: INTERACTION OF CHEWING GUMS AND CHEWING TIME ON SALIVARY FUNCTION

Miriam Verónica Lima Illescas ^{1*}

E-mail: mlima1925@utm.edu.ec

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6844-3826>

Víctor Ernesto Márquez Pérez ²

E-mail: victor.marquez@utm.edu.ec

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2458-2415>

Andrea Karina Maurat ¹

E-mail: andrea.maurat@ucacue.edu.ec

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6878-6466>

¹ Universidad Católica de Cuenca. Ecuador.

² Universidad Técnica de Manabí. Ecuador.

*Autor para correspondencia

Cita sugerida (APA, séptima edición)

Lima Illescas, M. V., Márquez Pérez, V. E. & Karina Maurat, A. (2024). Análisis multivariante de varianza MANOVA de dos vías en medidas repetidas para datos longitudinales. *Universidad y Sociedad*, 16(S2), 314-321.

RESUMEN

El Análisis Multivariante de Varianza (MANOVA) de dos vías en medidas repetidas cuantifican las respuestas en diferentes momentos sobre los mismos sujetos, para ejecutarlo debe cumplir ciertos requisitos. El objetivo fue aplicar el MANOVA de medidas repetidas para determinar cambios variables en el tiempo, con efectos fijos, en el recuento de unidades formadores de colonias por ml (UFC/ml) del *Streptococcus grupo viridans* (SV) y el flujo salival (FS). Se realizó un ensayo clínico aleatorio, paralelo y doble ciego, en 36 estudiantes en edades comprendidas de 18 a 25 años de edad. Se formaron cuatro grupos de acuerdo a diferentes gomas de mascar y se evaluó a nivel basal y a los 30 min. La decisión fue significativa con una consideración del 5% ($p < 0,05$). No existió interacción significativa entre los factores (SV y FS) con el grupo de goma de mascar, sin embargo, evidenció interacción significativa del SV y FS entre el tiempo basal y después de los 30 minutos. El MANOVA de dos vías en medidas repetidas identificó que el factor tiempo de masticación de gomas de mascar por 30 minutos, produce una considerable reducción de microorganismos orales en un 67% y en un 50% un aumento del FS.

Palabras clave: Salud, Flujo, PH, Análisis estadístico, Estudiante adulto.

ABSTRACT

The two-way repeated measures Multivariate Analysis of Variance (MANOVA) quantifies responses at different times on the same subjects and must meet certain requirements to be performed. The objective was to apply repeated measures MANOVA to determine time-varying changes, with fixed effects, in *Streptococcus viridans* group (SV) colony-forming unit count per ml (CFU/ml) and salivary flow (SF). A randomized, parallel, double-blind clinical trial was conducted in 36 students aged 18 to 25 years. Four groups were formed according to different chewing gums and assessed at baseline and at 30 min. The decision was significant with a consideration of 5% ($p < 0.05$). There was no significant interaction between the factors (SV and FS) with the chewing gum group, however, it evidenced significant interaction of SV and FS between basal time and after 30 min. The two-way repeated measures MANOVA identified that the factor chewing time of chewing gum for 30 minutes produced a considerable reduction of oral microorganisms by 67% and an increase in FS by 50%.

Keywords: Health, Flow, PH, Statistical analysis, Adult students.

INTRODUCCIÓN

El análisis multivariante de la varianza (MANOVA) es una técnica de análisis de datos que puede utilizarse en investigaciones en diferentes campos de la educación y la salud (Pursitasari et al., 2024). Las medidas repetidas o datos longitudinales conciernen a experimentos que se cuantifican las respuestas en diferentes momentos (Vargas et al., 2023). El MANOVA de dos vías contribuye en la determinación de diferencias estadísticas significativas en la interacción del efecto de dos factores intra-sujetos de diferentes niveles sobre variables explicativas continuas.

Para el uso de este análisis debe cumplir las siguientes suposiciones tales como, la inexistencia de valores atípicos significativos; debe existir normalidad multivariante, esto puede comprobarse a través de la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk o Kolmogorov Smirnov que va de acuerdo al número de réplicas dentro de cada grupo y, por último, la suposición de esfericidad que se obtiene por la varianza de las diferencias entre grupos, los mismo que deben ser iguales y esto puede comprobarse utilizando la prueba de esfericidad de Mauchly (Vallejo & Lozano, 2006).

El resultado de este análisis de dos vías permite obtener las interacciones post- hoc significativas: el primero corresponde a un efecto principal simple que corresponde un modelo de una vía del primer factor en cada nivel del segundo factor y posteriormente las comparaciones simples por pares que se ejecuta con la presencia del efecto principal simple significativo, se realiza múltiples comparaciones por pares para determinar las diferencias entre grupos. La inexistencia de una interacción significativa de dos vías, se debe determinar por la presencia de algún efecto principal estadísticamente significativo a partir del resultado del análisis de la varianza (ANOVA).

Los valores p se ajustan mediante el método de corrección de pruebas múltiples de Bonferroni. Los microorganismos bucales causan enfermedades por una sinergia e interacciones entre especies orales, especialmente del género de *Streptococcus* que se encuentran en alta proporción en tejidos blandos, saliva y lengua (Hamalaw et al., 2021). Por otro lado, la reducción de la cantidad de la secreción salival (hiposalivación), el pH, la viscosidad, el flujo salival y la composición de la saliva puede ser responsables de problemas orales y en los órganos dentales como la caries dental y la enfermedad periodontal (Quritum et al., 2022). Sin embargo, el consumo de gomas de mascar, en las que se incorporan agentes terapéuticos pueden contribuir a efectos beneficiosos tales como, disminución de la incidencia de caries dental, aumento en la tasa de

flujo salival, aumento en el pH salival y en la capacidad amortiguadora (Lima et al., 2022; Muñoz et al., 2022). A través de un ejemplo se interpreta el uso de MANOVA de dos vías en medidas repetidas para datos longitudinales y conocer la interacción significativa bidireccional entre los factores goma de mascar y el tiempo de consumo en la variable continua del recuento de unidades formadoras de colonias por milímetro (UFC/ml) del *Streptococcus grupo viridians* (SV) y el flujo salival (FS) en individuos sistémicamente sanos.

MATERIALES Y MÉTODOS

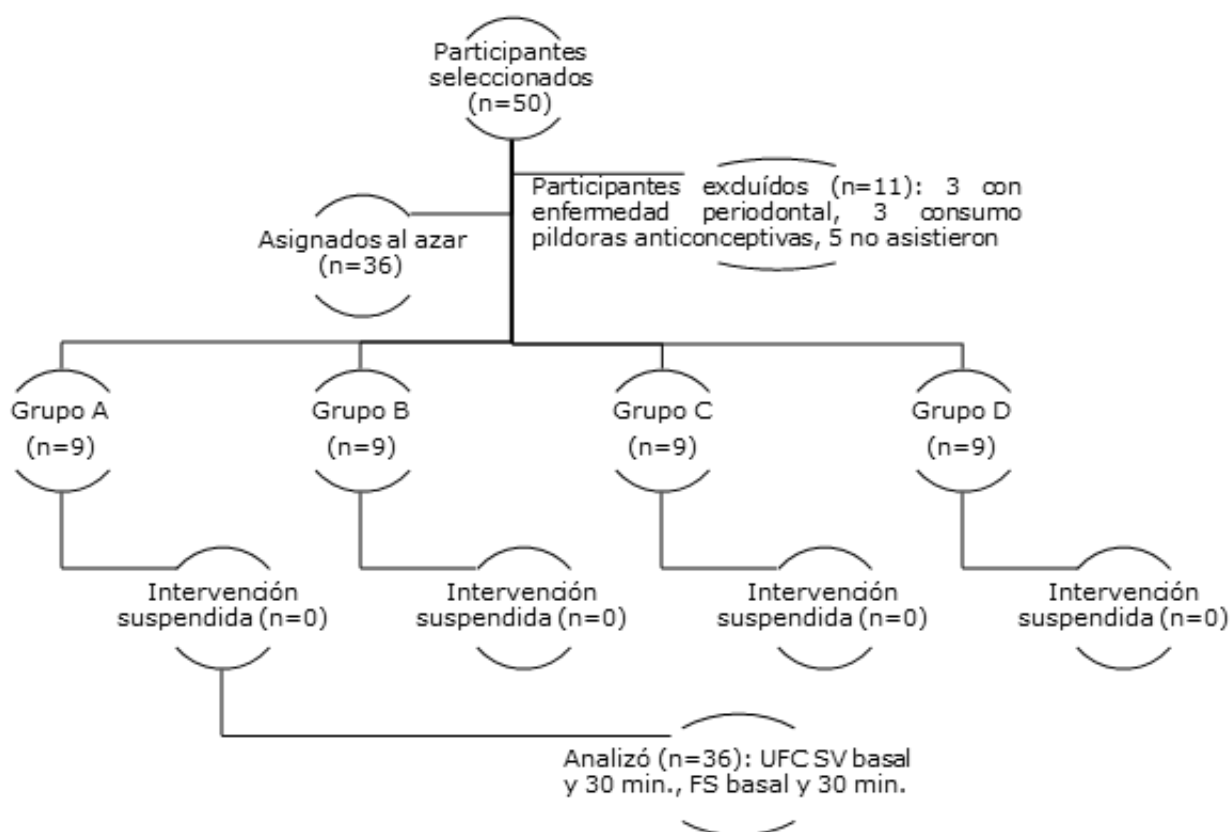
El estudio fue ensayo clínico aleatorio, con un diseño paralelo, doble ciego y longitudinal con estudiantes voluntarios de la carrera de Odontología de la Universidad Católica de Cuenca, en edades comprendidas de 18 a 25 años de edad. El protocolo de investigación fue aprobado por el Comité de Investigación en Seres Humanos de la Universidad Católica de Cuenca bajo el código CEISH-UCACUE-2023-165.

Para el tamaño de la muestra se usó la fórmula de contraste de hipótesis para proporciones, con un nivel de confiabilidad del 95%, un poder estadístico del 80%, con una proporción para el grupo control del 21% y del 82% para el grupo de intervención (Aksoy et al., 2007), con un total de 9 sujetos en cada grupo.

Los participantes cumplieron con los criterios de inclusión: presentar mínimo 20 piezas dentales, que proporcionen el consentimiento informado y cumplir con los procedimientos del estudio, y estar sistémicamente sanos; mientras que los criterios de exclusión fueron participantes que se encuentre con terapia antibiótica o flúor en el último mes, consumidores habituales de productos y enjuagues bucales que contengan xilitol o sorbitol, con flujo salival anormal (<1 ml/min), embarazadas o con tratamiento de píldoras anticonceptivas o con trastornos de alimentación (anorexia y bulimia); sujetos con enfermedad periodontal o presencia de caries dental activa.

Se estimó 36 participantes (unidades experimentales). Los participantes fueron clasificados de manera aleatoria en cuatro grupos en total, tres grupos según el consumo de gomas de mascar y un grupo control: Grupo A fue parafina; Grupo B presenta sorbitol, xilitol, jarabe de maltitol, manitol, edulcorante como el aspartamo y saborizantes artificiales y naturales; Grupo C contiene xilitol, vegetales, glicerina, aromas naturales de menta y goma de lecitina de girasol y carnauba; y Grupo D que contiene azúcar, dextrosa, glucosa, varios edulcorantes y saborizantes artificiales, con 9 réplicas en cada grupo, el diagrama de flujo se muestra en la figura 1.

Fig 1. Diagrama de flujo del estudio.



Fuente: elaboración propia.

Se realiza un examen clínico simple con ayuda de un set de diagnóstico y un frontoluz para corroborar que no presente lesiones cariosas activas, enfermedad periodontal o presencia de placa bacteriana y se brinda información de la toma de las muestras salivales (AKM), tales como: la toma de muestra ocurre entre las 08h00 y 10h00, los participantes no debían haber ingerido ningún alimento, fumar o cepillarse los dientes al menos una hora previa a la toma de la muestra.

La aleatorización se estableció mediante un programa informático (*Random Allocation Software, versión 2.0*) y se mantuvo confidencial a través de sobres oscuros numerados efectuado un investigador que no participó en la recolección de los datos. Los participantes se distribuyeron aleatoriamente en cuatro grupos, efectuado por otro investigador y tomó las muestras salivales no estimuladas basales y después de 30 minutos. Los participantes recibieron un calendario de las fechas de la toma de muestras e información del contacto del investigador responsable de la aleatorización para permitir consultas en caso de ser necesarias.

Antes de la toma de muestras salivales, los tubos falcon y embudos fueron previamente esterilizados y pesados.

El nivel del pH salival fue medido inmediatamente luego de la obtención de la muestra salival basal (no estimulada) y después de los 30 minutos del consumo de la goma de mascar (estimulada) a través del potenciómetro sobremesa (BOECO-BT-675) debidamente calibrado y operativo según las indicaciones del fabricante.

El flujo salival fue evaluado inmediatamente después de la toma de muestra salival según el protocolo de la Facultad de Odontología de la Universidad del Sur de California (Navazesh & Kumar, 2008), se obtuvo restando el valor del peso del tubo falcon con la muestra salival y el valor del peso del tubo falcon, dividido para el periodo de recolección, así se obtiene el valor del flujo salival en gramos por minuto (g/min.), para obtener el peso del tubo se utilizó la balanza analítica (Boeco) previamente calibrada.

Los recuentos de UFC fueron realizados en el laboratorio de microbiología mediante un contador (ISOLAB), los tubos falcon fueron llevados en gradillas dentro de una caja transportadora, las muestras se agitaron en un vortex (VORTEX MIXER) durante 30 segundos, luego se realizó la dilución de la saliva a 1:10, 1:100 y 1:1000 con solución salina isotónica estéril. Luego se sembró 100 µL de cada disolución en Agar Mitis Salivarius (MSA). A continuación, se incubaron a 35°C en condiciones de anaerofilia por 48 horas, transcurrido este tiempo se procedió a contabilizar las UFC a través de la prueba de aislamiento y cuantificación de SV presente en saliva, las muestras sospechosas para *Streptococcus mutans* (SM) se procesaron mediante la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y fueron negativos.

De cada participante se obtuvo dos muestras salivales una basal (no estimulada por un periodo de 5 min.) y a los 25 minutos (saliva estimulada por 5 minutos) por el método de drenaje sobre el tubo falcon y el embudo. Primero se solicitó que se enjuague la boca con agua desionizada con la finalidad eliminar cualquier resto de alimento (Aitken et al., 2013), posteriormente se acomodó en una silla en una posición vertical con la cabeza inclinada ligeramente hacia adelante y los ojos abiertos (Navazesh & Kumar, 2008) y se recogió la muestra de saliva basal (Navazesh, 1993). Posteriormente se entregó otro tubo falcon y se indicó que masticará la goma durante 25 minutos y a partir de este tiempo drene la saliva estimulada durante 5 minutos y al final se desechó la goma de mascar en el tubo.

Los investigadores del estudio recibieron formación de profesionales experimentados sobre la calibración y manejo de los equipos, así como evaluación de los parámetros salivales y recuento de UFC/ml del SV, calibración culminó cuando se alcanzó la comprensión y coherencias de los parámetros evaluados. Se ejecutó una prueba piloto con sujetos que no pertenecen a la muestra del estudio.

Se usó estadística descriptiva para los análisis de los datos, se calculó medidas de tendencia central y dispersión. Se utilizó la prueba Shapiro Wilk para verificar la normalidad de los datos. La prueba T de Student para datos emparejados, se usó para comparar la diferencia de UFC/ml de SV y FS en dos periodos de tiempo, para la comparación múltiple entre parejas se usó la prueba post-hoc de Bonferroni. La decisión fue significativa con una consideración del 5% ($p < 0,05$). La edición de las tablas fue ejecutada en Microsoft Excel, 2015 y el procesamiento de la información y gráficos se ejecutó en el programa SPSS (en inglés Statistical Package for the Social Sciences) versión 25.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se realiza el análisis en 36 participantes con 9 réplicas dentro de cada grupo de gomas de mascar (A, B, C y D). La edad promedio de los estudiantes fue 21,7 años.

Se verifica el cumplimiento de los requisitos para usar el MANOVA de medidas repetidas como fue la normalidad de los datos, prueba de homogeneidad de matriz de covarianzas y la existencia de esfericidad (diferencias de variaciones intragrupalas sean iguales) esta última no fue posible determinar por la presencia de dos periodos de tiempo.

En la tabla 1 se observa, que el tiempo de 30 minutos en el consumo de gomas mascar muestra diferencias significativas en la reducción del recuento de UFC/ml de SV, mientras que para el flujo salival mostró un aumento ($p < 0,001$).

Tabla 1. Medidas descriptivas del SV y FS.

Tiempo	Basal		30 min.		p
	Media	DE	Media	DE	
UFC/ml SV	2283,89	1756,39	907,86	825,72	0,001*
Flujo salival (g/min.)	0,66	0,35	1,15	0,51	0,001*

Fuente: elaboración propia.

La tabla describe las media y desviación estándar (DE) de las variables respuesta continuas. Se usa la prueba T de Student para datos emparejados, * $p < 0,05$.

A nivel basal, el promedio del UFC/ml del SV fue mayor y similar para los grupos A y D, sin embargo, después de los 30 min., fue mayor las UFC/ml para el grupo A y menor fue para el grupo C, muestra diferencias estadísticamente significativas para todos los grupos ($p < 0,05$) excepto para el B, se muestra en la tabla 2. En el flujo salival a nivel basal es

mayor para el grupo A y menor en el grupo C, y después de los 30 min., se mantiene aumentado en el grupo A y menor fue para el grupo D, exhibe diferencias estadísticamente significativas para todos los grupos ($p < 0,05$).

Tabla 2. Comparación de las mediciones del RUC del SV y flujo salival (basal - 30 min.), según el grupo de gomas de mascar.

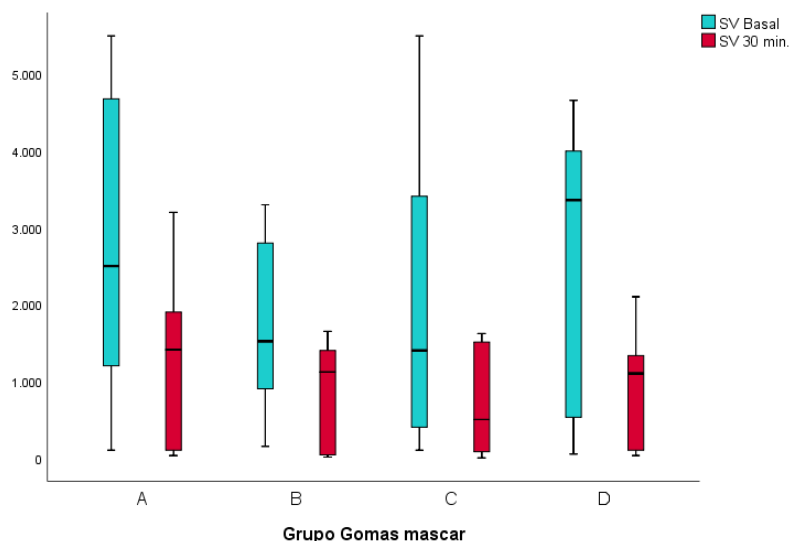
Grupos de gomas de mascar	SV basal(I)		SV 30 min (J)		MANOVA	
	Media	DE	Media	DE	Diferencia de medias (I-J)	p
A (n=9)	2642,22	2005,62	1230	1083,36	1412,22	0,006*
B (n=9)	1771,11	1093,63	840	725,51	931,11	0,062
C (n=9)	2117,78	2066,28	731,11	728,61	1386,66	0,007*
D (n=9)	2604,44	1849,74	830,33	766,94	1774,11	0,001*
	Flujo salival basal (I)		Flujo salival 30 min (J)			
A (n=9)	0,78	0,50	1,34	0,66	0,562	0,001*
B (n=9)	0,61	0,25	1,18	0,54	0,576	0,001*
C (n=9)	0,56	0,37	1,05	0,50	0,492	0,001*
D (n=9)	0,68	0,24	1,01	0,30	0,325	0,036*

La tabla describe las comparaciones de las variables respuesta con los dos factores tiempo (basal y 30 min.) y el tipo de consumo de gomas de mascar, tamaño de la muestra (n), desviación estándar (DE), * $p < 0,05$.

Fuente: elaboración propia.

En la figura 2 muestra la diferencia marcada en el UFC del SV basal y 30 min, se observa una disminución significativa a los 30 min., para todos los grupos de gomas de mascar.

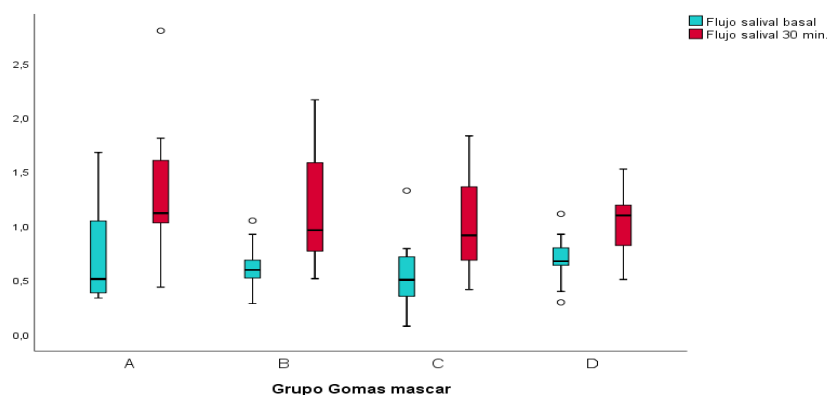
Fig 2. Comparación de las medias del UFC del SV basal y 30 min., según el grupo de goma de mascar.



Fuente: elaboración propia.

En la figura 3 se observa los promedios de UFC/ml del Streptococcus grupo viridians fue menor en los 30 min. posteriores en todos los tipos de gomas de mascar.

Fig 3. Comparación de las medias del UFC del SV basal y 30 min., según el grupo de goma de mascar.



Fuente: elaboración propia.

En la figura 3 se observa los promedios del FS (g/min.) fue mayor a los 30 min. en todos los tipos de gomas de mascar.

No existe interacción significativa entre los factores (SV y FS) con el grupo de goma de mascar, sin embargo, existe interacción significativa del SV y FS entre el tiempo basal y después de los 30 minutos. Existe un efecto principal en el UFC del SV con $p < 0,001$ y el 67% ($n_2=0,665$) explica la disminución de las UFC del SV después de los 30 min., por otro lado, el FS con $p < 0,001$ y el 50% ($n_2=0,50$) explica el aumento del flujo salival después de los 30 min., se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Interacción de los efectos intra-sujetos.

	gl	F	p	Eta parcial cuadrado
SM	1	63,397	0,001*	0,665
SM*Goma	3	0,507	0,680	0,045
FS	1	32,548	0,001*	0,504
FS*Goma	3	0,514	0,676	0,046
SM*FS	1	32,589	0,001*	0,505
SM*FS*Goma	3	0,513	0,676	0,046

Fuente: elaboración propia.

La tabla 3 describe las interacciones de los efectos de los factores y las variables continuas respuesta, grados de libertad (gl), ratio F (F), $*p < 0,05$, y el Eta parcial cuadrado explica la varianza explicada por ese factor.

El estudio corresponde a un diseño de medidas repetidas donde se mediciones de dos variables respuesta (UFC/ml de SV y FS) en diferentes periodos de tiempo (basal y 30 min.) y en diferentes condiciones de consumo de gomas de mascar (variables explicativas) sobre el mismo sujeto, por tanto, evaluar el efecto de interacción de dos factores dentro del sujeto para explicar la variable respuesta continua fue a través del Análisis MANOVA de medidas repetidas.

Primero se establece el cumplimiento de suposiciones, se presenta valores atípicos no significativos (Figura 2); existe normalidad multivariante a través de la prueba Shapiro-Wilk ($p > 0,05$) y no se establece las diferencias de variaciones intergrupales a razón de la presencia de dos niveles en el tiempo.

Las propiedades mecánicas de la goma de mascar diluyen los efectos de las bacterias orales y mejoran potencialmente el flujo salival (Róna et al., 2023). La cuantificación del SM favorece la identificación de grupos con riesgo de padecimiento de caries dental, valores superiores a 100 mil UFC/ml de SM en saliva se considera como riesgo alto de caries dental (Muñoz et al., 2022). Los participantes del estudio fueron individuos sistémicamente sanos y sin caries activas, muestran diferencias significativas ($p < 0,001$) con una reducción del recuento de UFC/ml de SV en un periodo

de 30 minutos, similares resultados son obtenidos para el promedio del FS (Tabla 1), es decir, la acción de masticación (barrido mecánico) redujo la cantidad SV y FS, las pruebas de PCR determina ninguna muestra salival con SM, lo que correlaciona con la investigación al ser participantes sin caries activas.

Especialmente masticar gomas de mascar sin azúcar proporcionan un complemento para la higiene bucal, con bajo costo en relación a otras medidas preventivas (Miller et al., 2022). Se destacan gomas de mascar que contiene xilitol con excelentes beneficios sobre los niveles salivales de SM y la prevención de caries dental en niños (Nasseripour et al., 2021), ya que el xilitol no puede ser metabolizado activamente por el SM, por ende, no produce una disminución del pH salival por la producción de ácido láctico.

Sin embargo, en el presente estudio, el grupo A (control con parafina), el grupo B (goma de mascar sin azúcar), grupo C (goma de mascar con xilitol) y el grupo D (con azúcar), no muestran diferencias significativas según el compuesto de la goma de mascar, coincidiendo con Rafeek et al. (2019).

Contradiendo los resultados de investigaciones favorables por las gomas de mascar a base de xilitol, pueden ser por la recomendación de consumo tres veces diarias (Podunavac et al., 2021), 5 a 10 mg (adultos) como dosis diaria de gomas de mascar con xilitol (Nasseripour et al., 2021) a largo de plazo (1 año), constituye un método eficaz para la prevención de caries dental (Cocco et al., 2020), incluso sobre el recuento de SM puede ser potencialmente duradero, con pruebas que sugieren que disminuye la carga bacteriana oral hasta cinco años, después de 2 años de consumo (Nasseripour et al., 2021).

El análisis MANOVA de medidas repetidas permite concluir que el único factor tiempo (30 min. de masticación) produjo un efecto con reducción del SV y aumento del flujo salival. El factor tiempo es considerado como una variable longitudinal con resultados favorables para regular los niveles salivales (Matthews, 2015). Para las comparaciones múltiples se utiliza la corrección de Bonferroni con la finalidad de minimizar el riesgo de falsos positivos (controlar la tasa de error tipo I), es decir estos errores ocurren cuando se rechaza incorrectamente una hipótesis nula que en realidad es cierta (Francis & Thunell, 2021) but it has some unintended effects. In particular, the compound Type I error rate for multiple studies (the likelihood of concluding that an effect exists when it does not.

Algunas limitaciones del estudio, está dado por la población, que estaba conformada por estudiantes de la carrera de odontología, que tienen conocimientos previos de

salud bucodental, y no se incluye otros individuos participantes, además por el número de sujetos no se puede generalizar los resultados a la población general para este grupo de edad.

Se recomienda realizar más estudios y a un largo plazo, para identificar los beneficios orales y encontrar verdaderas diferencias en la composición de las gomas de mascar, además de adecuados protocolos para la medición y obtención de los datos con la finalidad de usar análisis robusto y determinar verdaderos efectos en las variables.

Esta investigación forma parte del proyecto de investigación denominado: "Efecto de gomas de mascar a base de xilitol, no azucarada y azucaradas sobre el flujo y el pH salival en adultos jóvenes: Ensayo clínico controlado aleatorio", correspondiente a la VII convocatoria de Proyectos de Investigación, con código PICVII19-41 de la Universidad Católica de Cuenca.

CONCLUSIONES

Los resultados muestran una disminución significativa en el recuento de UFC/ml de *Streptococcus viridans* (SV) y un aumento en el flujo salival después de 30 minutos de masticación en todos los tipos de goma de mascar. Este efecto fue independiente del tipo de goma utilizada, sugiriendo que el acto de masticar contribuye a mejorar estos parámetros de salud bucal.

El análisis MANOVA de medidas repetidas identifica al tiempo (30 minutos) como un factor significativo en la reducción del conteo de SV y el incremento del flujo salival, sin interacción significativa entre los tipos de goma de mascar y las variables de respuesta. Este hallazgo subraya la relevancia del tiempo de masticación más que del tipo de goma en los cambios observados.

La muestra del estudio se limita a estudiantes de odontología, quienes tienen conocimientos previos sobre salud bucal, y el tamaño reducido de la muestra restringe la capacidad de generalizar los hallazgos a una población más amplia. Esto destaca la necesidad de investigaciones adicionales con muestras más diversas para validar estos efectos.

Los resultados sugieren la necesidad de realizar estudios a largo plazo y con un mayor tamaño de muestra para investigar los efectos de diferentes tipos de goma de mascar, especialmente aquellas con xilitol, en la salud bucal. Además, se recomienda la implementación de protocolos de medición más robustos para establecer la eficacia de estos productos en la reducción de bacterias orales y el flujo salival.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aitken, J., Maturana, A., Morales, I., Hernández, M., & Rojas-Alcayaga, G. (2013). Estudio de confiabilidad de la prueba de sialometría para flujo no estimulado en sujetos adultos clínicamente sanos. *Rev. Clin. Periodoncia Implantol. Rehabil. Oral*, 6(1), 25-28. <https://scielo.conicyt.cl/pdf/piro/v6n1/art05.pdf>
- Aksoy, A., Duran, N., Toroglu, S., & Koksall, F. (2007). Short-term effect of mastic gum on salivary concentrations of cariogenic bacteria in orthodontic patients. *Angle Orthodontist*, 77(1), 124-128. <https://doi.org/10.2319/122205-455R.1>
- Cocco, F., Cagetti, M. G., Majdub, O., & Campus, G. (2020). Concentration in saliva and antibacterial effect of Xylitol chewing gum: In vivo and in vitro study. *Applied Sciences (Switzerland)*, 10(8). <https://doi.org/10.3390/APP10082900>
- Francis, G., & Thunell, E. (2021). Reversing Bonferroni. *Psychonomic Bulletin and Review*, 28(3), 788-794. <https://doi.org/10.3758/s13423-020-01855-z>
- Hamalaw, S. J., Kareem, F. A., & Gul, S. S. (2021). Association of dental and gingival health status with level of salivary characteristics and Streptococcus mutans in children. *Journal of Dental Sciences*, 16(2), 744-750. <https://doi.org/10.1016/j.jds.2020.08.006>
- Lima, M., Jiménez, D., Porras, C., Maurat, K., & Álvarez, D. (2022). Efectos de azúcares totales sustitutos de sacarosa en la salud bucal. Revisión bibliográfica. *Revista Eugenio Espejo*, 16(2), 101-113. <https://eugenioespejo.unach.edu.ec/index.php/EE/article/view/331/124>
- Matthews, F. (2015). The use of sugar free chewing gum as a supplement in the prevention of dental caries. Narrative Review. *J Oral Res*, 4(2), 129-136. <https://doi.org/10.17126/joralres.2015.026>
- Miller, C. S., Danaher, R. J., Kirakodu, S., Carlson, C. R., & Mumper, R. J. (2022). Effect of chewing gum containing Xylitol and blackberry powder on oral bacteria: A randomized controlled crossover trial. *Archives of Oral Biology*, 143. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2022.105523>
- Muñoz, L. F., Uribe, A. M., Reyes, M. C., Castro, L. A., & Rodríguez, M. J. (2022). Salivary Streptococcus mutans colony-forming unit count in patients with and without orthodontic appliances. *Acta odontológica latinoamericana*, 35(3), 171-177. <https://doi.org/10.54589/aol.35/3/171>
- Nasseripour, M., Newton, J. T., Warburton, F., Awojobi, O., Di Giorgio, S., Gallagher, J. E., & Banerjee, A. (2021). A systematic review and meta-analysis of the role of sugar-free chewing gum on Streptococcus mutans. *BMC Oral Health*, 21(1), 1-11. <https://doi.org/10.1186/s12903-021-01517-z>
- Navazesh, M. (1993). Methods for Collecting Saliva. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 20(694), 72-77. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8215087/>
- Navazesh, M., & Kumar, S. (2008). Measuring salivary flow. *The Journal of the American Dental Association*, 139, 35-40S. <https://doi.org/10.14219/jada.archive.2008.0353>
- Podunavac, I., Hinić, S., Kojić, S., Jelenčiakova, N., Radonić, V., Petrović, B., & Stojanović, G. M. (2021). Microfluidic platform for examination of effect of chewing xylitol gum on salivary pH, O₂, and CO₂. *Applied Sciences (Switzerland)*, 11(5), 1-12. <https://doi.org/10.3390/app11052049>
- Pursitasari, I. D., Harianto, B., Wulan, S. S., Hermanto, D., & Ardianto, D. (2024). Multivariat Analysis Of Variance (MANOVA) Di Bidang Kesehatan Dan Pendidikan MIPA. *Jurnal Ilmiah Kanderang Tingang*, 15(1), 117-126. <https://doi.org/10.37304/jikt.v15i1.307>
- Quritum, S. M., Ali, A. M., Raouf, M. M., Omar, T. E. I., & Dowidar, K. M. L. (2022). Evaluation of salivary parameters and Streptococcus' Mutans count in children with cerebral palsy in Egypt: a case control study. *BMC Oral Health*, 22(1), 1-12. <https://doi.org/10.1186/s12903-022-02447-0>
- Rafeek, R., Carrington, C., Gomez, A., Harkins, D., Torralba, M., Kuelbs, C., Addae, J., Moustafa, A., & Nelson, K. (2019). Xylitol and sorbitol effects on the microbiome of saliva and plaque. *Journal of Oral Microbiology*, 11(1). <https://doi.org/10.1080/20002297.2018.1536181>
- Róna, V., Bencze, B., Kelemen, K., Végh, D., Tóth, R., Kói, T., Hegyi, P., Varga, G., Rózsa, N. K., & Géczi, Z. (2023). Effect of Chitosan on the Number of Streptococcus mutans in Saliva: A Meta-Analysis and Systematic Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(20). <https://doi.org/10.3390/ijms242015270>
- Vallejo, G., & Lozano, L. M. (2006). Modelos de análisis para los diseños multivariados de medidas repetidas. *Psicothema*, 18(2), 293-299. <https://reunido.uniovi.es/index.php/PST/article/view/8508>
- Vargas, J., Vargas, A., & Corrales, E. (2023). Experimentos agrícolas con medidas repetidas en el tiempo: comparación entre estrategias de análisis. *Agronomía Mesoamericana*, 34(2). https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S1659-13212023000200022&script=sci_abstract&lng=es