



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**EFEECTO ANTIMICROBIANO DE DERIVADOS DE α - Y β -
AMIRINA, PROVENIENTES DE FUENTES NATURALES
CONTRA BACTERIAS DE LA CAVIDAD ORAL**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA

DAVID HERNÁNDEZ PÉREZ



MÉXICO, D.F.

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dr. Rodolfo Pastelin Palacios

VOCAL: Dr. José Fausto Rivero Cruz

SECRETARIO: Dra. Gloria Díaz Ruiz

1er. SUPLENTE: Q.F.B. Martha Giles Gómez

2° SUPLENTE: M. en C. Beatriz Ruíz Villafan

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: Laboratorio 324, Edificio E

Facultad de Química, UNAM

ASESOR DEL TEMA

Dra. Gloria Díaz Ruiz

SUPERVISOR TÉCNICO

Dr. Arturo Navarro Ocaña

SUSTENTANTE

David Hernández Pérez

Agradecimientos

A la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México por haberme dado la oportunidad de ser parte de ella, por haberme formado en lo profesional y brindarme los elementos necesarios para empezar mi camino hacia el éxito.

A la Dra. Gloria Díaz Ruíz por todos sus consejos, su apoyo, asesoría y comprensión durante todo el proyecto, gracias.

Al Dr. Arturo Navarro Ocaña por la asesoría constante durante todo el proyecto.

A la Dra María del Carmén Wachter Rodarte por su valioso tiempo y recomendaciones hechas durante mi tesis.

A los miembros del jurado por el tiempo dedicado a la revisión del presente trabajo y por sus observaciones para poder mejorarlo.

Al Dr. Luis Manuel Perea, el Dr. José Fausto Rivero Cruz y a la Dr. Teresita Sainz por brindarme las cepas con las que se realizó este proyecto.

Al ICYTDF por el financiamiento parcial para el desarrollo de este proyecto, Proyecto PICS08-40-ICYTDF.

Dedicatorias

A mi mamá, Rocío, por todo el apoyo que me ha brindado, amor y comprensión, por aminorar mis penas y soportar mis enojos. Gracias mami porque cada palabra escrita en este trabajo te la debo a ti. (I turn to you)

A mi Ita y a mi Ata, por sus palabras de aliento en los momentos más difíciles, por quererme tanto y haberme enseñado a través de sus consejos a ser mejor persona. (On the way down)

A mis hermanos Felipe, Isaac y Javier, por ser mis compañeros de juegos, mis guardianes, mis amigos y aunque a veces solíamos pelear tarde o temprano solucionábamos las cosas. Los quiero. (Fix you)

A mi papá, Felipe, por cada momento que hemos compartido, por los consejos y las llamadas de atención, por cada sonrisa que hemos compartido. Gracias Pa. (I love you this much)

A Santiago y Sofía, pues me siento tan afortunado por tenerlos como sobrinos.

A Solovino, por su lealtad y compañía, por haberte ganado mi corazón en tan poco tiempo y haberte quedado ahí por siempre.

A Gaby, de mis mejores amigas, la que ha compartido más tiempo conmigo, te quiero tanto. (La amistad)

A Mariana, Priscila, Arturo, Checo, Almanza y Pinto, pues la última vez que hicimos cuentas eran ya 9 años de ser amigos y el día de hoy el tiempo sigue corriendo. (Fast car)

A mis amigas y amigos de la barda, de las mejores personas que conocí en la Fac, Aurora, Azalia, Gris, Karla, Kika, Jimena, Juliana, María, Noemí, Paloma y Paulina, gracias por ser parte de esta historia; a Tania y Karla, por su amistad y asesoría química en mis primeros semestres; a Ceci y Adrián, mis mejores amigos ingenieros en ambos planes; a Arizmendi, Chava, Isaac, Mota, Odín, Omar, Oscar

Roberto y Rodas, amigos casi desde el primer semestre; a Chucho y Pancho, pues más que amigos son como hermanos. Gracias, por las fiestas, las historias y por hacer de esta época una de las mejores de mi vida. (Bellísima/El ataque de las chicas cocodrilo)

A Dan, por estar en las buenas y en las malas, por darme aliento y algunas veces darme asilo. 6 años y los que nos faltan amigo. Gracias por enseñarme tantas razones por las que esta vida es maravillosa, pues ahora creo entender un poco más de ella. (Crash & Burn)

A mis amigos y colegas, Adri, Ana (J), Angie, Ale (G), Caro (H), Fer (A), Fer (con todo y las pipetas), Fris, Gaby, Karla (F), Karla (M), Lili, Liz, Marianne, Marysol, Sandra, Selene, Soni y Vero; a Ale (M), Bren, Elvia, Lore, Marlen y Vicky; a Ale, Betty, César, Eri, Jacki, Lau, Linda, Mar, Rocka, Val y Xanic, por ser mis compañeros de clase, miembros de los mejores equipos y compañeros de fiesta. Gracias por todos los momentos compartidos. (We go together)

A Gal, por apoyarme en todos los momentos, en los buenos y en los malos, pues hasta mis quejas de convalecencia me has aguantado, por eso y más estaré eternamente agradecido con la vida por ponerte en mi camino. Ps. Never ever. (I will always be there)

A las profesoras Gloria, Carmen y a Tere por haber confiado en mí y darme asilo en el mejor laboratorio de la Facultad de Química, el 324.

A mis amigos y compañeros del laboratorio 324, anteriormente señalado como el mejor de la Fac, Adriana, Andrea, Anita, Betty, Bianii, Caro, Gris, Karina, Lila, Nalle, Paco, Ricardo, San, Sara, Vic, Yaz y Zayas, por todo el tiempo y anécdotas compartidas. (Keep holding on)

A Carlos (CaO), el amigo con el que puedo contar si quiero un buen consejo o necesito de alguien que me escuche, por además por ser mi editor de ideas y siempre darle un toque de formalidad a mi vida. (Feeling good)

A Julio, por enseñarme el significado del valor y la determinación, podría escribir una canción para expresar mejor lo que está escrito, pero seguramente alguna cantautora canadiense ya me ganó con la idea. Gracias.

A Paty, Iván y Carlos, por haber sido mis tutores y mis amigos durante una de las etapas más importantes de este camino; a Marce por sus sabios consejos y palabras alentadoras; a Beca, Ireri, Isa, Jessie y Rebe, que tuve la oportunidad de conocer durante el servicio; a Alma, Edith, Ely, Itzel y Patsy pues tiempo después las conocería bajo las mismas circunstancias. (Raise your glass)

A los profesores Armando Conca Torres, Esmeralda Paz Lemus, Patricia Severiano Pérez, Abraham Acatzi Itzcoatl, Olivia Zamora Martínez, Rafael Marfil Rivera, Federico Nieto Pineda, Rodolfo Fonseca Larios, Blanca Andrea Miranda Tena y Tania Ramírez Manzanares, que lograron enseñarme más allá del aula, por compartir no solo su conocimiento si no la sabiduría que han ido adquiriendo con el tiempo.

Gracias.

David Hernández Pérez

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Contenido	Pág.
1	Características generales de las comunidades y las biopelículas microbianas.	15
2	Padecimientos comúnmente asociados a biopelículas.	16
3	Cepas estudiadas y su procedencia.	37
4	Preparación de los medios de cultivo para evaluar la actividad antimicrobiana de α -amirina.	48
5	Preparación de los medios de cultivo para evaluar la actividad antimicrobiana de los distintos compuestos triterpenoides (I).	51
6	Preparación de los medios de cultivo para evaluar la actividad antimicrobiana de los distintos compuestos triterpenoides (II).	52
7	Preparación de los medios de cultivo para evaluar la actividad antimicrobiana de los distintos compuestos triterpenoides sobre <i>Streptococcus mutans</i> .	54
8	Características generales de las cepas de <i>Streptococcus</i> spp.	56
9	Conteo de células viables de las cepas <i>S. salivarius</i> , <i>S. sanguinis</i> y <i>S. mutans</i> en el medio BHI.	70
10	Efecto del compuesto α -amirina, tratado por distintas metodologías para mejorar la solubilidad, sobre cuenta viable de <i>S. mutans</i> (UFC/ml) en el medio BHI.	72
11	Criterios de selección de la metodología para mejorar la solubilidad de los compuestos triterpenoides evaluados en el presente trabajo.	73

D1	Resultados de la cinética de crecimiento de <i>S. salivarius</i> .	102
Tabla	Contenido	Pág.
D2	Resultados obtenidos para la cuenta en placa de <i>S. salivarius</i> .	103
D3	Resultados de la cinética de crecimiento de <i>S. mutans</i> (C).	103
D4	Resultados obtenidos para la cuenta en placa de <i>S. mutans</i> (C).	104
D5	Resultados de la cinética de crecimiento de <i>S. sanguinis</i> .	104
D6	Resultados obtenidos para la cuenta en placa de <i>S. sanguinis</i> .	105
D7	Resultados de la cinética de crecimiento de <i>S. oralis</i> .	106
D8	Resultados obtenidos para la cuenta en placa de <i>S. oralis</i> .	107
E1	Resultados de la evaluación de la α -amirina sobre una concentración de 10^6 UFC/mL de las distintas cepas de <i>Streptococcus</i> spp.	108
E2	Resultados de la evaluación de la β -amirina sobre la concentración (10^6 UFC/mL) de las distintas cepas de <i>Streptococcus</i> spp.	109
E3	Resultados de la evaluación del fenilacetato de α -amirina sobre la concentración (10^6 UFC/mL) las distintas cepas de <i>Streptococcus</i> spp.	110
E4	Resultados de la evaluación del ácido betulínico sobre la concentración (10^6 UFC/mL) las distintas cepas de <i>Streptococcus</i> spp.	111
E5	Resultados de la evaluación del octanoato de α -amirina y el palmitato de α -amirina sobre la concentración (10^6 UFC/mL) de <i>S. mutans</i> .	112
E6	Resultados de la evaluación del fenilacetato de α -amirina y el	113

Tabla	Contenido	Pág.
	ácido betulínico sobre la concentración (10^3 UFC/mL) de <i>S. mutans</i> .	
F1	Resultados de la prueba de ANOVA para determinar si existe diferencia estadística significativa entre los distintos métodos realizados para mejorar la solubilidad	114
F2	Resumen estadístico para los datos del efecto de las distintas concentraciones de los compuestos α - amirina, β - amirina y fenilacetato de α -amirina sobre una concentración de 10^6 UFC/mL de las cepas <i>S. mutans</i> , <i>S. salivarius</i> , <i>S. sanguinis</i> y <i>S. oralis</i> .	115
F3	Resultados de la prueba de Kruskal-Wallis para evaluar si existe diferencia significativa entre las distintas concentraciones evaluadas.	116
F4	Resultados de la prueba de Kruskal-Wallis para evaluar si existe diferencia significativa entre las distintas cepas evaluadas.	118
F5	Resultados de la prueba de Kruskal-Wallis para evaluar si existe diferencia significativa entre los distintos compuestos evaluados.	119
F6	Resumen estadístico para los datos del efecto de las distintas concentraciones del ácido betulínico sobre una concentración de 10^6 UFC/mL de las cepas <i>S. mutans</i> , <i>S. salivarius</i> , <i>S. sanguinis</i> y <i>S. oralis</i> .	121
F7	Análisis de varianza multifactorial de los datos del efecto de las distintas concentraciones del ácido betulínico sobre una concentración de 10^6 UFC/mL de las cepas <i>S. mutans</i> , <i>S. salivarius</i> , <i>S. sanguinis</i> y <i>S. oralis</i> .	122
F8	Pruebas de múltiples rangos para determinar entre que concentraciones del ácido betulínico existe diferencia	122

significativa en la reducción de la concentración de células viables de las cepas de *Streptococcus* spp.

Tabla	Contenido	Pág.
F9	Diferencia entre las medias para determinar entre que concentraciones del ácido betulínico existe diferencia significativa en la reducción de la concentración de células viables de las cepas de <i>Streptococcus</i> spp.	123
F10	Pruebas de múltiples rangos para determinar sobre que cepas existe diferencia significativa en la reducción de la concentración de células viables por efecto del ácido betulínico.	124
F11	Diferencia entre las medias para determinar sobre que cepas existe diferencia significativa en la reducción de la concentración de células viables por efecto del ácido betulínico.	124
F12	Resumen estadístico para los datos del efecto de las distintas concentraciones de los compuestos α - amirina, β - amirina, fenilacetato de α -amirina, octanoato de α -amirina y palmitato de α -amirina sobre una concentración de 10^6 UFC/mL de la cepa <i>S. mutans</i> .	125
F13	Resultados de la prueba de Kruskal-Wallis para evaluar si existe diferencia significativa entre los distintos compuestos evaluados.	126
F14	Resultados de la prueba de Kruskal-Wallis para evaluar si existe diferencia significativa entre las distintas concentraciones evaluadas.	127
F15	Resumen estadístico para los datos del efecto de las distintas concentraciones de los compuestos fenilacetato de α -amirina y ácido betulínico sobre una concentración de 10^3	129

UFC/mL de la cepa *S. mutans*.

Tabla	Contenido	Pág.
F16	Resultados de la prueba de Kruskal-Wallis para evaluar si existe diferencia significativa entre los distintos compuestos evaluados.	129
F17	Resultados de la prueba de Kruskal-Wallis para evaluar si existe diferencia significativa entre las distintas concentraciones evaluadas.	131

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Contenido	Pág.
1	Modelo de eventos iniciales que conducen al desarrollo heterotípico <i>P. gingivalis</i> - <i>S. gordonii</i> en la superficie dental supra gingival.	9
2	Ciclo del crecimiento de la biopelícula.	11
3	Representación esquemática de la relación entre la composición microbiana de la placa dental en la salud y la enfermedad.	17
4	La "hipótesis de la placa ecológica" y la prevención de la caries dental.	20
5	Esquema general de la metodología.	41
6	Comparación del crecimiento de las cepas de <i>Streptococcus</i> en el medio líquido BHI.	59
7	Cinética de crecimiento de <i>S. salivarius</i> en el medio líquido BHI.	60
8	Cinética de crecimiento de <i>S. salivarius</i> , determinación de cuenta viable en el medio TSA.	60
9	Determinación de la μ (tasa de crecimiento) de <i>S. salivarius</i> a través del método gráfico.	61'
10	Cinética de crecimiento de <i>S. mutans</i> (C) en el medio líquido BHI.	62
11	Cinética de crecimiento de <i>S. mutans</i> (C), determinación de cuenta viable en el medio TSA.	63
12	Determinación de la μ (tasa de crecimiento) de <i>S. mutans</i> (C) a través del método gráfico.	63
13	Cinética de crecimiento de <i>S. sanguinis</i> en el medio líquido BHI.	64
14	Cinética de crecimiento de <i>S. sanguinis</i> , determinación de cuenta viable en TSA.	65
15	Determinación de la μ (tasa de crecimiento) de <i>S. sanguinis</i> a	65

	través del método gráfico.	
16	Cinética de crecimiento de <i>S. oralis</i> en el medio líquido BHI.	66
Figura	Contenido	Pág.
17	Cinética de crecimiento de <i>S. oralis</i> , determinación de cuenta viable en TSA.	67
18	Determinación de la μ (tasa de crecimiento) de <i>S. oralis</i> (A) a través del método gráfico.	67
19	Efecto de la α -amirina sobre la sobrevivencia de las distintas cepas de <i>Streptococcus</i> spp.	76
20	Efecto de la β -amirina sobre la sobrevivencia de las distintas cepas de <i>Streptococcus</i> spp.	78
21	Efecto del fenilacetato de α -amirina sobre la sobrevivencia de las distintas cepas de <i>Streptococcus</i> spp.	79
22	Efecto del ácido betulínico sobre la sobrevivencia de las distintas cepas de <i>Streptococcus</i> spp.	80
23	Efecto del octanoato de α -amirina y el palmitato de α -amirina sobre la sobrevivencia de <i>Streptococcus mutans</i> .	82
24	Efecto del fenilacetato de α -amirina y el ácido betulínico sobre la sobrevivencia de <i>Streptococcus mutans</i> .	84
C1	Características morfológicas de seis de las cepas de <i>Streptococcus</i> spp. utilizadas en el proyecto.	98
C2	Características morfológicas de seis de las cepas de <i>Streptococcus</i> spp. utilizadas en el proyecto.	99
C3	Características morfológicas de seis de las cepas de <i>Streptococcus</i> spp. utilizadas en el proyecto.	100
C4	Características morfológicas de tres de las cepas de <i>Streptococcus</i> spp. utilizadas en el proyecto.	101
F1	Gráfico de cajas y bigotes con muesca para determinar si existe diferencia significativa entre las distintas concentraciones	117

evaluadas sobre las cepas de *Streptococcus* spp. en una concentración de 10^6 UFC/mL.

Figura	Contenido	Pág.
F2	Gráfico de cajas y bigotes con muesca para determinar si existe diferencia significativa entre las cepas de <i>Streptococcus</i> spp. en una concentración de 10^6 UFC/mL.	118
F3	Gráfico de cajas y bigotes con muesca para determinar si existe diferencia significativa entre los distintos compuestos en una concentración de 10^6 UFC/mL de las cepas de <i>Streptococcus</i> spp.	120
F4	Gráfico de cajas y bigotes con muesca para determinar si existe diferencia significativa entre las distintas concentraciones de los compuestos en una concentración de 10^6 UFC/mL de la cepa de <i>S. mutans</i> .	126
F5	Gráfico de cajas y bigotes con muesca para determinar si existe diferencia significativa entre los distintos compuestos en una concentración de 10^6 UFC/mL de la cepa de <i>S. mutans</i> .	128
F6	Gráfico de cajas y bigotes con muesca para determinar si existe diferencia significativa entre los distintos compuestos en una concentración de 10^3 UFC/mL de la cepa de <i>S. mutans</i> .	130
F7	Gráfico de cajas y bigotes con muesca para determinar si existe diferencia significativa entre las distintas concentraciones de los compuestos en una concentración de 10^3 UFC/mL de la cepa de <i>S. mutans</i> .	131

I. Introducción

La caries dental es una patología bacteriana común causada por una biopelícula que está constituida por los microorganismos presentes en la cavidad oral. Esta patología ha sido asociada a la presencia de *Streptococcus* spp. (principalmente *S. mutans* y *S. sobrinus*) y *Lactobacillus* spp. (Porto y cols., 2009). *S. mutans* ha sido implicado como el principal agente etiológico de la caries dental, debido a su alto número en la placa antes de la aparición de caries, su capacidad para degradar rápidamente los carbohidratos con la producción de ácido abundante y su capacidad de inducir una tolerancia a los ambientes de bajo pH (Mei Deng y cols., 2007). A partir de sacarosa mediante la acción de las glucosiltransferasas (GTFasas), *S. mutans* produce glucano (Hamada y Torii., 1980; Wiater y cols., 1999). La formación de glucano es importante en la maduración de la placa dental (Yu y cols., 2007). *S. mutans* metaboliza los carbohidratos y libera los ácidos orgánicos, que desmineralizan la superficie del diente y provocan la caries dental (Kohler y cols., 1995).

El procedimiento mecánico es el más efectivo para prevenir la formación de la placa; sin embargo la mayor parte de la población no realiza un cepillado eficiente. Además, los tratamientos dentales suelen ser caros y no muy accesibles a gran parte de la población, especialmente en países en desarrollo. Aunque se han utilizado compuestos fluorados en el control de la placa dental (Guha-Chowdhury y cols., 1995), estos han mostrado citotoxicidad si se utilizan en una concentración mayor de 80 ppm (Jeng y cols., 1998). Por lo tanto, es importante desarrollar nuevos agentes de prevención de la caries dental (Pan y cols., 1999). En este sentido, se han realizado grandes esfuerzos para encontrar compuestos anticariogénicos que puedan ser incorporados a productos dentales, complementando el cepillado y reduciendo así la incidencia de caries en humanos (Porto y cols., 2009).

Las plantas proporcionan distintos compuestos antimicrobianos, que han sido usados durante siglos para inhibir el crecimiento microbiano. Se ha demostrado que los extractos de té verde inhiben el crecimiento de *S.mutans in vitro* (Sakanaka y cols., 1989; Yoshino y cols., 1995) y previene su adhesión al esmalte dental (Sanaka y cols., 1989). Por otra parte, los extractos de té Oolong reducen la formación de la placa dental en humanos (Ooshima y cols., 1994; Matsumoto y cols., 1999). Los extractos de té verde, cacao y de café inhiben la actividad de las glucosiltransferasas (Kashket y cols., 1985; Sanaka y cols., 1989) y la formación de glucano mientras que los extractos acuosos de algunas plantas de África han demostrado que inhiben la adhesión de *S.mutans* a los dientes (Wolinsky y Sote., 1984).

Durante los últimos 10 años se han sintetizado diversos derivados de triterpenoides, tales como la α - y β - amirina. Las modificaciones producidas por la introducción de un grupo sustituto puede modificar propiedades fisicoquímicas de la molécula, tales como la hidrofobicidad, densidad electrónica, etc., lo cual podría conferirle una mayor eficacia, selectividad y una menor toxicidad (Johann y cols., 2007). Existen evidencias del potencial antiinflamatorio y antimicrobiano de triterpenos aislados de fuentes naturales. Holanda y cols. (2008) evaluaron el potencial antiinflamatorio de α - y β -amirina (aislada de *Protium heptaphyllum*) en ratas con periodontitis aguda, observando retardo en el proceso inflamatorio. En otros estudios, Johann y cols. (2007) valoraron la actividad antifúngica de la α - y β -amirina (aislados de *Protium heptaphyllum*) y de 15 derivados sintéticos contra especies del género *Candida*, advirtiendo la inhibición en la adhesión de *C. albicans* a células epiteliales humanas. Los formiatos y acetatos de α - y β -amirina mostraron la mejor actividad antimicrobiana ante *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* y *Trycophyton mentagrophytes*.

Con base en las consideraciones anteriores se planteó el presente trabajo que describe el estudio del efecto sobre distintas cepas de *Streptococcus* spp. de α - y β -amirina, fenilacetato α -amirina y el ácido betulínico provenientes de *Bursera*

simaruba y *Byrsonima crassifolia*, con la finalidad de observar un posible efecto bactericida sobre las cepas de estudio.

II. Antecedentes

Desde hace ya varias décadas, la Organización Mundial de la Salud desarrolló una definición de salud como el “estado de completo bienestar físico, mental y social y no sólo la ausencia de enfermedad”. En años más recientes, ha existido un considerable progreso en el desarrollo de medidas funcionales de salud, y la salud bucal forma parte de la salud integral, por lo que según la definición antes descrita, si se padece una enfermedad bucal se carece de salud general.

Es bien sabido que las enfermedades bucales como la caries dental y las enfermedades periodontales son de mayor incidencia y prevalencia alrededor del mundo y se encuentran concentradas principalmente en los grupos menos favorecidos, lo que las constituye como problemas de salud pública bucal (Medina-Solis y cols., 2006).

Entre las principales enfermedades que afectan la cavidad bucal figuran las caries, que se define como la enfermedad infecciosa de origen multifactorial caracterizada por el reblandecimiento del tejido duro del diente que evoluciona hasta formar una cavidad. Es un proceso que puede ocasionar la pérdida dental si no se atiende con oportunidad. Gran parte de la población la padece de forma innecesaria, debido sobre todo al estilo de vida (dieta e higiene bucal inadecuada), así como al acceso restringido a los servicios de salud odontológicos (De la Fuente-Hernández y cols., 2008). Acerca de los países considerados en vías de desarrollo, se ha sugerido que presentan un dramático incremento en los índices de caries, lo cual, según algunos autores, se asocia al aumento en el consumo de azúcar (Rivera y cols., 2006; Velásquez y cols., 2003).

La enfermedad periodontal y las caries son las enfermedades bucodentales más comunes y existe una relación inversa entre los dos (Kinane y cols., 1991).

La enfermedad periodontal es un trastorno inflamatorio destructivo que lleva a la pérdida de soporte dentario, es iniciada por un grupo específico de bacterias anaeróbicas Gram negativas, que modulan la destrucción del tejido periodontal a través de complejas interacciones con las células del huésped (Socransky y Haffajee, 1994; Haffajee y Socransky, 1994).

La caries es una patología bacteriana común causada por una biopelícula que está constituida por los microorganismos presentes en los dientes. Esta patología ha sido asociada a la presencia de *Streptococcus* spp., principalmente *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*, y *Lactobacillus* spp. (Porto y cols., 2009).

2.1. Placa dental

Por su microflora única y diversa distribuida en varios nichos, como en los espacios periodontales, el dorso de la lengua y otras superficies mucosas, la microbiota de la cavidad oral es parte indispensable de la microbiota humana (Parahitiyawa y cols., 2009). Se diferencia de todos los demás hábitats humanos por la presencia simultánea de dos tipos de superficies para la colonización microbiana: tejido blando (mucosas) y tejido duro (dientes o prótesis dentales). Esta propiedad intrínseca de la cavidad oral proporciona inmensas posibilidades para una microbiota diversa (Zaura y cols., 2009).

Las bacterias orales no existen como entidades independientes, sino más bien como una función coordinada, espacialmente organizada y metabólicamente integrada de la comunidad microbiana (Bradshaw y cols., 2002).

La placa dental se acumula preferentemente en los lugares de estancamiento que le proporcionan protección frente a los mecanismos de expulsión vigorosa que se aplican en la boca. De acuerdo con Marsh (2004), se pueden identificar distintas fases del desarrollo de la biopelícula, incluyendo:

- a) *Adsorción de las moléculas del hospedero y la bacteria sobre la superficie dental.* Esta biopelícula acondicionada (la película adquirida) se forma

inmediatamente después de la limpieza (Al-Hashimi y Levine, 1989) e influye directamente en el patrón de colonización microbiana inicial.

- b) *Transporte pasivo de las bacterias orales a la superficie del diente.* Se forman interacciones físico-químicas débiles y de largo alcance entre la superficie de las células microbianas y el diente recubierto con película. Estas interacciones débiles facilitan la adherencia reversible (Busscher y van der Mei, 1997). Posteriormente, las interacciones son fuertes y de corto alcance entre moléculas específicas en la superficie celular bacteriana (adhesinas) y receptores complementarios en la película y se genera un apego irreversible (Jenkinson y Lamont, 1997; Lamont y Jenkinson, 2000). Las bacterias orales generalmente poseen más de un tipo de adhesina en su superficie celular y pueden participar en múltiples interacciones tanto con las moléculas del hospedero como con los receptores similares en otras bacterias (co-adhesión).

La adhesión de los colonizadores primarios a las superficies recubiertas de saliva es un proceso multifactorial, las bases mecánicas precisas varían entre las especies. En general, los microorganismos orales pioneros presentan una superficie con adhesinas múltiples de diferentes especificidades y afinidades. Estructuralmente, estas adhesinas son a menudo proteínas de superficie o se asocian con apéndices fibrilares. Esta configuración probablemente proporciona versatilidad en el reconocimiento del receptor y, finalmente, dan lugar a más sitios de unión. Las moléculas salivales adsorbidas que funcionan como receptores para la adhesión microbiana también muestran diversidad, y por otra parte, algunas alcanzan una configuración activa sólo después de la deposición sobre una superficie.

El mecanismo de adhesión inicial de las bacterias, que puede ser aditivo o secuencial, incluye el reconocimiento de los oligosacáridos receptores por

adhesinas en reacciones de tipo lectina, interacciones proteína-proteína, y asociaciones iónicas o hidrofóbicas entre componentes de la superficie microbiana y el sustrato de adhesión. Los colonizadores numéricamente dominantes del esmalte dental recubierto de saliva son los estreptococos orales como *Streptococcus sanguinis*, *S. mitis*, *S. oralis* y *S. gordonii*. Existe una familia de proteínas de superficie ampliamente distribuida entre estas especies denominada antígeno I / II (o el antígeno B) que funcionan como adhesinas mediante el reconocimiento de la gp340 salival, la fibronectina y el colágeno (Jenkinson y Lamont, 2009).

c) *Co-adherencia de los colonizadores secundarios*. Esta fase también incluye las interacciones específicas interbacterianas adhesina-receptor (a menudo lectinas) y conlleva a un aumento en la diversidad de la biopelícula para la formación de estructuras morfológicas inusuales (Kolenbrander y cols., 2000). La co-adherencia puede facilitar también la organización funcional de la placa dental. Las bacterias participan en una serie de interacciones bioquímicas antagónicas y sinérgicas (Marsh y Bradshaw, 1999). La eficiencia de las interacciones metabólicas entre bacterias en la cadena alimentaria puede ser mayor si se ponen en contacto físico cercano. Del mismo modo, la co-adherencia de las bacterias anaerobias obligatorias a las especies consumidoras de oxígeno puede asegurar su supervivencia en ambientes abiertamente aeróbicos (Bradshaw y cols., 1998).

Una vez que los colonizadores pioneros se han establecido, inicia la co-adhesión interbacterial con los colonizadores secundarios ayudando a impulsar la acumulación subsecuente. El mecanismo de la adherencia interbacterial es similar a la adhesión de la bacteria-receptor salival y puede involucrar interacciones tipo lectina, proteína-carbohidrato o proteína-proteína; que a menudo son polivalentes (Jenkinson y Lamont, 2005; Kolenbrander y cols., 2000).

Uno de los ejemplos mejor documentados es proporcionado por *Porphyromonas gingivalis*, un anaerobio Gram negativo y patógeno periodontal. *P. gingivalis* se co-adhiere sobre el colonizador antecedente *S. gordonii*. La interacción inicial está mediada por la fimbria larga de *P. gingivalis*, que se enlaza a la gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH) en la superficie de *S. gordonii*. Posteriormente, se generan enlaces de mayor fuerza entre las fimbrias cortas de *P. gingivalis*, las adhesinas SspA y SspB (antígeno de la familia I / II) del estreptococo (figura 1). El dominio funcional de las proteínas Ssp de *S. gordonii* es una región de 26 aminoácidos hacia el carbono terminal, en el que un motivo NITVK es esencial para el reconocimiento de las fimbrias de *P. gingivalis*. Curiosamente, el motivo NITVK no se conserva en la familia de proteínas antígeno I/II del *Streptococcus mutans*, y, en consecuencia *P. gingivalis* no se co-adhiere en biopelículas donde el sustrato es *S. mutans*. La selectividad de reconocimiento y adhesión bacteriana a otras especies es una propiedad común.

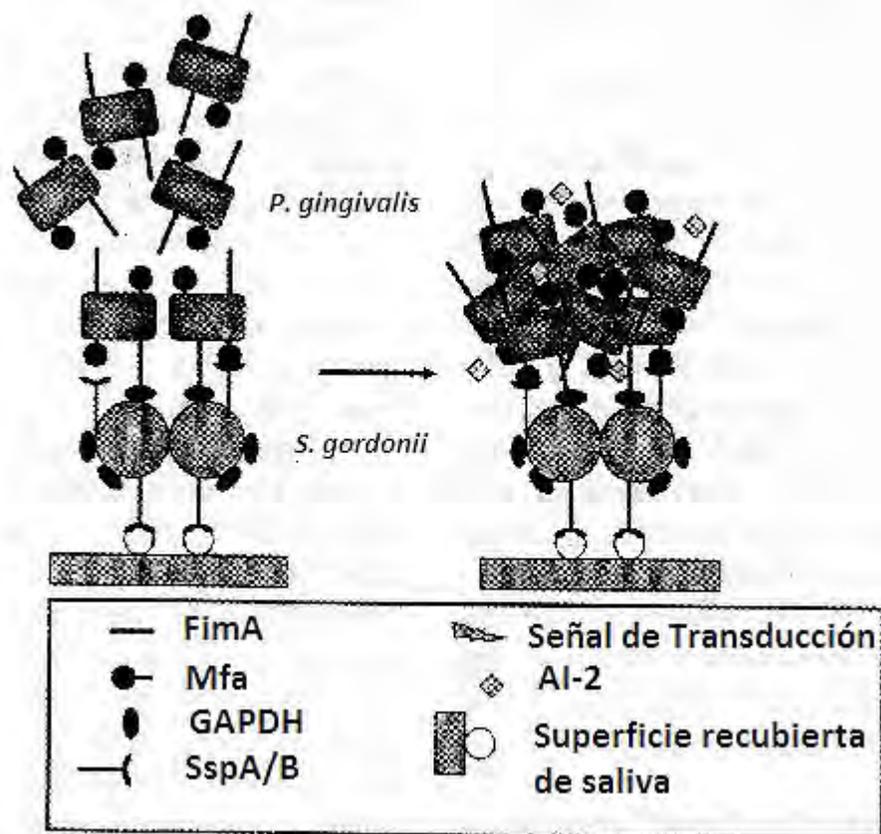


Figura 1.- Modelo de eventos iniciales que conducen al desarrollo heterotípico *P. gingivalis*- *S. gordonii* en la superficie dental supra gingival. *S. gordonii* (esferas) es un colonizador pionero, y las células se enlazan a la superficie de los dientes recubiertos con saliva. *S. gordonii*, produce múltiples adhesinas, muchas de las cuales tienen receptores salivales, por simplicidad, sólo SspA/B se muestran. La localización inicial de *P. gingivalis* (rectángulos) está mediada por la interacción con FimA y GAPDH en la superficie de los estreptococos. Las interacciones más fuertes se producen a través de la interacción de Mfa con SspA/B. Esta interacción inicia un evento de transducción de señal que modula el transcriptoma de *P. gingivalis*. La adaptación fenotípica resultante de *P. gingivalis*, junto con la producción de moléculas de señalización como Al-2, son necesarias para la adición de las células de *P. gingivalis* en fase planctónica y para que se dé el inicio del desarrollo de la comunidad. Esta es sólo una etapa del proceso que conduce a una maduración de la biopelícula heterotípica (Imagen modificada de Jenkinson y Lamont 2009).

d) *Multiplicación de los microorganismos adheridos.* La división celular conduce a un crecimiento confluyente y, finalmente, a una biopelícula funcionalmente organizada. La producción de polímeros resulta en la formación de una matriz extracelular compleja, formada por glucanos solubles e insolubles, fructanos y heteropolímeros. Esta matriz es una característica común de las biopelículas y realiza una contribución significativa a la integridad estructural y a la resistencia general de las biopelículas, esta matriz puede ser biológicamente activa y retiene los nutrientes, agua y enzimas clave dentro de la biopelícula (Allison, 2003). Los sustratos endógenos (derivados de la saliva o el fluido gingival) son la principal fuente de nutrientes para las bacterias orales (Beighton y cols., 1986), pero su catabolismo requiere la acción concertada y secuencial de los grupos de microorganismos con perfiles enzimáticos complementarios (Bradshaw y cols., 1994; Marsh y cols., 2000b).

e) *Desprendimiento activo.* Las bacterias pueden responder a las señales ambientales y separarse de las superficies, permitiendo a las células bacterianas colonizar otros lugares (Cavedon y London, 1993).

A lo largo del proceso de formación de la biopelícula, se pueden observar diferencias fenotípicas de las bacterias, distintas de sus contrapartes planctónicas, durante cada etapa de desarrollo posterior (figura 2) (Conterstone y cols., 2005).

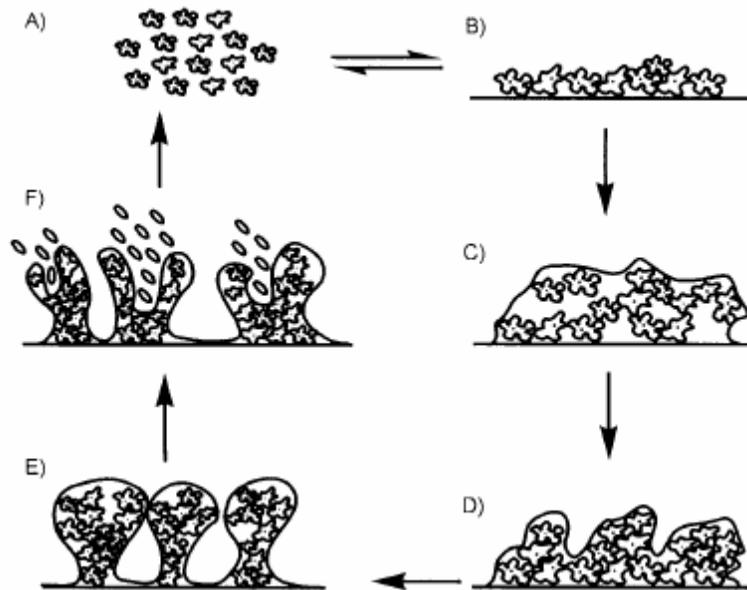


Figura 2.- Ciclo del crecimiento de la biopelícula. A) Bacterias planctónicas B) Adherencia reversible a una superficie adecuada para el crecimiento. C) Las bacterias comienzan la secreción de las sustancias exopoliméricas (EPS) y la adhesión se convierte en irreversible. D) La biopelícula madura comienza a adquirir una forma tridimensional. E) Se observa una biopelícula plenamente madura y de arquitectura compleja. F) Se dispersan las bacterias de la biopelícula para reiniciar la colonización de una superficie distal.

2.1.1. Interacciones interbacteriales en biopelículas orales

Una ventaja de la acumulación de biopelículas heterotípicas es el potencial de los grupos de organismos para utilizar sustratos complejos con máxima eficacia (Jenkinson y Lamont, 2005). Por ejemplo, los estreptococos orales y actinomicetos generan lactato como producto final de la fermentación de carbohidratos. A su vez, el coco Gram negativo, *Veillonella*, que se adhiere firmemente a los estreptococos orales, utiliza lactato como sustrato fermentable. Una alimentación similar cruzada se produce a través de la estrecha asociación de *P. gingivalis* con *Treponema denticola*. *P. gingivalis* utiliza el succinato que es producida por *T. denticola*, mientras que el crecimiento de *T. denticola* se ve reforzado por el ácido isobutírico generado por *P. gingivalis* (Grenier, 1992).

Además de la optimización de las rutas metabólicas, el éxito de la biopelícula oral de especies mixtas requiere un ajuste de la transcripción y proteómica previo por organismos planctónicos. Estas adaptaciones a menudo se derivan del reconocimiento de la superficie a la que un organismo se adjunta y la identificación de sus vecinos más cercanos. Por ejemplo, las células de *S. gordonii* que están unidas a esferas de hidroxiapatita recubiertas de saliva inician los eventos de transducción de señales a través de un sistema de dos componentes denominados BrfA/B (Zhang y cols., 2004). Este sistema de señalización controla aspectos de la adhesión y la adaptación estreptocócica necesaria para el crecimiento de la biopelícula. Las redes de transducción de señales y regulación de la transcripción de una especie también pueden facilitar la colonización por otra especie. La interacción de *S. gordonii*, con la saliva da como resultado la regulación positiva de varios genes, incluyendo los que codifican para la familia de adhesinas de antígenos I/II que promueven la co-adherencia de *S. gordonii*, con actinomicetos y con *P. gingivalis*. La detección de *S. gordonii*, por *P. gingivalis* inicia una cascada de transducción de señales dentro de *P. gingivalis* (figura 1) que facilita la acumulación de organismos en el desarrollo de biopelículas heterotípicas (Jenkinson y Lamont, 2009).

2.1.2. Quorum sensing

Se ha identificado un número de sistemas de intercomunicación bacterianas que se basan en la producción y la detección de señales difusibles exteriores y que permite las respuestas coordinadas a través de una población bacteriana. El *Quorum sensing* es un sistema por el cual una población puede controlar su densidad celular a través de la liberación de determinadas moléculas de señalización. En las bacterias Gram negativas, pequeñas moléculas como las lactonas de acil homoserina (AHLs) han sido identificadas como los principales actores de este sistema de comunicación (Parsek y cols., 2000). Incluso a través de las distintas cepas bacterianas, leves modificaciones estructurales en las colas de estas moléculas alifáticas son a menudo las únicas diferencias documentadas (Donlan y cols., 2002).

En las bacterias Gram positivas, los péptidos autoinductores (Aips), que se unen a receptores de histidin-quinasa, embebidos dentro de las membranas celulares, son de uso común para la comunicación (Abraham, 2006). Hasta la fecha, el único mecanismo de detección de quórum, compartido por bacterias Gram negativas y Gram positivas involucra la producción y uso del autoinductor-2 (AI-2) como moléculas de señalización efectiva. AI-2 se deriva del precursor común de síntesis (S)-4,5-dihidroxi-2,3-pentanodiona (DPD) 5, la enzima que se ha identificado en más de 55 especies de bacterias genéticamente distintas (Richards y Melander, 2009).

AI-2, producido por la acción de la enzima LuxS, es un importante autoinductor presente en las comunidades orales. AI-2, abarca una familia de moléculas estrechamente relacionadas, y es generado por el reordenamiento de 4,5-dihidroxi-2,3-pentanodiona (DPD), un producto de la escisión de LuxS mediada por la S-ribosilhomocisteína. La enzima LuxS, dependiente de señalización, es necesaria para el desarrollo de biopelículas mixtas de *P. gingivalis* y *S. gordonii*, (figura 1) y de *S. oralis* y *A. naeslundii* (Rickard y cols., 2006).

Mientras que muchos sistemas de señalización interbacterial son mutuamente benéficos para los organismos participantes, la situación inversa de antagonismo entre los habitantes de las biopelículas orales también es común. La producción de bacteriocinas y la producción de peróxido de hidrógeno representan algunos de los ejemplos más letales de los conflictos interbacteriales. La actividad de la bacteriocina SalA (salivaricina) se puede detectar en la saliva de los sujetos colonizados por *Streptococcus salivarius* (Wescombe y cols., 2006). Las bacterias son capaces de co-existir con sus propias bacteriocinas o las relacionadas con ambientes orales, reconociendo la presencia de “amigos o enemigos” en los alrededores, y responder en consecuencia. La señalización dependiente de contacto también puede estar implicada en las interacciones antagónicas más sutiles. El contacto inicial entre *P. gingivalis* y *S. cristatus* resulta en la activación de una cascada reguladora que disminuye significativamente el nivel de la transcripción de FimA, que codifica la subunidad de fimbrias largas de *P. gingivalis*

(Xie y cols., 2000). Como resultado, la co-adhesión entre estos organismos se limita y la acumulación de biopelícula no se produce con *P. gingivalis* y *S. cristatus*.

2.1.3. Características de la biopelícula

Una vez establecida, la microbiota residente de la placa se mantiene relativamente estable en el tiempo y es benéfica para el hospedero (Marsh, 2000a). Su composición de especies en un sitio se caracteriza por un grado de estabilidad o el equilibrio entre las especies que la componen, a pesar de las tensiones ambientales periódicas de menor importancia, por ejemplo, de componentes de la dieta, la higiene oral, las defensas del huésped, los cambios diurnos en el flujo de saliva, etc. Esta estabilidad (denominado homeostasis microbiana) no se debe a ninguna indiferencia biológica entre los organismos residentes, se debe a un equilibrio impuesto por numerosas interacciones microbianas. Estas incluyen interacciones bioquímicas convencionales, como las que son necesarias para catalizar glucoproteínas complejas del hospedero y el desarrollo de las cadenas alimentarias (Suntharalingam y cols., 2005; Marsh, 1989). Las biopelículas de las comunidades bacterianas se encuentran relativamente bien establecidas en las superficies mucosas de la lengua, mucosa bucal, superficies de los dientes, surcos gingivales y las superficies artificiales como prótesis y aparatos (Samaranayake, 2006).

Los beneficios de establecer un estilo de vida como comunidad incluyen (Caldwell y cols., 1997; Shapiro, 1998; Marsh y Bradshaw, 1999):

- a) un rango más amplio de hábitat para el crecimiento, por ejemplo, las especies consumidoras de oxígeno generan condiciones ambientales adecuadas para anaerobios obligados,
- b) un metabolismo más eficiente, por ejemplo, macromoléculas complejas que únicamente pueden ser degradados por las comunidades bacterianas,
- c) aumento en la resistencia al estrés y los agentes antimicrobianos,
- d) una mayor virulencia ('sinergismo patógeno') (tabla 1).

Tabla 1.- Características generales de las comunidades y las biopelículas microbianas (modificada de Marsh, 2004).

Propiedad	Ejemplo en la placa dental
Arquitectura abierta	Presencia de canales y huecos
Protección contra las defensas del hospedero, la desecación, etc.	Producción de polímeros extracelulares para formar una matriz funcional
Aumento de la resistencia a antimicrobianos	Incremento en la resistencia a la clorhexidina y antibióticos
Neutralización de inhibidores	La producción β -lactamasas por las células vecinas para proteger a los organismos sensibles.
Expresión génica nueva	La síntesis de nuevas proteínas, sobre regulación de gtfBC (genes asociados a la síntesis de glucano).
Respuestas génicas coordinadas	La producción de las moléculas de señalización célula-célula, por ejemplo, CSP (péptido de estimulación-competencia).
Heterogeneidad espacial y ambiental	Gradientes de pH y O ₂ , co-adhesión.
Una gama más amplia de hábitat	Presencia de anaerobios obligatorios en un entorno abiertamente aeróbico.
Metabolismo más eficiente	Catabolismo completo de macromoléculas complejas del hospedero (por ejemplo mucinas) por parte de la biopelícula.

La microbiota residente de todos los sitios desempeña un papel crítico en el desarrollo normal de la fisiología del huésped y también reduce la probabilidad de infección, actuando como una barrera a la colonización por especies exógenas (McFarland, 2000). Los mecanismos que contribuyen a la resistencia a la colonización incluyen una competencia más efectiva por los nutrientes y los sitios de fijación, la producción de factores de inhibición y la creación de las condiciones de crecimiento desfavorables por la microbiota residente.

La composición de la biopelícula oral, junto con su potencial metabólico y patógeno, deriva de los resultados colectivos de los procesos biológicos interconectados, incluyendo la adhesión a las superficies, la detección y la respuesta del medio ambiente, las adaptaciones fisiológicas, la comunicación célula a célula, y la competencia interbacterial. En consecuencia, las biopelículas

orales son entidades complejas y dinámicas, que integran fisiológicamente diversos organismos que coexisten con éxito y capaces de adaptarse a las siempre cambiantes condiciones del medio ambiente en la cavidad oral.

2.1.4. Alteraciones en la placa dental

Cuando el estado de un nicho particular, se desplaza desde la salud a la enfermedad, están implicados los consorcios de organismos, en lugar de un solo organismo (tabla 2). Esto implica que un equilibrio entre las especies bacterianas en favor de la salud y bacterias “pro-enfermedad” es operativo en la flora microbiana oral (Jenkinson y Lamont, 2005)

Tabla 2.- Padecimientos comunmente asociados a biopelículas (modificada de Richards y Melander, 2009).

Microorganismo	Padecimientos asociados a biopelículas
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Infección pulmonar, fibrosis cística
<i>Burkholderia cepacia</i>	Infección pulmonar, fibrosis cística
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Infecciones en quemaduras
<i>Helicobacter pylori</i>	Infecciones gastrointestinales
<i>Escherichia coli</i>	Infección en el catéter urinario
<i>Haemophilus influenzae</i>	Otitis
<i>Bordetella pertusis</i>	Infección respiratoria
<i>Legionella pneumophila</i>	Enfermedad de los legionarios
<i>Staphylococcus aureus</i>	Infecciones en quemaduras,
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Sepsis
<i>Streptococcus mutans</i>	Placa dental, gingivitis
<i>Enterococcus</i> resistente a vancomicina (VRE)	Infecciones nosocomiales

En cualquier ecosistema, la homeostasis microbiana puede desajustarse, en ocasiones, debido a un cambio sustancial en un parámetro que es fundamental para mantener la estabilidad ecológica del sitio, dando lugar a un sobre

crecimiento de los componentes menores de la comunidad (figura 3). Una de las consecuencias clínicas de esta ruptura puede ser la enfermedad (Marsh, 2006). La flora bacteriana está sujeta a cambios por factores como la edad, la dieta y la salud sistémica subyacente (Rasiah y cols., 2005).

Una vez que el equilibrio simbiótico entre el huésped y la microbiota se pierde, esta microbiota podrá intervenir en la enfermedad. Por ejemplo, la lengua, con sus criptas mucosas que permiten el florecimiento de la microbiota anaeróbica, es una fuente establecida de la halitosis (Scully y cols., 2008).

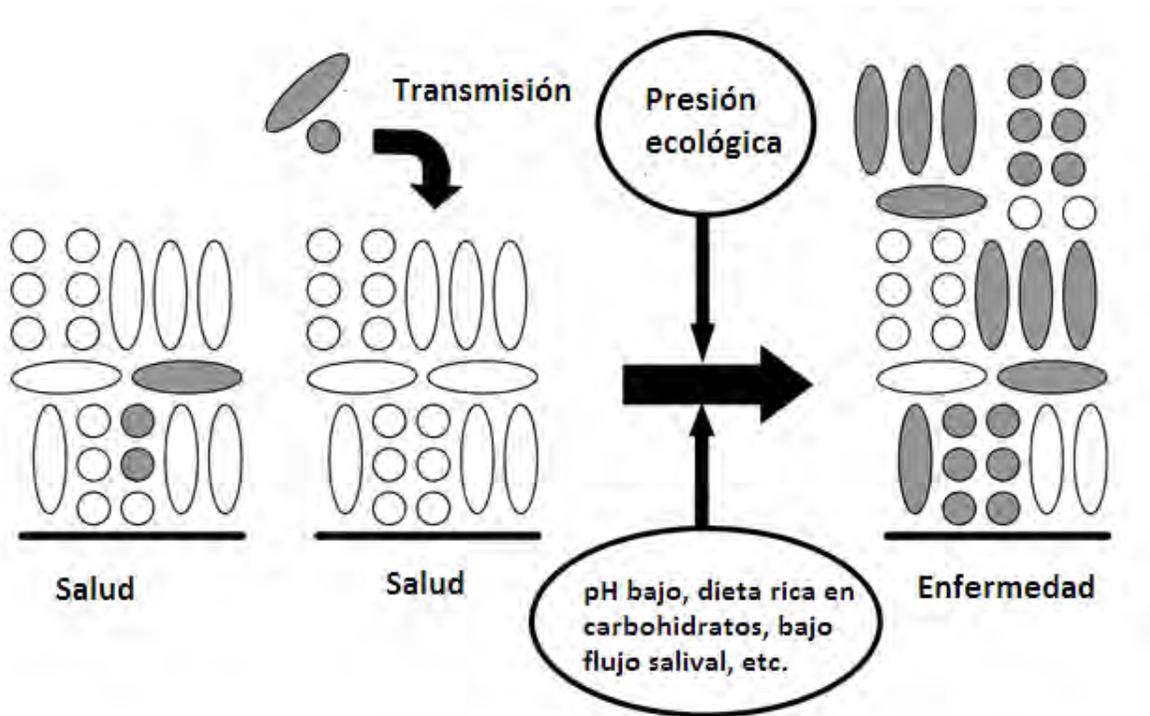


Figura 3.- Representación esquemática de la relación entre la composición microbiana de la placa dental en la salud y la enfermedad. Los patógenos potenciales (gris) pueden estar presentes en bajo número en la placa, o transmitidos en menor número a la placa, ambas situaciones pueden ser compatibles con la salud. Una mayor presión ecológica será necesaria para que tales agentes patógenos excluyan a los otros miembros de la microbiota residente (blanco), alcancen los niveles necesarios (dominio numérico) y se produzca la enfermedad. Posibles presiones ecológicas de la caries son: una dieta rica en azúcar, las condiciones de pH bajo, o el bajo flujo de saliva. La enfermedad se podría evitar no sólo por la orientación del patógeno directamente (por ejemplo, con

agentes antimicrobianos), sino también indirectamente al interferir con la presión ecológica responsable del incremento del agente patógeno (modificada de Marsh, 2006).

2.2. Caries

Las enfermedades bucales constituyen un problema general de salud pública. La caries y las periodontopatías, por su magnitud y trascendencia, representan los principales problemas de salud bucal. La caries involucra un desequilibrio de las interacciones moleculares normales entre la superficie/subsuperficie del diente y la biopelícula microbiana adyacente. Este desequilibrio se manifiesta en un cierto plazo como desmineralización acumulativa del diente que, si no se revierte, tiene el potencial de producir una cavitación en el esmalte y consecuentemente un daño colateral a la dentina y a la pulpa, culminando con la destrucción localizada de los tejidos duros del diente. La OMS la define como un proceso patológico de origen externo que se inicia después de la erupción y determina un reblandecimiento del tejido duro del diente, evolucionando hacia la formación de una cavidad (Medina y cols., 2006).

Las bacterias potencialmente cariogénicas pueden encontrarse de manera natural en la placa dental, pero estos organismos son débilmente competitivos a un pH neutro, y están presentes en una pequeña proporción de la comunidad de la placa total. En esta situación, con una dieta convencional, los niveles de tales bacterias son clínicamente insignificantes, y los procesos de des- y re-mineralización están en equilibrio.

La caries se asocia a un consumo regular de carbohidratos fermentables en la dieta, exponiendo la placa con mayor frecuencia a un bajo pH. El efecto de tales cambios ambientales (la disponibilidad de nutrientes y el pH) sobre la expresión génica en las bacterias orales que predominan en la salud o la enfermedad ha mostrado que organismos como los estreptococos son capaces de adaptarse a un pH bajo, y de regular cierto número de genes para protegerse contra el estrés generado por el ácido (Marsh, 2006). El mecanismo básico para todos los tipos de

la caries dental es la desmineralización o pérdida mineral del diente, a través de ataques de ácido generado por las bacterias cariogénicas.

Recientemente, se ha propuesto la "Hipótesis de la placa ecológica" (Marsh, 2003). Postula que las enfermedades mediadas por la placa bacteriana son consecuencia de los desequilibrios en la microbiota residente, resultante de un enriquecimiento dentro de la comunidad microbiana de los patógenos orales.

Si la frecuencia de la ingesta de carbohidratos fermentables aumenta, entonces la placa pasa más tiempo por debajo del pH crítico para la desmineralización del esmalte (aproximadamente pH 5,5), resultando en un sustrato ácido cuyos iones hidronio son capaces de disolver la red cristalina de hidroxiapatita carbonatada del esmalte, cemento y dentina. El efecto sobre la ecología microbiana de la placa es doble. Condiciones de pH bajo favorecen la proliferación de bacterias ácido tolerantes y acidogénicas (*S. mutans* y *Lactobacillus* spp.), mientras que inclina la balanza hacia la desmineralización (figura 4). La continua desmineralización resulta en la cavitación de la superficie del esmalte de los dientes (Featherstone, 2000).

Es más difícil de eliminar la biopelícula de las cavidades, por lo tanto se potencia el crecimiento de colonias bacterianas. Un mayor número de bacterias como *S. mutans* y los lactobacilos en la placa se traducirían en más ácido producido a un ritmo aún más rápido, aumentando así aún más la desmineralización. Otras bacterias también pueden producir ácido en condiciones similares, pero a un ritmo más lento (De Soett y cols., 2000). Estas bacterias pueden ser responsables de algunas de las etapas iniciales de desmineralización. Si las especies ácido tolerantes no estaban presentes al principio y se generan condiciones de pH bajo, junto con la inhibición de los organismos competidores, se podría aumentar la probabilidad de éxito de la colonización por *S. mutans* o *Lactobacillus* spp.

El mecanismo de reparación natural del cuerpo de la caries dental, o desmineralización, es la remineralización, un proceso mediante el cual los

minerales de la saliva se difunden de nuevo en las superficies porosas generadas de la lesión de caries (Featherstone, 2000).

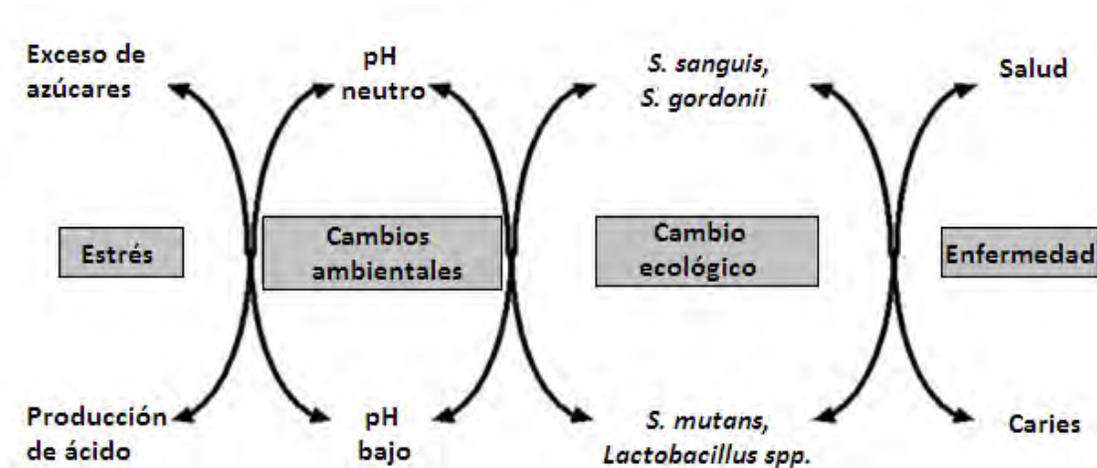


Figura 4.- La "hipótesis de la placa ecológica" y la prevención de la caries dental. La caries es una consecuencia de los cambios en el medio ambiente debido a la producción de ácido de la fermentación de carbohidratos de la dieta, que selecciona a las especies acidogénicas y ácido tolerantes, como *S. mutans* y *Lactobacillus spp.* (Imagen modificada de Marsh, 1994).

2.2.1. *Streptococcus spp.*

Los cambios en las proporciones relativas de las especies bacterianas pueden ocurrir como resultado de la maduración de la ecología de la biopelícula, sin embargo, hay poca información disponible acerca de la proporción normal de las diferentes especies de *Streptococcus spp.* a las diferentes edades (Seow y cols., 2009).

Algunos estreptococos son capaces de producir ácidos (acidogénesis), crecen en ambientes con un pH ácido (acidofilia), producen ácidos a bajo pH (capacidad acidúrica) y sintetizan polisacáridos intra y extracelulares (Carlsson, 1986). Debido a estas propiedades, que no son compartidas por todos los estreptococos orales, el potencial cariogénico varía entre las especies (Liébana y cols., 1995).

Aunque las especies de *Streptococcus* comprenden aproximadamente el 10% de la flora bucal, tienen un papel importante en la etiología de la caries dental. *S. mutans* y *S. sobrinus*, son considerados los principales agentes etiológicos de la caries, mientras que otras especies bacterianas pueden tener roles contributivos (Okada y cols., 2005; van Houte; 1994). Por otra parte, se ha encontrado la presencia de *Streptococcus sanguinis* en un número relativamente alto cuando el número de *S. mutans* es bajo, lo que sugiere que la presencia de un alto número de *S. sanguinis* se asocia con bajo riesgo de caries. Por el contrario, los autores han propuesto que concentraciones relativamente altas de *S. mutans* en proporción a *S. sanguinis* sugieren alta incidencia de caries. Además, se piensa que el aumento del número de *S. mitis* puede promover la caries, aunque los mecanismos involucrados no han sido bien definidos. También, se ha encontrado que *S. salivarius* aumenta proporcionalmente en la placa de los niños con caries, aunque su papel en la etiología de la caries no es todavía claro (Becker y cols., 2002).

Corby y cols. (2005) encontraron que la cantidad de *Streptococcus parasanguinis*, *Abiothropia defectiva*, *Gemella haemolysans*, *Streptococcus cristatus* y *S. sanguinis*, considerados beneficiosos, es mayor en sujetos sin caries que en los sujetos con caries. Especialmente *S. sanguinis* ha sido asociado a un buen estado de salud.

Entonces, las concentraciones relativas de las especies de *Streptococcus* pueden indicar estados de salud y enfermedad en el medio bucal. Con el fin de predecir la enfermedad, como la caries, el conocimiento de las proporciones normales relativas de las especies endógenas en la boca a distintas edades es fundamental.

Streptococcus mutans ha sido implicado como el principal agente etiológico de la caries dental, debido a su alto número en la placa antes de la aparición de caries, su capacidad para degradar rápidamente los carbohidratos con la formación de ácido abundante y su capacidad de inducir una tolerancia a los ambientes de bajo pH (Mei Deng y cols., 2007). La capacidad de *S. mutans* para producir grandes

cantidades de ácido, disminuyen el pH. *S. mutans* se multiplica en la placa y genera ácidos orgánicos como el ácido láctico, ácido propiónico, ácido fórmico y ácido butírico, que actúan desmineralizando las superficies dentarias y, por tanto, promoviendo la caries dental (Kohler y cols., 1995). Las bacterias generalmente tienen un rango de pH relativamente estrecho para el crecimiento que pueden influir en su distribución intraoral (Bickel y Cimasoni, 1985). Se ha demostrado que un descenso brusco en el pH puede cambiar el equilibrio de las comunidades microbianas orales notablemente, con bacterias periodontopáticas creciendo mal y bacterias acidófilas, como *Lactobacillus casei* y *S. mutans*, predominando (McDermind y cols., 1986).

Un mecanismo que utiliza el *S. mutans* para fomentar la formación de placa es la síntesis de glucano insoluble en agua utilizando GTFasas (glucosiltransferasas) (Wiater y cols., 1999; Koo y cols., 2000). Las GTFasas pueden absorber la saliva superficial del diente recubierto de una forma activa y a partir de sacarosa sintetizar glucano insoluble en agua (Hamada y Torii, 1980; Wiater y cols., 1999). La síntesis de glucano insoluble en agua es una de las propiedades más importantes de virulencia de *S. mutans*, que contribuye a la formación de la placa dental (Yu y cols., 2007) donde *S. mutans* metaboliza los carbohidratos contenidos en los alimentos y libera los ácidos orgánicos, que desmineralizan la superficie del diente y provocan la caries dental (Kohler y cols., 1995; Matsumoto y cols., 1999; Abdus Salam y cols., 2004). Sin embargo, las biopelículas formadas por *S. mutans* son débiles y esto está en consonancia con el hecho de que no se consideran colonizadores iniciales de las superficies de los dientes (Nyvad y Kilian, 1990). *S. oralis* y *A. naeslundii* pertenecen al grupo de los colonizadores iniciales (Kolenbrander y cols., 2006; Li y cols., 2004).

Al menos dos GTFasas diferentes son necesarias para sintetizar estos glucanos (Ciardi, 1983). Una enzima llamada GTF-S, que sintetiza una dextrana (1-6) ramificada, mientras que la otra enzima, denominada GTF-I, sintetiza un α 1-3 glucano (Ciardi, 1983; Mukasa y cols., 1974; Walker y cols., 1984). *S. mutans* parece producir principalmente GTF-S, mientras que *S. sobrinus* puede producir

tanto GTF-S como GTF-I (Chludzinski y cols., 1976; Ciardi y cols., 1976). Sin embargo, la enzima GTF-S de *S. mutans* puede generar glucanos tanto solubles como insolubles (Kuramitsu y Wondrack, 1983b; Meyer y cols. 1978). Se desconoce cómo es que ocurre esto sin embargo se ha observado que en condiciones donde la enzima se forma tiende a agregarse, se producen diversas cantidades de glucanos insolubles (Kuramitsu y Wondrack, 1983a). La agregación puede ser consecuencia de complejos con ácidos teicóicos (Rolla y cols., 1979), que estén presentes en la placa, con fosfolípidos como lipofosfatidilcolina, que esté presente en la saliva, o con pequeñas cantidades de glucanos insolubles (Kuramitsu y Wondrack, 1983b) o por una elevada salinidad del medio ambiente, como NH_4SO_4 1.5 M (Newman y cols., 1980) o los niveles de sobresaturación de calcio que se presenten en la placa y la saliva (Mukasa y cols., 1979).

Se ha implicado a otro grupo numéricamente predominante. Estos organismos forman un subgrupo diferente de los otros estreptococos, llamados de "pH bajo" no-MS (no *Streptococcus mutans*) (Van Houte, 1994). Son capaces de producir ácido a un pH bajo (<4,4) y pueden inducir a la caries en los roedores (Willcox y cols., 1990). Los niveles altos de estos organismos en la placa dental humana también han sido relacionados con un estado de caries (Van Houte y cols., 1991; Sansone y cols., 1993). Basándose en la labor taxonómica de Kilian y cols. (1989), el grupo de "pH bajo" no-MS parece incluir las especies estreptocócicas: *S. gordonii*, *S. mitis*, *S. anginosus* y *S. oralis*. La aparición de estos organismos en la placa con una acidez mayor, probablemente refleja su nivel relativamente alto de tolerancia a los ácidos, es decir, su capacidad para tolerar un medio ácido con respecto a su crecimiento, supervivencia y acidogénesis (Van Ruyven y cols., 2000).

Sin embargo, existen *Streptococcus* spp. pertenecientes a la microbiota habitual de la boca capaces de amortiguar el efecto producido por el descenso del pH. Entre las especies de bacterias orales que han sido identificados como ureolíticas, es habitual encontrar en los tejidos blandos de la boca, grandes cantidades de *S.*

salivarius (Bowden y cols., 1979) que puede producir altos niveles de ureasa (Sissons y Cutress, 1987). La concentración de urea varía de 3 a 10 mM en boca, en saliva y los fluidos creviculares de los individuos sanos (Golub y cols., 1971). La producción de amoníaco generado de la hidrólisis de la urea es una fuente primaria de nitrógeno, de aminoácidos y de álcali en la cavidad oral. Este metabolismo se cree que inhibe la iniciación y progresión de la caries dental (Kleinberg, 1967; Peterson y cols., 1985). La ureólisis puede moderar la acidificación glucolítica de la placa dental (Kleinberg, 1967) y por lo tanto, inhibir la iniciación y progresión de la caries dental al neutralizar ácidos de la placa y el fomento de un entorno menos propicio al desarrollo de especies acidogénicas y acidúricas (Bowden y cols., 1979; Bradshaw y cols., 1989).

2.2.2. Caries en población mexicana

En México solamente contamos con información limitada sobre la magnitud de los principales problemas bucales (Moreno-Altamirano, 2001; Secretaria de Salud, 2001). Esfuerzos aislados han permitido esbozar los rasgos generales de los problemas más importantes. En 1978, De la Rosa, realizó un estudio en niños de 6 a 15 años de edad, en el que observó altos índices de caries, con promedios de 3.78 a 6.05 dientes afectados por caries a los 12 años de edad, según nivel socioeconómico. Jensen y Hermosillo (1983) reportaron una prevalencia de caries en niños de 12 años casi del 100% (97.3%). Sánchez-Pérez (1987) reportó en niños de 12 años un promedio de casi 8 dientes afectados por caries y una prevalencia de 100%. Diversos estudios epidemiológicos realizados recientemente indican que la prevalencia de caries en niños de México se encuentra entre 70% y 85% en la dentición permanente a los 12 años, y de 50% en la dentición temporal de los niños de 6 años, dependiendo de la población de que se trate (Dufoo y cols., 1996; Sánchez-Flores y cols., 1996; Molino-Frechero e Irigoyen, 1996).

Maupomé (1993) estudió a 2596 pacientes de zonas marginales de diferentes estados de la República Mexicana y reportó un índice CPOD (diente cariado,

perdido y obturado; resulta de la sumatoria de dientes permanentes cariados perdidos y obturados) de 8.3 en mayores de 15 años. Rivas y cols. (2000) realizaron un estudio en el estado de Zacatecas (540 adolescentes) y halló un CPOD de 7.2.

Sánchez-Pérez y cols. (2005) realizaron estudios sobre factores de riesgo a caries en niños de primaria en primarias de las delegaciones Álvaro Obregón y Coyoacán, encontrando presencia de caries en el 58% de los niños. En esta población se encontró que todos los niños estaban colonizados por el *S. mutans* en saliva. Segovia-Villanueva y cols. (2005) realizaron estudios en población infantil de la ciudad de Campeche (1303 niños), encontrando que el 44.1% de la muestra presentaba lesiones por caries con distinto grado de severidad.

Durante el año 2006, en la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Autónoma de México, se llevó a cabo un estudio transversal en adolescentes, en el cual se observó una prevalencia de pérdida dental de 19% y una proporción de 38% correspondió a problemas de caries dental (Pérez, 2007). Rivera y cols. (2006) encontraron un índice CPOD de 6.8 y una prevalencia de caries de 97% en 113 estudiantes de bachillerato.

Respecto de las necesidades de tratamiento, son pocos los estudios efectuados. Pineda y cols. (2000) mencionan que el porcentaje de necesidades de tratamiento para caries dental en la población escolar es del 90%. En México, la caries dental es aún el principal problema de salud pública por su elevada prevalencia.

En la década de los 60, la SSA creó la Dirección de Odontología con los objetivos principales de implantar procedimientos preventivos en los diferentes departamentos dentales de los Centros de Salud del país; difundir, especialmente a nivel escolar, los principios higiénicos para fomentar la salud dental; y estudiar la viabilidad de la fluoración del agua potable o de la sal de consumo. Se efectuaron análisis químicos para determinar el contenido del ión flúor en el agua de

diferentes ciudades del país, y se inició la fluoración del agua en las plantas potabilizadoras de Los Mochis, Sin., Veracruz, Ver., y el conjunto urbano Nonoalco-Tlatelolco, en el DF (Medina-Solís y cols., 2006).

Durante la década de los 70 y 80, debido a los altos costos, se consideró conveniente instaurar programas preventivos de amplia cobertura para la población general. La fluoración de la sal doméstica representaba un mejor vehículo de distribución. En marzo de 1981 se decretó en México la fluoración de la sal (Secretaría de Salud, 1981).

Actualmente, las acciones preventivas y educativas dirigidas a la niñez escolar mexicana se basan en la norma "NOM-009-SSA2-1993 para el fomento de la salud del escolar", en la cual se puede observar un componente sobre salud bucal. Asimismo, en la década de los 90 se publica la NOM-013-SSA2-1994, para la prevención y control de las enfermedades bucales (Medina-Solís y cols., 2006).

2.2.3. Prevención de la caries

Sin lugar a dudas la higiene oral es uno de los componentes más importantes en cualquier programa de prevención. El procedimiento mecánico es el más efectivo para prevenir la formación de la placa; sin embargo la mayor parte de la población no realiza un cepillado eficiente. El cepillo de dientes es utilizado por más del 90% de la población en muchos países occidentales. En promedio las personas utilizan el cepillo de dientes 30 segundos diariamente. Esta cantidad de tiempo resulta en un cepillado cosmético, el cual deja, durante corto tiempo una sensación agradable de limpieza (Cárdenas, 2003).

Incluso, a fin de mejorar la eficacia de la higiene bucal, se han desarrollado cepillos de dientes eléctricos. Sin embargo, los beneficios de los diversos tipos de cepillos de dientes eléctricos sobre el cepillado manual no siempre son evidentes, pero está claro que es tan eficaz como el cepillado manual (Sicilia y cols., 2002).

Por otra parte, los tratamientos dentales suelen ser caros y no muy accesibles a gran parte de la población, especialmente en países en desarrollo. Además, se debe establecer un tratamiento preventivo antes de iniciar el tratamiento restaurador. En este sentido, se han realizado grandes esfuerzos para encontrar compuestos anticariogénicos que puedan ser incorporados a productos dentales, complementando el cepillado y reduciendo así la incidencia de caries en humanos (Porto y cols., 2009).

Aunque se han utilizado compuestos fluorados en el control de la placa dental (Guha-Chowdhury y cols., 1995), estos muestran citotoxicidad si se utilizan en una concentración mayor a 80 ppm (Jeng y cols., 1998). Para la operación del programa nacional de fluoración de la sal se estableció un acuerdo entre la SSA, la Secretaria de Comercio y Fomento Industrial y la Asociación Mexicana de la Industria Salinera, para la producción, distribución y comercialización de la sal en los estados donde el abastecimiento de agua potable contiene flúor en cantidad menor a la óptima (0.7-1.59 ppm) (SSA, SECOFI, AMISAC, 1991).

Los enjuagues bucales han sido investigados para evitar la formación de la placa dental, pero la caries sigue siendo una causa importante de la pérdida de dientes (Pan y cols., 1999). Se han llevado a cabo esfuerzos para la búsqueda de compuestos anticariogénicos que pueden ser incorporados en productos dentales (Ambrosio y cols., 2008) cuya finalidad es complementar la eliminación mecánica de las biopelículas de la cavidad oral y la reducción de la incidencia de caries en los seres humanos (More y cols., 2008).

El inicio y la progresión de la caries dental están relacionados con una serie de factores interrelacionados. Toda medida preventiva que interfiere con algunos de estos factores respectivos sería una herramienta útil anticaries. La introducción de un agente bactericida en la cavidad oral, que sólo actúe sobre el *S. mutans* puede facilitar la colonización por otros organismos no cariogénicos (Drucker y Green, 1981).

La clorhexidina (CHX) es el más eficaz y mejor documentado agente antimicrobiano contra *S. mutans* y la caries dental (Truin y cols., 1996). Tiene alta resistencia a la inactivación, por efecto de la saliva, amplio espectro de actividad antibacteriana y se carga positivamente, interactuando con las paredes celulares y las membranas de las bacterias. La acción inhibitoria de la CHX sobre la formación de las biopelículas se puede producir a través de diferentes mecanismos: efecto bactericida inmediato; efecto bacteriostático prolongado por CHX unido a su superficie, la obstrucción de los grupos ácidos de las glicoproteínas salivales, la inhibición de la adhesión inicial a través de bacterias uniéndose a la superficie bacteriana en cantidades subletales; la formación de biopelículas perturbadas por la precipitación de los factores aglutinantes de la saliva y desplazando el calcio de la matriz de la biopelícula (Quirynen y cols., 2001). Sin embargo, el principal problema clínico con el uso de CHX es la dificultad de suprimir o eliminar a *S. mutans* durante períodos prolongados.

Además, la CHX junto con varios antibióticos como la ampicilina, metronidazol y sales cuaternarias de amonio, entre otros, que también han sido muy eficaces en la prevención de la caries dental (Chung y cols., 2006; Tsui y cols., 2008), han presentado efectos adversos, como la coloración del diente, el aumento de la formación de cálculos, la diarrea y desarreglos de la flora oral e intestinal que se han asociado con el uso de estas sustancias químicas (Chung y cols., 2006, More y cols., 2008). Estos inconvenientes justifican la búsqueda de nuevos compuestos eficaces anticaries que podrían ser empleados en la prevención de caries. Por lo tanto, es importante desarrollar nuevos agentes de prevención de la caries dental (Pan y cols., 1999).

Muchos estudios han demostrado que algunos productos naturales pueden interferir con la supervivencia y factores de virulencia de *S. mutans*. Se ha observado un efecto potencial anticaries *in vivo* e *in vitro* para compuestos bioactivos naturales (Koo y cols., 2002; Yatsuda y cols., 2005; Duarte y cols., 2006). Así, las plantas medicinales son una fuente potencial de biomoléculas que

son investigadas como tratamiento coadyuvante para controlar las bacterias cariogénicas dentales.

2.3. Extractos y compuestos naturales

El reino vegetal ha sido durante mucho tiempo una fuente de medicamentos y sigue contribuyendo de manera significativa al desarrollo de los productos farmacéuticos de hoy (Cragg y cols., 1997). La gran diversidad de las estructuras químicas de los metabolitos secundarios de las plantas sigue proporcionando nuevas e importantes pistas con fines farmacológicos (Fabricant y Farnsworth, 2001; Balunas y Kinghorn, 2005). Se ha demostrado que los extractos de té verde inhiben el crecimiento de *S. mutans in vitro* (Sakanaka y cols., 1989; Yoshino y cols., 1995) y previene su adhesión al esmalte dental (Sakanaka y cols., 1989). Estas propiedades son atribuidas a las catequinas (Hamilton-Miller., 2001). Los extractos de té oolong reducen la formación de la placa dental en humanos (Ooshima y cols., 1994; Matsumoto y cols., 1999). Los extractos de té verde, cacao y de café inhiben la actividad de glucosiltransferasa (Kashket y cols., 1985; Sakanaka y cols., 1989) y la formación de glucano por *S. mutans*, mientras que los extractos acuosos de algunas plantas de África han demostrado que inhiben la adhesión de *S. mutans* a los dientes (Wolinsky y Sote., 1984).

Yoshino y cols. (1995) reportaron que el té verde tiene un efecto más fuerte de supresión en el crecimiento de *S. mutans* que el té negro, el té oolong (té semi-fermentado) y las hojas de té Pu-erh (té negro fermentado) y sugirieron que ello se debe a la poca cantidad de catequinas en estos tés fermentados y que la presencia de ácido gálico y té-flavinas contribuyeron a la actividad antimicrobiana.

Smullen y cols. (2006) reportaron que los extractos de plantas que contengan altos niveles de polifenoles inhiben el crecimiento de *S. mutans* y otras bacterias. La inhibición de *S. mutans* se produjo en presencia de sacarosa y glucosa, dos de los componentes principales del azúcar utilizado en productos de confitería y alimentos, inhibiendo la producción de ácido. También es inhibida la adhesión de *S. mutans*, lo que sugiere que la síntesis del glucano también se inhibió.

Los polifenoles presentes en el cacao y café parecen ser principalmente eficaces contra la adherencia de bacterias en la superficie de los dientes, mientras que los polifenoles del té ejercen diferentes acciones: la infusión de té se puede utilizar como una fuente de liberación lenta de catequinas y té-flavinas, favoreciendo el crecimiento de *Streptococcus* spp., pero también pueden inhibir la adherencia de *S. mutans* a la superficie del diente (Ferrazano y cols., 2009).

Yu y cols. (2007) trabajaron con un extracto de *Cyperus rotundus* que suprime la síntesis de glucano insoluble en agua producido por *S. mutans*. En informes anteriores se había reportado que *C. rotundus* contenía aceites esenciales incluyendo 2-cypera 4-dieno, cypereno, rotundeno y valenceno y sesquiterpénicas, triterpenos, alcaloides y flavonas (Zhu, 1998; Ohira y cols., 1998; Sonwa y Konig, 2001).

Ambrosio y cols. (2007) trabajaron con el ácido kaurenoico, un diterpeno aislado de *Aspilia foliacea*, sugiriendo que se podría utilizar como un prototipo para el descubrimiento de nuevos fármacos eficaces contra agentes patógenos causantes de caries y enfermedades periodontales.

2.3.1. Triterpenoides

Existen evidencias del potencial antiinflamatorio y antimicrobiano de triterpenos aislados de fuentes naturales. Holanda y cols. (2008) evaluaron el potencial antiinflamatorio de α - y β -amirina (aislada de *Protium heptaphyllum*) en ratas con periodontitis aguda, observando retardo en el proceso inflamatorio cuando se suministraban los triterpenos, sugiriendo su eficacia para prevenir periodontitis crónica asociada a la pérdida de hueso. Johann y cols. (2007) valoraron la actividad antifúngica de triterpenos pentacíclicos de la amirina (aislada de *Protium heptaphyllum*) y de 15 derivados sintéticos contra especies del género *Candida*, advirtiendo la inhibición en la adhesión de *C. albicans* a células epiteliales humanas. Estos compuestos han demostrado actividad antimicrobiana moderada

ante *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* y *Trycophyton mentagrophytes* (Villaseñor y cols., 2004) y la β - amirina en contra de *E. coli* (Jain y cols., 2003).

Durante los últimos 10 años se han sintetizado diversos derivados de triterpenoides tales como la α - y β - amirina. Las modificaciones producidas por la introducción de un grupo sustituto puede modificar propiedades fisicoquímicas de la molécula, tales como la hidrofobicidad, densidad electrónica, etc. , lo cual podría conferirle una mayor eficacia, selectividad y una menor toxicidad (Johann y cols., 2007).

Saeed y Sabir (2001) aislaron compuestos triterpenoides de las semillas de *Caesalpinia bonducella*, estos compuestos (lupeol, acetato de lupeol, α - y β - amirina) demostraron actividad antimicrobiana contra distintas cepas de bacterias Gram positivas y Gram negativas.

El ácido asiático, un triterpeno que se encuentra en la *Centella asiática* (Niranjan y cols., 1989) ha sido usado tradicionalmente como un tónico en enfermedades de la piel y la lepra (Shukla y cols., 1999) mientras que el ácido arjunólico, se ha aislado de *Syzygium samarangense* y *Syzygium cordatum*. Estos metabolitos han mostrado actividad antibacteriana contra *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y *Shigella sonnei* (Djoukeng y cols., 2005).

El ácido betulínico es un triterpeno de origen natural aislado de varias plantas. El ácido betulínico extraído de las hojas de *Vitex negundo* ha demostrado actividad antibacteriana frente a *Bacillus subtilis* (Chandramu y cols., 2003). Del mismo modo, el ácido betulínico y tres nuevos derivados: el éster 7β -(4'-hidroxibenzoiloxi) del ácido betulínico, el éster 7β -(4'-hidroxi- 3'-metoxibenzoiloxi) del ácido betulínico y el éster 27 -(4'-hidroxi-3'-metilbenzoiloxi) del ácido betulínico, que fueron aislados de la corteza del tallo de las plantas medicinales brasileñas *Zizyphus joazerio*, mostraron una considerable actividad contra bacterias Gram positivas (Schühly y cols., 1999).

Kuigoua y cols. (2010) encontraron que los triterpenoides: ácido ajunólico, ácido ursólico, ácido oleanólico, acetato β -amirina, ácido betulínico, lupeol y su acetato, extraídos de plantas del género *Plumeria*, mostraron moderada actividad antimicrobiana contra *Bacillus megaterium*, *Escherichia coli*, *Chlorella fusca*, y *Microbotryum violaceum*.

2.3.2. *Bursera simaruba* y *Byrsonimia crassifolia*

México tiene una gran riqueza de plantas medicinales y una tradición ancestral sobre sus usos. Estimaciones actuales consideran que cerca de 3000 plantas medicinales se utilizan en México (Linares y cols., 1999), un país con una gran variedad de tradiciones y prácticas populares que tienen gran valor y son necesarios para el rescate y estudio científico.

Bursera simaruba es un árbol ampliamente distribuido en la zona tropical de México y es bien conocido por sus aplicaciones como cataplasmas de las hojas contra las bacterias relacionadas con enfermedades (Yasunaka y cols., 2005).

La corteza de *Bursera simaruba*, además de ser usada para la cicatrización de heridas, es ampliamente utilizada en medicina popular para aliviar el malestar de las picaduras de insectos, quemaduras solares, erupciones, llagas en la piel; su infusión se toma como té para aliviar la disentería, la diarrea, para las infecciones de las vías urinarias, la fiebre, los resfriados y la gripe (Balick y Arvigo, 1998). *Bursera simaruba*, ha mostrado actividad antibacteriana contra cepas Gram negativas, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* (Camporese y cols., 2003).

Los estudios fitoquímicos para esta planta han demostrado la presencia de algunos compuestos como los lignanos (Ciccio y Rosales, 1995), triterpenos, lupeol, epilupeol, α -amirina y β -amirina, epiglutinol (Peraza-Sánchez y cols., 1995) y picropoligamaina (Peraza-Sánchez y Peña-Rodríguez, 1992). Entre estos compuestos, el lupeol ha mostrado actividad *in vitro* contra bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus albus*, *Bacillus subtilis*) y las

bacterias Gram negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella dysenteriae*, *Proteus vulgaris* y *Pseudomonas pyocyanea*) (Goyal y Rani, 1989).

Byrsonima crassifolia es un árbol tropical de la familia *Malpighiaceae* ampliamente distribuido en varias regiones de México, América Central y del Sur y se conoce popularmente como "nanche" (Martínez, 1979). Se ha utilizado con fines medicinales desde la época prehispánica por varios grupos étnicos como los indios Mixes de Oaxaca (Geiss y cols., 1995), y los Zoques, Tzeltales y Tzotziles de los pueblos de Chiapas, México (Berlín y Berlín, 1996). La corteza y las hojas se utilizan para tratar la tos, trastornos gastrointestinales, infecciones de la piel y las picaduras de serpiente (Rastrelli y cols., 1997). Los frutos son comestibles y comúnmente se venden en los mercados locales. Las hojas y extractos de corteza han mostrado efecto antimicótico (Cáceres y cols., 1993) y antidermatofítico (Cáceres y cols., 1991).

La composición química heterogénea de *B. crassifolia* se ha señalado en varios informes. Tritérpenos, esteroides, ésteres aromáticos, aminoácidos y una serie de nuevos glicolípidos han sido aislados de los extractos metanólicos de las hojas de esta planta (Amarquaye y cols., 1994; Béjar y cols., 1995; Rastrelli y cols., 1997).

El extracto de metanol de las raíces ha mostrado actividad frente a *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *E. coli* y *Salmonella Typhi* (Martínez y cols., 1999). El extracto metanólico de la raíz y la corteza del tallo de *B. crassifolia* mostró actividad antimicrobiana contra *Streptococcus pyogenes* (Cáceres y cols., 1990). El extracto crudo ha mostrado actividad antibacteriana significativa contra *S. aureus*, *E. faecium*, *B. subtilis*, *E. coli*, *K. pneumonia*, *P. aeruginosa*, *S. mutans*, *P. gingivalis*.

III. Justificación

A pesar de los grandes logros en la salud bucal alrededor del mundo, hay problemas graves particularmente en países en vías de desarrollo. La caries y las enfermedades periodontales son dos de las patologías comúnmente asociadas a la ausencia de salud bucal.

La caries sigue siendo un problema de salud pública, afectando tanto a población escolar como a la mayoría de los adultos. Es una enfermedad muy común en países como México, donde se calcula que el índice de dientes cariados, perdidos y obturados en menores de 12 años (COPD-12), según la Organización Panamericana de la Salud (OPS) es menor a 3.

En México se han desarrollado una serie de programas gubernamentales para combatir las enfermedades bucales, programas como la fluoración de la sal, la creación de normas oficiales referentes a la salud bucal y las semanas nacionales de la salud bucal. Sin embargo la incidencia de caries aún es alta.

Existe una diversa gama de compuestos que se han desarrollado para prevenir y combatir la caries, sin embargo algunos de ellos han presentado severos efectos secundarios e incluso algunas bacterias han desarrollado resistencia a algunos de ellos.

En la medicina tradicional mexicana la corteza del nanche (*Byrsonima crassifolia*) se usa como antidiarreico, para infecciones en la matriz, inflamación en los ovarios, contra dolores de estómago, sarna, salpullido, para afianzar las encías, contra el resfriado e incluso para las mordeduras de víbora, mientras que la corteza del copalillo (*Bursera simaruba*) se usa como antipirético, contra hemorragias nasales, dolor muscular, para la limpieza de heridas, contra infecciones en las encías, como purgante y antimicótico.

De ellos se han aislado compuestos triterpenoides, de los cuales se han estudiado sus propiedades antibacterianas sobre diversas bacterias, distintas a las bacterias patógenas de la cavidad oral. Es por ello que existe la necesidad de evaluar la

posible actividad anticariogénica de los compuestos triterpenoides extraídos de fuentes naturales, las cuales han sido usadas en la herbolaria tradicional mexicana desde hace mucho tiempo por sus propiedades medicinales.

IV. Objetivos

Objetivo general: Evaluar la posible actividad antimicrobiana de compuestos triterpenoides, como la α - y β - amirina extraída de la corteza de *Bursera simaruba* y *Byrsonima crassifolia*, así como derivados de estos compuestos, sobre bacterias presentes en la cavidad oral.

Objetivos particulares:

- Desarrollar una metodología que permita evaluar los compuestos triterpenoides en medio acuoso.
- Evaluar el efecto de los compuestos α - y β - amirina, fenilacetato de α -amirina, ácido betulínico, octanoato de α -amirina y palmitato de α -amirina sobre una concentración bacteriana similar a la presente en personas en estado de salud y una concentración bacteriana similar a la presente en personas con caries.

V. Materiales y Métodos

5.1. Materiales

5.1.1. Cepas y procedencia

Para este proyecto se trabajó con una colección de cepas de la microbiota de la cavidad oral pertenecientes al género *Streptococcus*: *S. mutans*, *S. salivarius*, *S. sanguinis*, *S. mitis* y *S. oralis*. En la tabla 3 se describen las especies evaluadas y los datos de su procedencia.

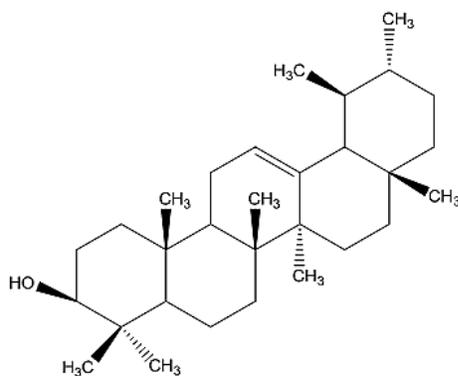
Tabla 3.- Cepas estudiadas y su procedencia.

Cepa	Origen	Proporcionada por:
<i>S. mutans</i> (A)	UAM, Xochimilco	Dra. Teresita Sainz
<i>S. mutans</i> (B)	Facultad de Medicina	Dr. Luis Manuel Perea
<i>S. mutans</i> (C) ATCC 10449	Conjunto E, Facultad de Química	Dr. José Fausto Rivero
<i>S. salivarius</i>	Facultad de Medicina	Dr. Luis Manuel Perea
<i>S. sanguinis</i>	Facultad de Medicina	Dr. Luis Manuel Perea
<i>S. oralis</i> (A)	Facultad de Medicina	Dr. Luis Manuel Perea
<i>S. oralis</i> (B)	Cepario, Facultad de Química	Prof. Alejandro Camacho
<i>S. oralis</i> (C)	Cepario, Facultad de Química	Prof. Alejandro Camacho
<i>S. mitis</i>	Facultad de Medicina	Dr. Luis Manuel Perea

5.1.2. Compuestos

Los compuestos con los que se trabajó en este proyecto fueron proporcionados por el Dr. Arturo Navarro Ocaña y se enlistan a continuación:

- α -amirina (3- α -hidroxi-urs-12-eno)

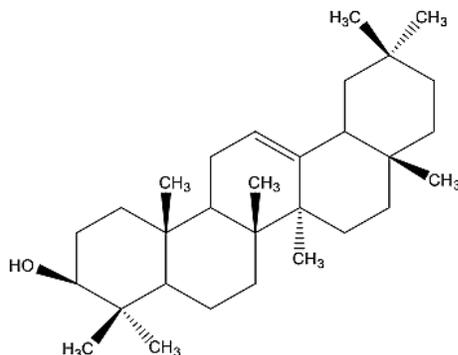


Formula condensada: $C_{30} H_{50} O$

Masa molar: 426.72 g/mol

Solubilidad: altamente soluble en éter, soluble en benceno, ácido acético glacial, de mediana solubilidad en cloroformo y de solubilidad limitada en agua (Merck, 2001).

- β -amirina (3- β -hidroxi-urs-12-eno)



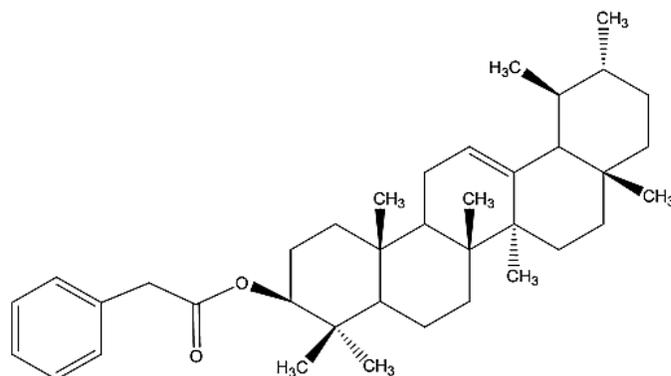
Formula condensada: $C_{30} H_{50} O$

Masa molar: 426.72 g/mol

Solubilidad: altamente soluble en éter, soluble en benceno, ácido acético glacial, de mediana solubilidad en cloroformo y de solubilidad limitada en agua. Menos soluble que α -amirina (Merck, 2001).

De acuerdo con Hernández-Vázquez y cols.(2010), la α -amirina se obtuvo de *Bursera simaruba* mientras que la β -amirina se obtuvo de *Byrsonima crassifolia*.

- Fenilacetato de α -amirina (3- α -fenilacetato-urs-12-eno)

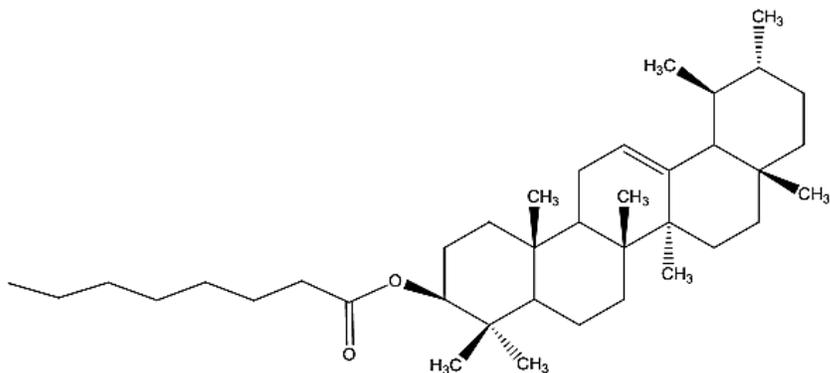


Formula condensada: $C_{38} H_{57} O_2$

Masa molar: 546.72 g/mol

Solubilidad: altamente soluble en benceno, soluble en éter, cloroformo y de solubilidad limitada en agua (Merck, 2001).

- Octanoato de α -amirina (3- α -octanoato-urs-12-eno)

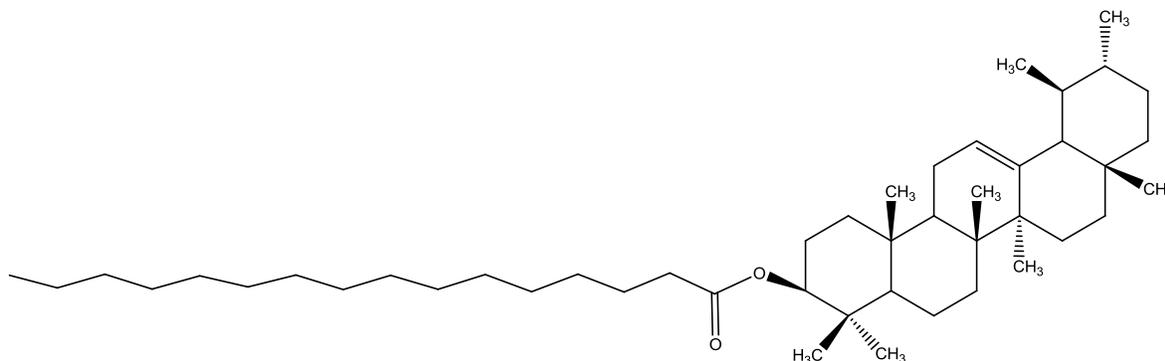


Formula condensada: $C_{38} H_{64} O_2$

Masa molar: 553.73 g/mol

Solubilidad: altamente soluble en benceno, cloroformo y de solubilidad limitada en agua (Merck, 2001).

- Palmitato de α -amirina (3- α -palmitato-urs-12-eno)

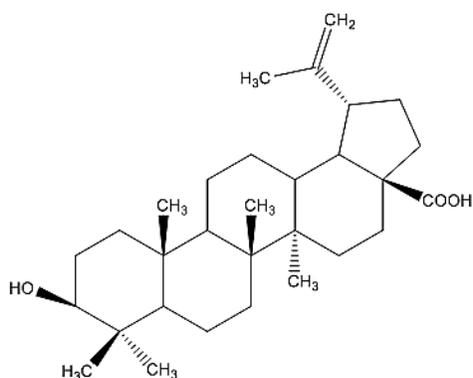


Formula condensada: $C_{46} H_{80} O_2$

Masa molar: 665.73 g/mol

Solubilidad: altamente soluble en benceno y cloroformo, y de solubilidad limitada en agua (Merck, 2001).

- Ácido betulínico (ácido 3- β -hidroxi-lup-20(9)-en-28-oico)



Formula condensada: $C_{30} H_{48} O_3$

Masa molar: 456.71 g/mol

Solubilidad: altamente soluble en benceno, soluble en acetato de etilo, ácido acético, etanol, de mediana solubilidad en diclorometano o cloroformo y de solubilidad limitada en agua (Merck, 2001).

5.2. Métodos

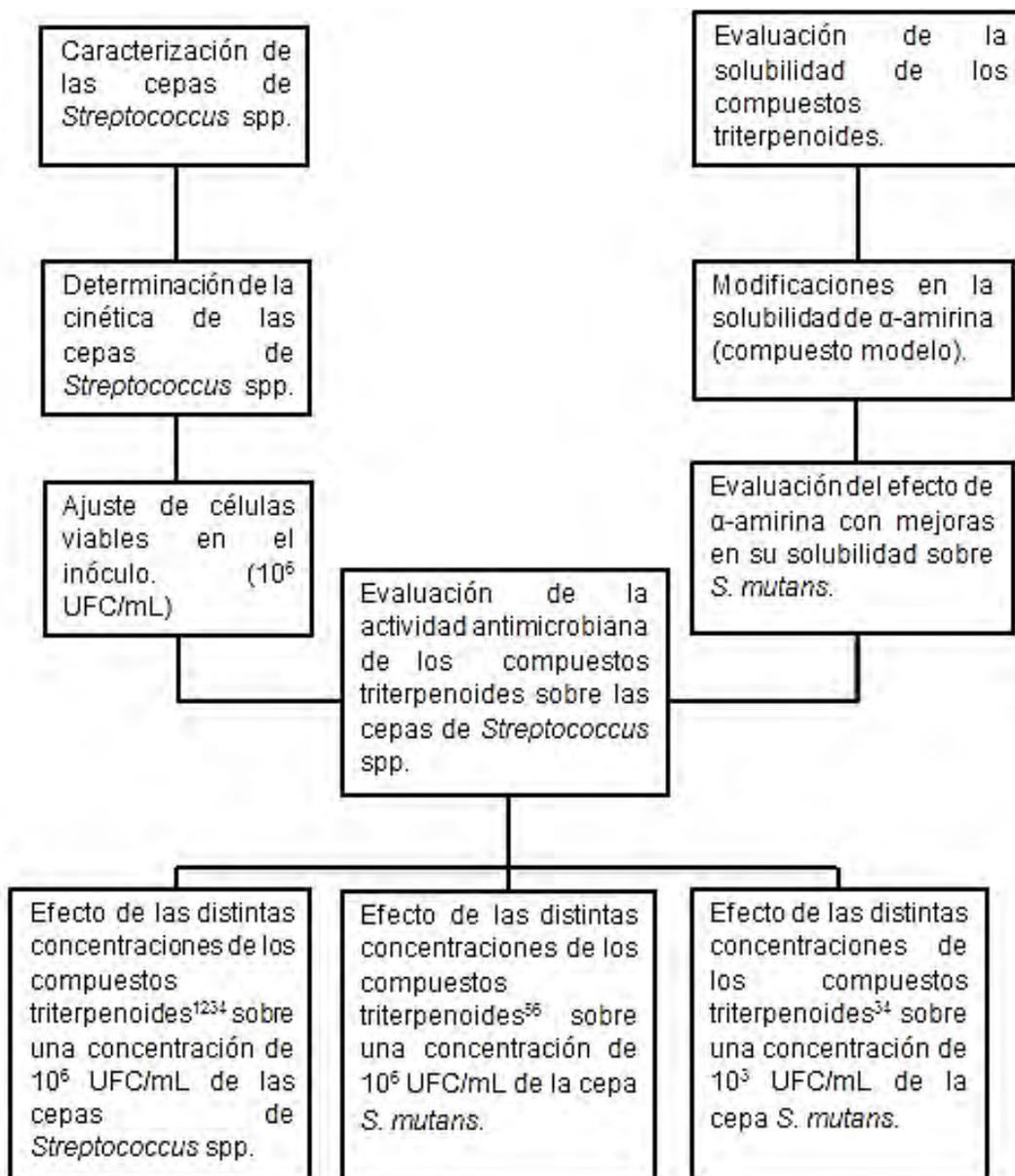


Figura 5.- Esquema general de la metodología. ¹α-amirina, ²β-amirina, ³fenilacetato de α-amirina, ⁴ácido betulínico, ⁵palmitato de α-amirina y ⁶octanoato de α-amirina.

5.2.1. Caracterización de cepas

Las cepas fueron recibidas en caldo BHI (Infusión corazón-cerebro) y se inocularon por estriado en medio TSA (Agar Triptona-Soya). Para determinar la pureza de las cepas se observó su crecimiento en placa (morfología y homogeneidad de las colonias) y las características microscópicas después de realizar una tinción de Gram (Anexo B).

Se evaluó el crecimiento de las cepas y las características de las colonias en los medios TSA, MRS (Agar Man, Rogosa y Sharpe para *Lactobacillus* spp.), KF (Kenner Fecal) para *Streptococcus* fecales. Las cepas se sembraron en agar sangre para determinar su tipo de hemólisis, además se realizó la prueba de la catalasa (anexo B), esta prueba debe ser negativa para las cepas de *Streptococcus* spp.

5.2.2. Conservación de cepas

Las cepas puras, Gram positivas y catalasa negativas aisladas del medio TSA, se inocularon en medio BHI, se tomó 1 colonia aislada con un asa estéril, se colocó en 5 mL de medio BHI y se incubó durante 24h a 37°C. Dichos cultivos, se colocaron en microtubos de plástico de 1.5 mL de capacidad, previamente esterilizados en, una proporción 5:1 cultivo en caldo BHI/glicerol. Los cultivos homogenizados se conservaron en congelación a -64° C, hasta su uso posterior.

5.2.3. Crecimiento de las cepas de *Streptococcus* spp. en el medio líquido BHI

- a) Selección de cepas: Para evaluar el efecto de los compuestos antimicrobianos se eligieron 4 de las cepas que tuvieron un mejor crecimiento en los medios TSA y MRS: *S. sanguinis*, *S. salivarius*, *S. mutans* (B) y *S. oralis* (A).

- b) Monitoreo del crecimiento de las cepas en el medio líquido BHI: Se inocularon 50 μ L del cultivo conservado en glicerol de la cepa correspondiente en 5 mL del medio BHI. Transcurridas 17 horas de incubación a 37°C, se tomaron 300 μ L de este nuevo cultivo y se inocularon en 30 mL de medio líquido BHI (Tiempo 0). El cultivo se incubó a 37°C y se realizó el monitoreo del crecimiento a las 0, 6, 12 y 24 horas mediante la medición de la densidad óptica (absorbancia 600 nm, Espectrofotómetro modelo Spectronic 21D, Milton Roy®) y el pH (Potenciómetro 3020, Jenway®).

5.2.4. Cinética de crecimiento de las cepas de *Streptococcus* spp.

- a) Preparación del inóculo: Se inocularon 50 μ L del cultivo conservado en glicerol de la cepa correspondiente en 5 mL de medio líquido BHI y se incubó a 37°C. Transcurridas 17 horas, se tomó 1 mL de este nuevo cultivo y se inoculó en 100 mL de medio BHI (Tiempo 0).

- b) El monitoreo del crecimiento de las cepas se realizó cada hora durante las primeras 12 horas, también se realizaron las mediciones a las 24 y 48 horas. En cada etapa, se determinó la densidad óptica y el pH. Se realizó la cuenta en placa de la cepa correspondiente en el medio TSA durante 8 horas con intervalos de dos horas. Para realizar el conteo, se realizaron las

diluciones necesarias en solución salina al 0.85% y se inoculó el medio TSA mediante la técnica de superficie usando una asa metálica. Se incubaron las placas durante 24 horas a 37°C y se realizó el conteo de las colonias.

5.2.5. Conteo de células viables en el inóculo

Para realizar el ensayo con los compuestos antimicrobianos fue necesario conocer y estandarizar la concentración de células bacterianas que se tendrían al inicio de cada prueba. Para ello, se usó la información obtenida de la cinética de crecimiento de cada cepa, observando que la densidad óptica es una función del número de células viables. En aquellas zonas de la curva donde el crecimiento se da de manera acelerada, fue posible determinar la concentración (UFC/mL) a una densidad óptica dada. Bajo la premisa anterior se realizó el siguiente ensayo:

Se inocularon 50 µL del cultivo conservado en glicerol en 5 mL medio BHI y se incubó a 37°C durante 17 horas. Se tomaron 50 µL del nuevo cultivo y se inoculó en 5 mL de medio BHI (Tiempo 0). A las 4 horas de tiempo transcurrido se realizaron las diluciones necesarias adicionando caldo BHI estéril para que de acuerdo con la cinética de crecimiento, se tuviera una concentración de 10^6 UFC/mL de la bacteria a ensayar, asumiendo que en la fase de crecimiento exponencial (log) la relación densidad óptica/tiempo es lineal. Para verificar que la densidad óptica correspondía a la concentración celular antes mencionada, se realizó una cuenta en placa en el medio TSA.

5.2.6. Ensayos de solubilidad de los compuestos antimicrobianos

Para poder determinar el efecto antimicrobiano de los compuestos triterpenoides se evaluaron las características de solubilidad de estos, usando como compuesto modelo a la α -amirina y mediante tres estrategias:

- a) utilizando como vehículo la β -ciclodextrina,
- b) dispersando el compuesto con Tween® 80 y
- c) formación de liposomas.

5.2.6.1. Encapsulamiento con β -ciclodextrina (metodología modificada de Kalogeropoulos y cols., 2010)

1. Se pesaron 22.7 mg (0.2 moles) de la β -ciclodextrina y 8.5 mg (0.2 moles) de α -amirina por separado.
2. Por separado, se adicionaron 2.5 mL de agua a la β -ciclodextrina y 2.5 mL de acetona a la α -amirina, se agitaron a temperatura ambiente ambas soluciones hasta la completa disolución del soluto.
3. Se mezclaron ambas soluciones y se filtraron por gravedad en papel filtro de tamaño de poro estándar (8-12 μ m).
4. La solución resultante se sonicó (47 kHz) durante 7 horas a temperatura ambiente y posteriormente, se refrigeró 10°C por 16 horas.
5. La solución se filtró por gravedad en papel filtro de tamaño de poro estándar y se evaporó el disolvente (acetona) en baño maría en una campana de extracción.
6. Se refrigeró a 4°C durante 10 minutos la solución resultante.
7. Se filtró en papel filtro estándar.
8. El producto obtenido se dejó secar durante 1 día a temperatura ambiente (A).

5.2.6.2. Emulsión con Tween® 80

1. Se pesaron 60 mg de α -amirina y se colocaron en un vial de vidrio.
2. Se agregaron 5 mL de agua y 0.36 mL de Tween® 80.

3. La solución se sonicó (47 kHz) a temperatura ambiente durante 4 horas o hasta su completa dispersión.
4. La emulsión se mantuvo en refrigeración hasta su uso (B).

5.2.6.3. Formación de liposomas a partir de lecitina de soya (metodología modificada de Chang y cols., 2001)

1. Se mezclaron 580 mg de lecitina de soya, 50 mg de α -amirina y 58 mL de buffer de fosfatos (10 mM, pH= 7.4).
2. La mezcla se sonicó (47 kHz) durante 2 horas a una temperatura no mayor 10° C, inyectando un exceso de nitrógeno al vial, para desplazar toda la presencia de oxígeno.
3. La dispersión se mantuvo en refrigeración hasta su uso (C).

5.2.6.4. Formación de liposomas a partir de fosfatidilcolina y colesterol (metodología modificada de Qin y cols., 2008)

1. Se pesaron 38.6 mg de colesterol (0.1 mmol), 127.74 mg de fosfatidilcolina (0.1 mmol).
2. La mezcla colesterol/fosfatidilcolina se disolvió en 5 mL de tetracloruro de carbono (CCl₄).
3. Se evaporó en rotavapor (35°C, 200 rpm) hasta obtener una película lípida (formación de una capa traslúcida, ausencia del olor característico del CCl₄).
4. La película se redisolvió en 1 mL de CCl₄ y se le añadieron 10 mL de acetato de sodio 150 mM (pH= 7.6).
5. Se sonicó (47 kHz) la solución resultante hasta formar una emulsión homogénea.
6. Se dejó toda la noche en un desecador con vacío para así evaporar el disolvente.

7. Se añade la α -amirina en una proporción en peso 1 (α -amirina): 5 (solución). La solución se sonicó (47 kHz) en agua/hielo durante 2 minutos.
8. Se realizó una cromatografía de exclusión en un columna de Sephadex G 20 preequilibrada con 10 mL de sulfato de sodio 120mM (pH= 6.3), usando como eluyente 5 mL de acetato de sodio 150mM (pH= 7.6).
9. La suspensión resultante fue incubada a 37° C durante 10 min inyectando un exceso de nitrógeno al vial, para desplazar el oxígeno y evitar que este interaccione con el liposoma.
10. La suspensión se mantuvo en refrigeración hasta su uso (D).

5.2.7. Evaluación de la α -amirina con mejoras en su solubilidad

Para determinar con cuál de las metodologías era conveniente trabajar, se evaluó cada uno de los compuestos de α -amirina obtenidos a través de cada método, con el objetivo de ver si el método afecta la actividad antimicrobiana del compuesto en estudio.

Inicialmente la actividad antimicrobiana se iba a determinar usando el método de microdilución donde, de manera general, se tiene una microplaca de 96 pocillos con concentraciones crecientes de cada antimicrobiano y se inocula con una suspensión del microorganismo a estudiar (Gómez-Garcés y cols., 2010), sin embargo, los compuestos con potencial antimicrobiano otorgan cierta turbidez al medio y las cepas tendencia de formar conglomerados, por lo tanto, se modificó el método realizando simultáneamente una cuenta en placa, para confirmar la presencia o ausencia de actividad antimicrobiana.

- a) Reactivación de la cepa. 50 μ L de la cepa de *S. mutans* fueron inoculados en 5 mL de medio BHI y se incubaron durante 17 h. Se tomaron 50 μ L del cultivo nuevo y se inocularon en 5 mL de medio BHI (Tiempo 0). A las 4 horas de tiempo transcurrido se realizaron las diluciones necesarias, para obtener una concentración de 10^6 UFC/mL de la bacteria a ensayar. Se prepararon 4.5 mL de cada medio a ensayar así como de un control positivo

(solución al 20% de digluconato de clorhexidina) y un control negativo (sin compuesto). Para poder medir la densidad óptica se preparó un blanco (medio sin inocular) por cada muestra. Los medios fueron preparados de acuerdo con la tabla 4.

Tabla 4.- Preparación de los medios de cultivo para evaluar la actividad antimicrobiana de α -amirina.

Componente	+	A	A-	B	B-	C	C-	D	D-
Medio BHI (μ L)	3435	3435	3810	3435	3810	3435	3810	3435	3810
Sacarosa 1% (μ L)	390	390	390	390	390	390	390	390	390
Cepa a evaluar (10^6 UFC/mL) (μ L)	300	300	300	300	300	300	300	300	300
α -amirina / β -ciclodextrina (6 mg/mL) (μ L)	0	375	0	0	0	0	90	60	0
Emulsión α -amirina/Tween® 80 (μ L)	0	0	0	375	0	0	0	0	0
Dispersión α -amirina/ lecitina de soya (μ L)	0	0	0	0	0	375	0	0	0
Dispersión α -amirina/ fosfatidilcolina (μ L)	0	0	0	0	0	0	0	375	0
Digluconato de clorhexidina al 20%	375	0	0	0	0	0	0	0	0
Vol. Final (μ L)	4500	4500	4500	4500	4500	4500	4500	4500	4500

(+) Control positivo, (A) compuesto obtenido por el método de encapsulación con β -ciclodextrina, (A-) control negativo para dichos compuestos, (B) emulsión obtenida usando tween ® 80 como surfactante, (B-) control negativo para dicha emulsión, (C) dispersión obtenida formando liposomas con lecitina de soya, (C-) control negativo para dicha dispersión, (D) dispersión obtenida formando liposomas con fosfatidilcolina, (D-) control negativo para dicha dispersión.

Las muestras se incubaron 24 h a 37° C y se determinó su densidad óptica (600 nm). Se realizó la cuenta en placa en el medio TSA de las diluciones 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} . Las placas se incubaron durante 24 h a 37°C y se realizó el conteo de las colonias. Si en las placas no había crecimiento de la bacteria se considera un efecto antibacteriano, con una concentración mínima inhibitoria (MIC)

correspondiente a la concentración más baja probada, donde no hubo crecimiento de la cepa. En caso contrario, se realizó la cuenta de las placas donde hubo crecimiento de la cepa.

5.2.8. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los distintos compuestos triterpenoides

De acuerdo con lo reportado en la tabla 10, la metodología más conveniente para evaluar la actividad de los compuestos fue la formación de emulsiones usando tween® 80.

Se evaluó el efecto de los compuestos triterpenoides en 2 distintas concentraciones bacterianas:

5.2.8.1. Efecto que los compuestos triterpenoides sobre una concentración de 10^6 UFC/mL de *Streptococcus* spp.

- a) Reactivación de cepas. 50 μ L cultivo conservado en glicerol de cada cepa fueron inoculados en 5 mL de medio BHI y se incubaron durante 17 h. Se tomaron 50 μ L del nuevo cultivo y se inocularon en 5 mL del medio BHI. A las 4 horas de tiempo transcurrido se realizaron las diluciones necesarias, para obtener una concentración de 10^6 UFC/mL de la bacteria a ensayar (tiempo 0).

- b) Compuestos a ensayar. Los compuestos evaluados fueron α -amirina, β -amirina, fenilacetato de α -amirina, octanoato de α -amirina, palmitato de α -amirina y ácido betulínico. Se prepararon 5 mL de emulsión concentrada de cada compuesto (2 concentraciones distintas, 12.5 mg/mL y 1.25 mg/mL) y 5 mL de emulsión blanco (sin compuesto; control negativo), mediante el procedimiento descrito anteriormente (5.3.6.2.). Las concentraciones evaluadas estuvieron en el rango de 10 μ g/mL - 1000 μ g/mL, para los

compuestos α -amirina, β -amirina, fenilacetato de α -amirina, octanoato de α -amirina, palmitato de α -amirina y de 100 μ g/mL - 2000 μ g/mL para el ácido betulínico (tablas 5 y 6). Debido a que la cantidad con la que se contaba de octanoato de α -amirina y palmitato de α -amirina era escasa, el efecto de esos compuestos solo fue evaluado sobre *S. mutans*.

- c) Preparación de los medios de cultivo. Los medios de cultivo fueron preparados de acuerdo con lo indicado en las tablas 5 y 6, del mismo modo se preparó un blanco (medio sin inocular) para cada concentración de cada compuesto evaluado. Los medios y los blancos fueron esterilizados (121 °C, 15 min) y se mantuvieron en prueba de esterilidad durante 24 h. Los medios fueron refrigerados hasta su uso posterior.

Tabla 5.- Preparación de los medios de cultivo para evaluar la actividad antimicrobiana de los distintos compuestos interpenoides (I).

Componente	Concentración a evaluar																
	Control positivo	Control negativo	α -amirina (10 μ g/mL)	α -amirina (53.33 μ g/mL)	α -amirina (100 μ g/mL)	α -amirina (533.33 μ g/mL)	α -amirina (1000 μ g/mL)	β -amirina (10 μ g/mL)	β -amirina (53.33 μ g/mL)	β -amirina (100 μ g/mL)	β -amirina (533.33 μ g/mL)	β -amirina (1000 μ g/mL)	Fenilacetato de α -amirina (10 μ g/mL)	Fenilacetato de α -amirina (53.33 μ g/mL)	Fenilacetato de α -amirina (100 μ g/mL)	Fenilacetato de α -amirina (533.33 μ g/mL)	Fenilacetato de α -amirina (1000 μ g/mL)
Medio BHI (μ L)	3435	3810	3435	3435	3435	3435	3435	3435	3435	3435	3435	3435	3435	3435	3435	3435	3435
Sacarosa 1% (μ L)	390	390	390	390	390	390	390	390	390	390	390	390	390	390	390	390	390
Cepa a evaluar ¹ (10^6 UFC/mL) (μ L)	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300
Stock α -amirina (1.25 mg/mL) (μ L)	0	0	38	200	375	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Stock α -amirina (12.5 mg/mL) (μ L)	0	0	0	0	0	200	375	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Stock β -amirina (1.25 mg/mL) (μ L)	0	0	0	0	0	0	0	38	200	375	0	0	0	0	0	0	0
Stock β -amirina (12.5 mg/mL) (μ L)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	200	375
Stock fenilacetato de α -amirina (1.25 mg/mL) (μ L)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	38	200	375
Stock fenilacetato de α -amirina (12.5 mg/mL) (μ L)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	200
Blanco (μ L)	0	0	340	175	0	175	0	340	175	0	175	0	340	175	0	175	0
Digluconato de clorhexidina al 20%	375	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Vol. Final (μ L)	4500	4500	4500	4500	4500	4500	4500	4500	4500	4500	4500	4500	4500	4500	4500	4500	4500

Tabla 6.- Preparación de los medios de cultivo para evaluar la actividad antimicrobiana de los distintos compuestos terpenoides (II).

Componente	Concentración a evaluar																
	Control positivo	Control negativo	Octanoato de α-amirina (10 µg/mL)	Octanoato de α-amirina (53.33 µg/mL)	Octanoato de α-amirina (100 µg/mL)	Octanoato de α-amirina (533.33 µg/mL)	Octanoato de α-amirina (1000 µg/mL)	Palmitato de α-amirina (10 µg/mL)	Palmitato de α-amirina (53.33 µg/mL)	Palmitato de α-amirina (100 µg/mL)	Palmitato de α-amirina (533.33 µg/mL)	Palmitato de α-amirina (1000 µg/mL)	Ácido betulínico (10 µg/mL)	Ácido betulínico (53.33 µg/mL)	Ácido betulínico (100 µg/mL)	Ácido betulínico (533.33 µg/mL)	Ácido betulínico (1000 µg/mL)
Medio BHI (µL)	3435	3810	3435	3435	3435	3435	3435	3435	3435	3435	3435	3435	3435	3435	3435	3435	3435
Sacarosa 1% (µL)	390	390	390	390	390	390	390	390	390	390	390	390	390	390	390	390	390
Cepa a evaluar ¹ (10 ⁸ UFC/mL) (µL)	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300
Stock octanoato de α-amirina (1.25 mg/mL) (µL)	0	0	38	200	375	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Stock octanoato de α-amirina (12.5 mg/mL) (µL)	0	0	0	0	200	375	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Stock palmitato de α-amirina (1.25 mg/mL) (µL)	0	0	0	0	0	0	38	200	375	0	0	0	0	0	0	0	0
Stock palmitato de α-amirina (12.5 mg/mL) (µL)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	200	375	0	0	0	0
Stock ácido betulínico (1.25mg/mL) (µL)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	38	200	375	0	0
Stock ácido betulínico (12.5 mg/mL) (µL)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	200	375
Bianco (µL)	0	0	340	175	0	175	0	340	175	0	175	0	340	175	0	175	0
Digluconato de clorhexidina al 20%	375	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Vol. Final (µL)	4500	4500	4500	4500	4500	4500	4500	4500	4500	4500	4500	4500	4500	4500	4500	4500	4500

Los medios de cultivo con los compuestos a evaluar se inocularon según lo descrito previamente y se incubaron 24 h a 37° C. Se determinó su densidad óptica (600 nm) y se realizó la cuenta en placa de las diluciones 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} . Las placas se incubaron durante 24 h y se realizó el conteo de las colonias.

5.2.8.2. Efecto que los compuestos triterpenoides sobre una concentración de 10^3 UFC/mL de *S. mutans*

La reactivación de la cepa y la preparación del inóculo se realizaron tal como se describió previamente, excepto que la concentración inicial de bacterias en el medio de cultivo a evaluar fue de 10^3 UFC/mL.

Los compuestos evaluados fueron fenilacetato de α -amirina y ácido betulínico. Se prepararon 5 mL de concentración de emulsión de cada compuesto (2 concentraciones distintas, 12.5 mg/mL y 1.25 mg/mL) y 5 mL de emulsión blanco (sin compuesto; control negativo), mediante el procedimiento descrito anteriormente (5.3.6.2.). Las concentraciones evaluadas estuvieron en el rango de 10 μ g/mL - 1000 μ g/mL. Los medios fueron preparados de acuerdo con lo indicado en la tabla 7, del mismo modo se preparó un blanco para cada concentración de cada compuesto evaluado. Los medios y los blancos fueron esterilizados (121 °C, 15 min) y se mantuvieron en prueba de esterilidad durante 24 h. Los medios fueron refrigerados hasta su uso posterior.

Las muestras se incubaron 24 h a 37 ° C. y se determinó su densidad óptica (600 nm). Se realizó la cuenta en placa de las diluciones 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} . Las placas se incubaron durante 24 h y se realizó el conteo de las colonias.

Tabla 7.- Preparación de los medios de cultivo para evaluar la actividad antimicrobiana de los distintos compuestos triterpenoides sobre *S. mutans*.

Componente	Control positivo	Control negativo	Fenilacetato de α -amirina (10 $\mu\text{g/mL}$)	Fenilacetato de α -amirina (53.33 $\mu\text{g/mL}$)	Fenilacetato de α -amirina (100 $\mu\text{g/mL}$)	Fenilacetato de α -amirina (533.33 $\mu\text{g/mL}$)	Fenilacetato de α -amirina (1000 $\mu\text{g/mL}$)	Palmitato de α -amirina (10 $\mu\text{g/mL}$)	Palmitato de α -amirina (53.33 $\mu\text{g/mL}$)	Palmitato de α -amirina (100 $\mu\text{g/mL}$)	Palmitato de α -amirina (533.33 $\mu\text{g/mL}$)	Palmitato de α -amirina (1000 $\mu\text{g/mL}$)
Medio BHI (μL)	3435	3810	3435	3435	3435	3435	3435	3435	3435	3435	3435	3435
Sacarosa 1% (μL)	390	390	390	390	390	390	390	390	390	390	390	390
Cultivo (10^3 UFC/mL) (μL)	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300
Concentrado fenilacetato de α -amirina (1.25 mg/mL) (μL)	0	0	38	200	375	0	0	0	0	0	0	0
Concentrado fenilacetato de α -amirina (12.5 mg/mL) (μL)	0	0	0	0	0	200	375	0	0	0	0	0
Concentrado ácido betulínico(1.25mg/mL) (μL)	0	0	0	0	0	0	0	38	200	375	0	0
Concentrado ácido betulínico(12.5 mg/mL) (μL)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	200	375
Blanco (μL)	0	0	340	175	0	175	0	340	175	0	175	0
Diguconato de clorhexidina al 20%	375	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Vol. final (μL)	4500	4500	4500	4500	4500	4500	4500	4500	4500	4500	4500	4500

VI. Resultados y Discusión

6.1. Resultados

6.1.1. Caracterización de cepas y selección del medio de cultivo

Para determinar la pureza de las cepas se observó su crecimiento en placa (morfología y homogeneidad de las colonias) y las características microscópicas después de realizar una tinción de Gram. Los resultados se presentan en la tabla 7. De acuerdo con las observaciones microscópicas, las cepas que no presentaban una morfología característica o un Gram característico fueron *S. mutans* (A) y *S. mutans* (B). El objetivo de evaluar su crecimiento en distintos medios fue poder seleccionar el medio sólido donde las cepas tuvieran un buen crecimiento en el menor tiempo. Las características de crecimiento en placa se evaluaron en el medio (Agar triptona-soya), MRS (Man, Rogosa y Sharpe para *Lactobacillus* spp.) y (Kenner Fecal) para estreptococos fecales.

En el medio TSA (Agar triptona-soya), todas las cepas evaluadas presentaron buen crecimiento, en comparación con el medio MRS (Man, Rogosa y Sharpe para *Lactobacillus* spp.). Sin embargo, en el medio KF (Kenner Fecal) para estreptococos fecales solo crecieron bien y en poco tiempo dos de las cepas (*Streptococcus mutans* (A) y *Streptococcus salivarius*). Para las pruebas posteriores en medio sólido se trabajó con el medio TSA.

Las cepas se sembraron en agar sangre para determinar su tipo de hemólisis, la mayoría de las cepas fueron β -hemolíticas, característico del género *Streptococcus*. Además, se realizó la prueba de la catalasa, esta prueba debe ser negativa para las cepas de *Streptococcus* spp. y así se observó en la mayoría de las cepas evaluadas, excluyendo a la cepa *S. mutans* (A) (tabla 8).

Tabla 8 - Características generales de las cepas de *Streptococcus*.

Cepa	Gram	Morfología	Morfología de las colonias en TSA	Morfología de las colonias en Agar MRS	Morfología de las colonias en Agar KF	Hemólisis	Catalasa
<i>Streptococcus mutans</i> (A)	+/-	Cocos	Colonias blancas, redondas, medianas	Colonias blancas, redondas, pequeñas	Colonias blancas, redondas, pequeñas	β	+
<i>Streptococcus mutans</i> (B)	+	Cocos	Colonias blancas, redondas, medianas, de apariencia mucoides	X	X	α	-
<i>Streptococcus mutans</i> (C)	+	Cocos	Colonias blancas, redondas, medianas	X	X	β	-
<i>Streptococcus mitis</i>	+	Cocos	Colonias blancas, redondas, pequeñas	Colonias blancas, redondas, grandes	X	β	-
<i>Streptococcus sanguinis</i>	+	Cocos	Colonias blancas, redondas, pequeñas	Colonias traslúcidas, redondas, pequeñas	X	β	-

* Los símbolos (+) y (-) indican el tipo de Gram de la cepa y el resultado para la prueba de catalasa, positivo (+) y negativo (-). en el caso de la cepa *S. mutans* (A) se visualizaron los dos colores en la tinción. (X) indica que el crecimiento en el medio fue nulo. (α) indica una hemólisis parcial en placa agar-sangre, (β) indica una hemólisis total en placa agar-sangre de acuerdo con Stainer (1992).

Tabla 8(cont.) - Características generales de las cepas de *Streptococcus*.

Cepa	Gram	Morfología	Morfología de las colonias en TSA	Morfología de las colonias en Agar MRS	Morfología de las colonias en Agar KF	Hemólisis	Catalasa
<i>Streptococcus salivarius</i>	+	Cocos	Colonias blancas, redondas, pequeñas	Colonias traslúcidas, redondas, pequeñas	Colonias blancas, redondas, pequeñas	β	-
<i>Streptococcus oralis</i> (A)	+	Cocos	Colonias blancas, redondas, pequeñas	X	X	β	-
<i>Streptococcus oralis</i> (B)	+	Cocos	Colonias blancas, redondas, pequeñas	X	X	β	-
<i>Streptococcus oralis</i> (C)	+	Cocos	Colonias blancas, redondas, pequeñas	X	X	β	-

* Los símbolos (+) y (-) indican el tipo de Gram de la cepa y el resultado para la prueba de catalasa, positivo (+) y negativo (-). en el caso de la cepa *S. mutans* (A) se visualizaron los dos colores en la tinción. (X) indica que el crecimiento en el medio fue nulo. (α) indica una hemólisis parcial en placa agar-sangre, (β) indica una hemólisis total en placa agar-sangre de acuerdo con Stainer (1992).

6.1.2. Crecimiento de las cepas de *Streptococcus* spp. en el medio líquido BHI

Selección de cepas: Para evaluar el efecto de los compuestos antimicrobianos se eligieron 3 de las cepas que tuvieron un mejor crecimiento en los medios TSA y MRS (tabla 7): *S. mitis*, *S. mutans* (B) y *S. salivarius*.

- ***S. salivarius***

En la figura 5 se observa que la cepa alcanzó la fase estacionaria de crecimiento después de las 12 horas y que los valores de pH se modificaron con el tiempo de incubación, alcanzando un valor final de 5.05.

- ***S. mitis***

En la figura 5 se puede observar que la velocidad de crecimiento de *S. mitis* durante las primeras 12 horas es similar a la de *S. mutans*. El pH del medio se redujo como consecuencia del crecimiento del microorganismo, descendiendo hasta un valor de 5.43.

- ***S. mutans* (B)**

S. mutans (B) redujo el pH del medio hasta un valor final de 5.45 después de 12 h de crecimiento, en ese mismo tiempo, tal como se observa en la figura 5, la cepa llegó a la fase estacionaria de crecimiento.

La cinética de crecimiento de las tres cepas evaluadas es semejante (figura 6), ya que llegan a la fase estacionaria alrededor de las 12 horas. De acuerdo con Johnson (1999), la fase lag o acostumbramiento de las bacterias puede alcanzar entre 9-10 horas hasta 1 ó 2 días, en condiciones no óptimas, mientras que la fase de crecimiento exponencial puede durar de media hora hasta 9-12 horas. Como se puede ver la fase de crecimiento exponencial es de 6 horas aproximadamente. Esta información indicó que los mayores cambios en el crecimiento de los microorganismos evaluados se dieron antes de las 12 horas, por lo que fue

necesario realizar el monitoreo del crecimiento de las cepas cada hora durante 12 horas continuas y construir las gráficas que indicaran el comportamiento de las cepas con mayor detalle.

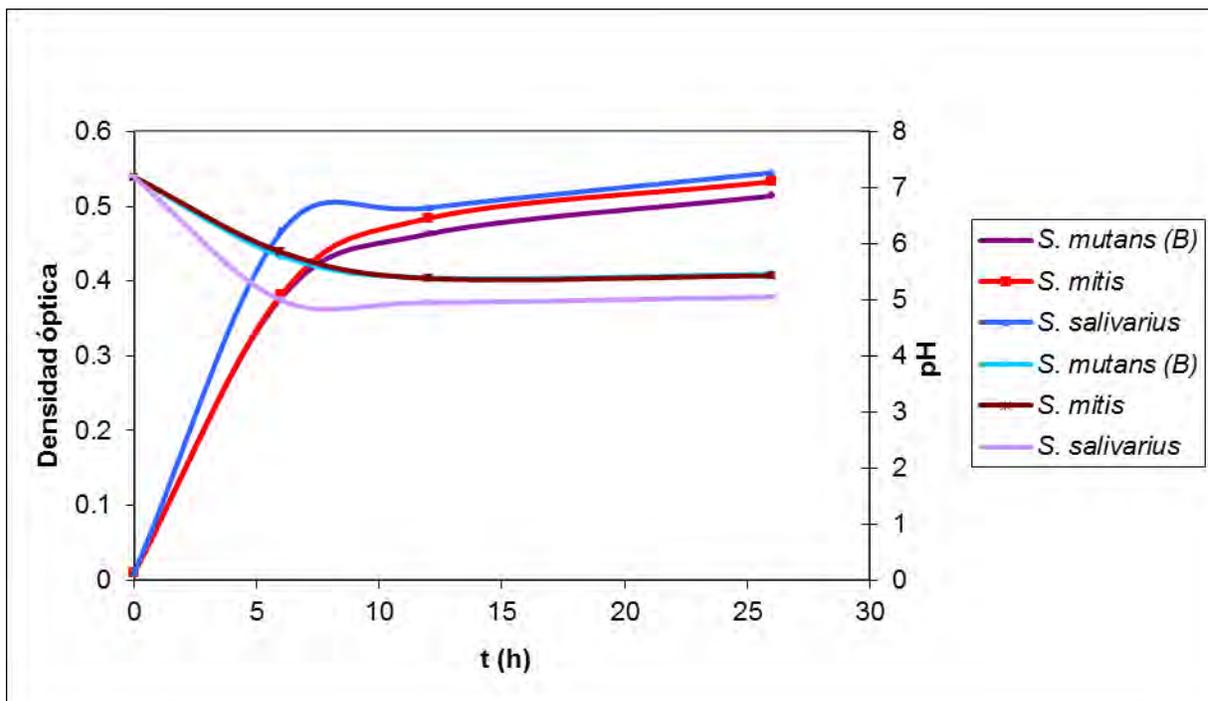


Figura 6.- Comparación del crecimiento de las cepas de *Streptococcus* spp. en el medio líquido BHI.

6.1.3. Cinética de crecimiento de las cepas de *Streptococcus*.

6.1.3.1. *S. salivarius*

En la figura 7 se observa el aumento en la densidad óptica (D.O.) y la disminución del pH, promovidos por el desarrollo de la cepa. Claramente se observa que la cepa crece a mayor velocidad durante las primeras 6 horas. Se observa una fase lag o de acostumbramiento (0-3 horas) y luego un crecimiento acelerado entre las 4-7 horas. El valor de pH desciende hasta 5.16 a las 24 h. Se realizó el conteo en el medio TSA. Los resultados se muestran en la figura 7.

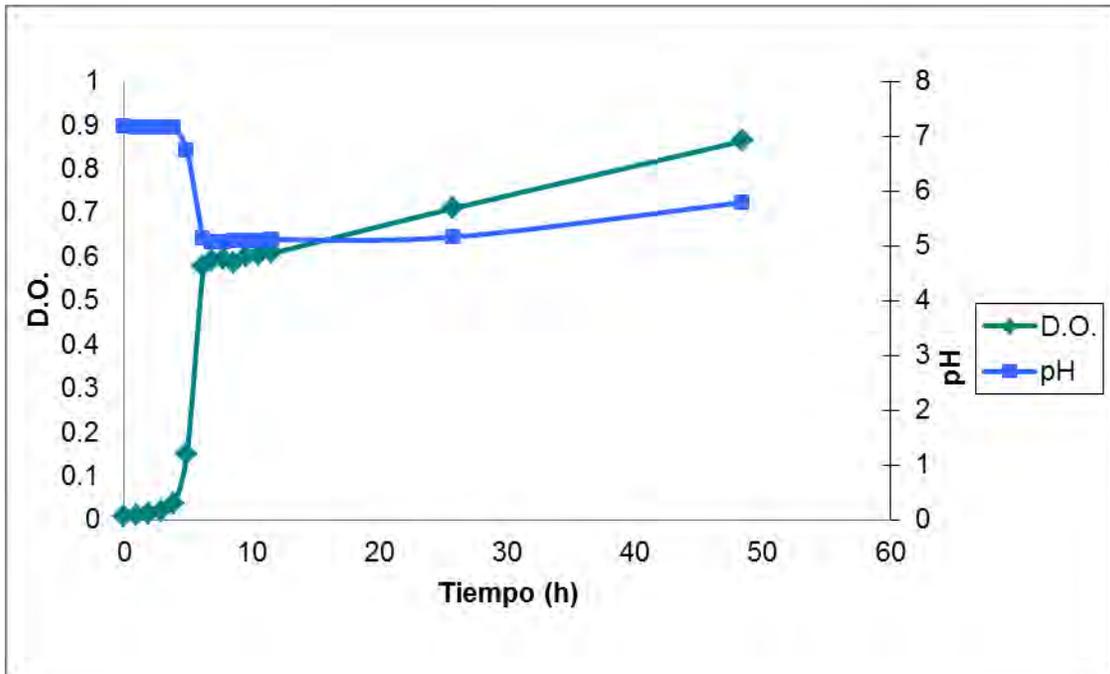


Figura 7.- Cinética de crecimiento de *S. salivarius* en el medio líquido BHI.

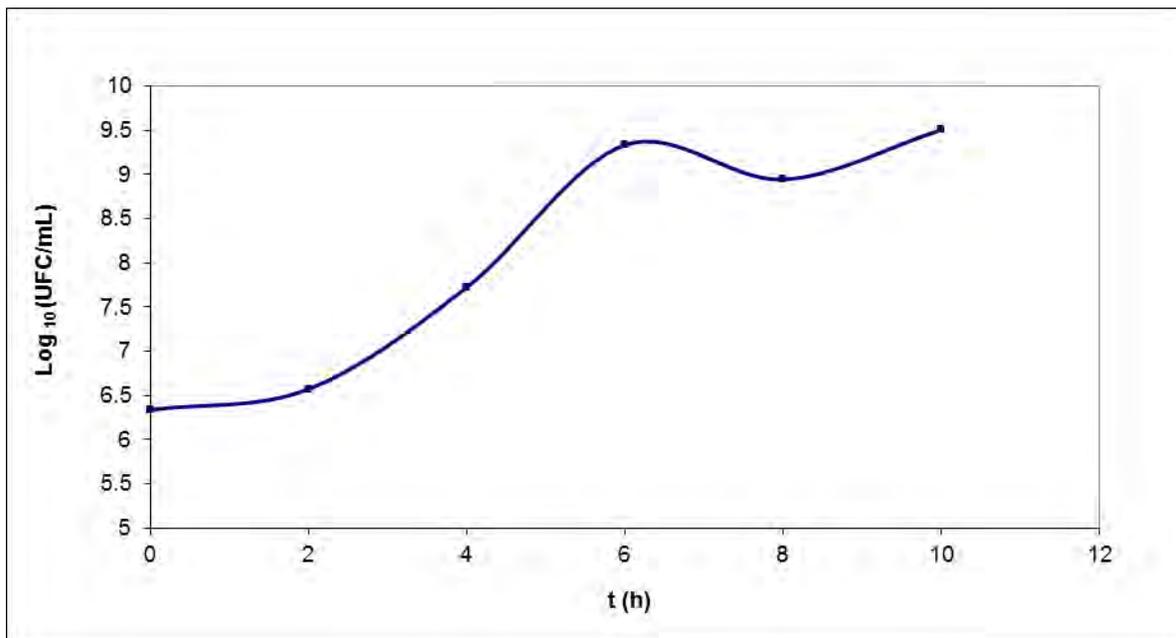


Figura 8.- Cinética de crecimiento de *S. salivarius*, determinación de cuenta viable en el medio TSA.

Se determinó la μ (tasa de crecimiento) utilizando la ecuación que describe la cinética, $dN/dt = \mu N$, donde el incremento del número de células viables (dN) por unidad de tiempo (dt) es proporcional al número de células presentes en el cultivo (N).

Al integrar la ecuación anterior, se transforma en la siguiente función exponencial: $N = N_0 e^{\mu t}$, para transformar esta ecuación en una recta se graficó el logaritmo natural del tiempo contra el logaritmo natural de la concentración correspondientes a la fase exponencial de la cepa obteniendo la siguiente ecuación: $\ln N = \ln N_0 + \mu t$, donde el incremento del logaritmo del número de células viables aumenta linealmente con el tiempo siendo la constante de proporcionalidad μ . De acuerdo con la ecuación de la recta presente en la figura 9, $y = 1.5897x + 11.779$, la μ para *S. salivarius* es de 1.59 h^{-1} .

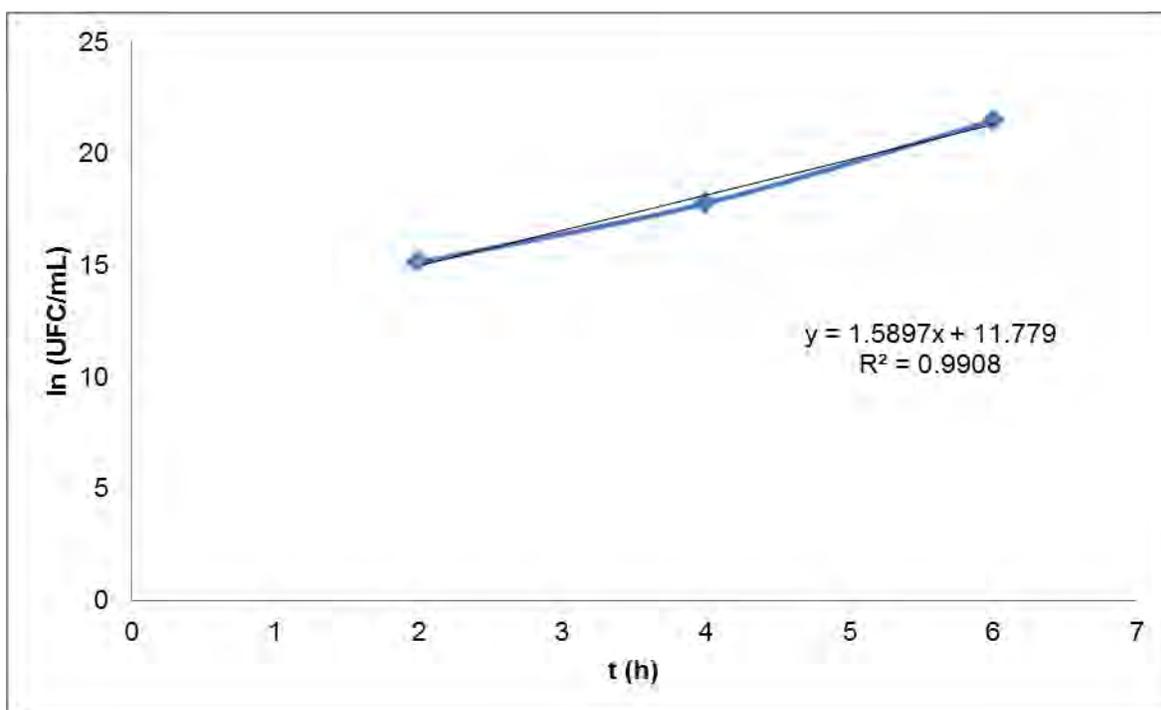


Figura 9.- Determinación de la μ (tasa de crecimiento) de *S. salivarius* a través del método gráfico.

6.1.3.2. *S. mutans* (C)

Se obtuvo un incremento en la densidad óptica y en la cuenta viable en TSA, así como disminución de pH con respecto al tiempo, llegando hasta un valor de 5.96. Los resultados se presentan en la figura 10.

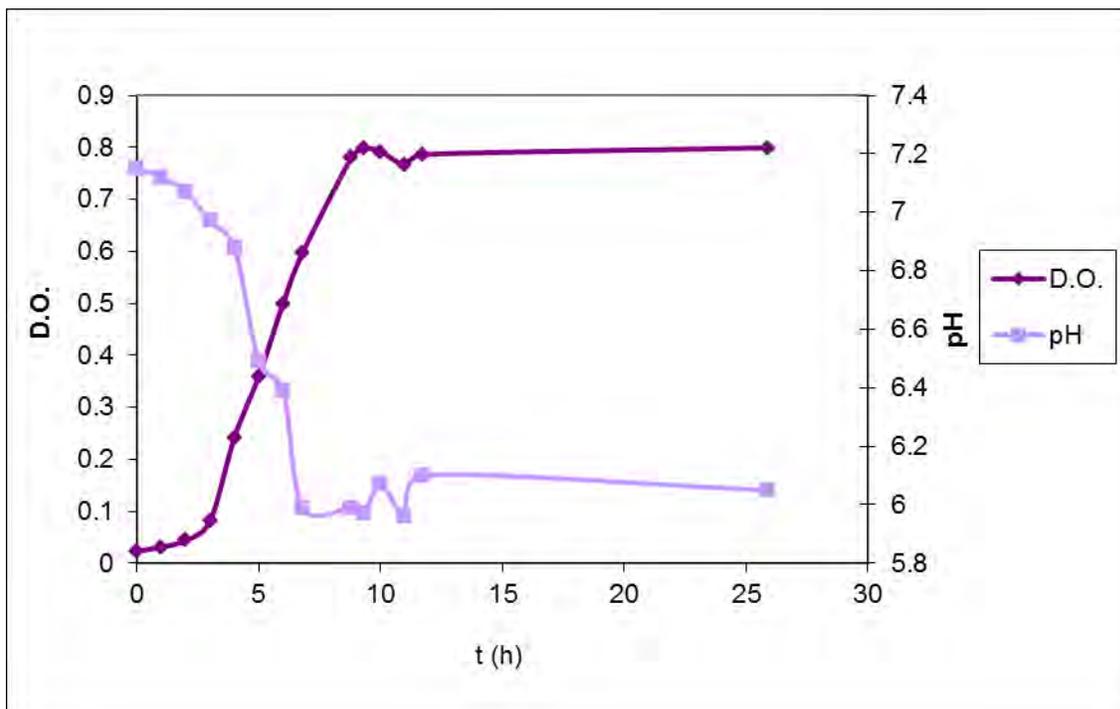


Figura 10.- Cinética de crecimiento de *S. mutans* (C) en el medio líquido BHI.

De acuerdo con la ecuación presente en la figura 12, el valor de la μ es 0.77 h^{-1} , valor menor al de la μ de *S. salivarius*.

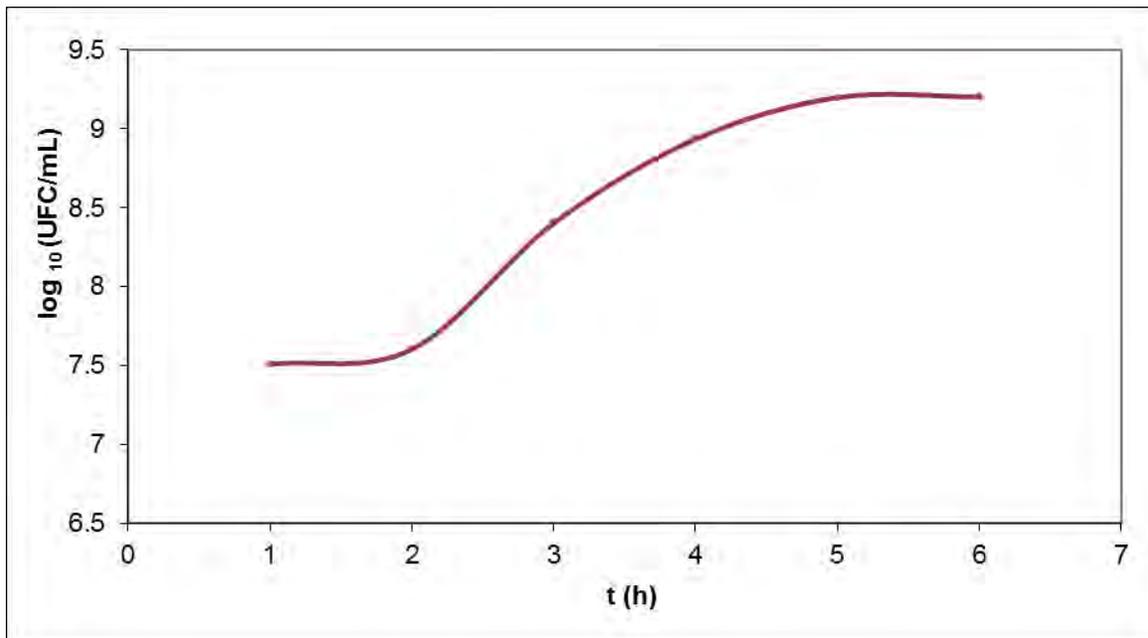


Figura 11.- Cinética de crecimiento de *S. mutans* (C), determinación de cuenta viable en el medio TSA.

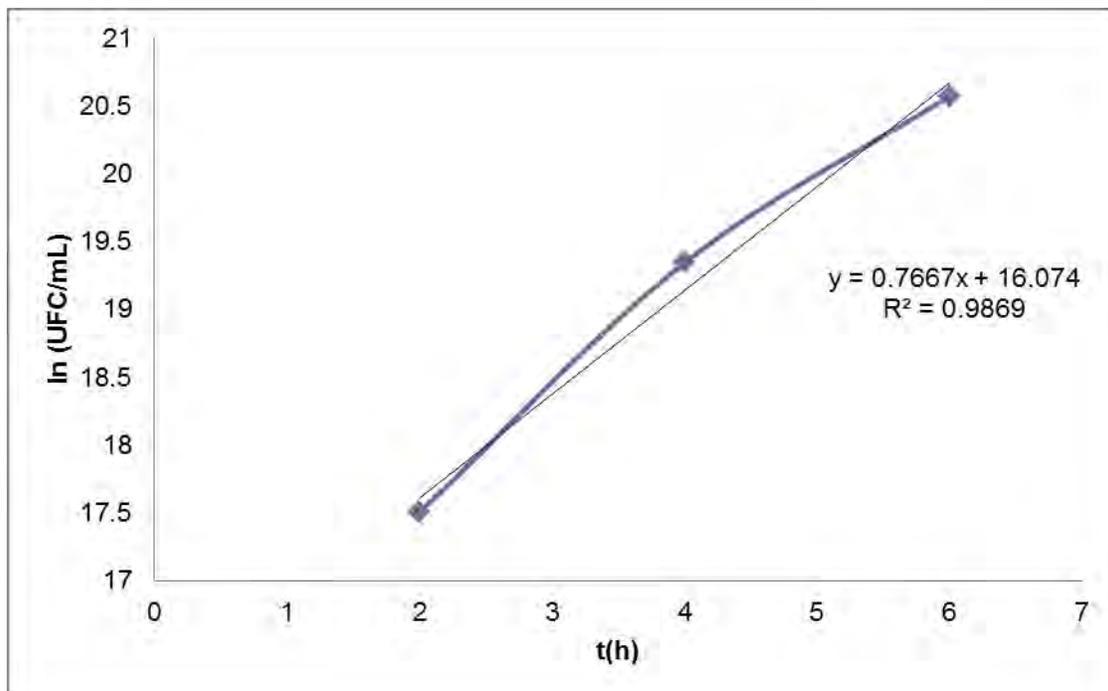


Figura 12.- Determinación de la μ (tasa de crecimiento) de *S. mutans* (C) a través del método gráfico.

6.1.3.3. *S. sanguinis*

Se consideró trabajar con la cepa de *S. sanguinis* en lugar de la de *S. mitis*, ya que hay una mayor relación entre la formación de caries y la presencia de la primera cepa en la cavidad oral, que con la segunda (Corby y cols., 2005; Okada y cols., 2005; van Houte; 1994). Se evaluó la cinética de crecimiento de *S. sanguinis* durante 24 horas. Los resultados se muestran en las figuras 13 y 14. Se puede observar que hay un aumento en la densidad óptica y una disminución del pH considerable alrededor de las 5 h, lo que nos indica que la cepa ha entrado en su fase exponencial de crecimiento. Estos resultados son congruentes con respecto al conteo de células viables. El valor del pH desciende hasta 4.75 a las 24h.

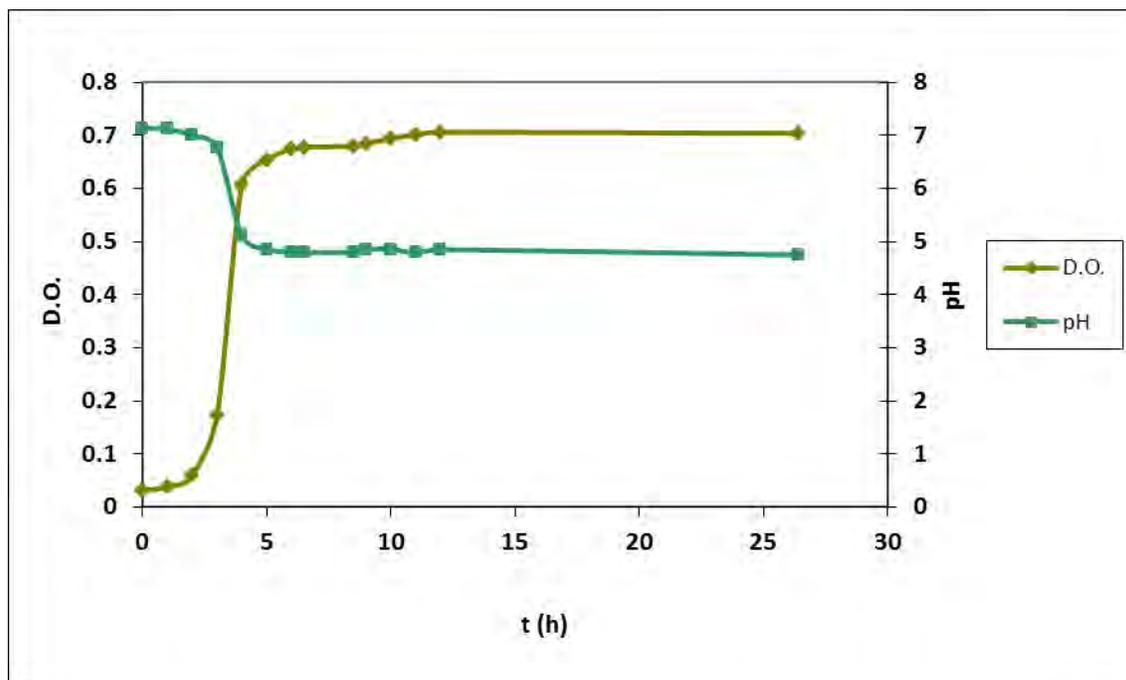


Figura 13.- Cinética de crecimiento de *S. sanguinis* en el medio líquido BHI.

De acuerdo con la ecuación $y = 0.7776x + 17.63$, presente en la figura 15, la μ para *S. sanguinis* es de 0.77 h^{-1} , valor menor al de *S. salivarius* e igual al de *S. mutans*.

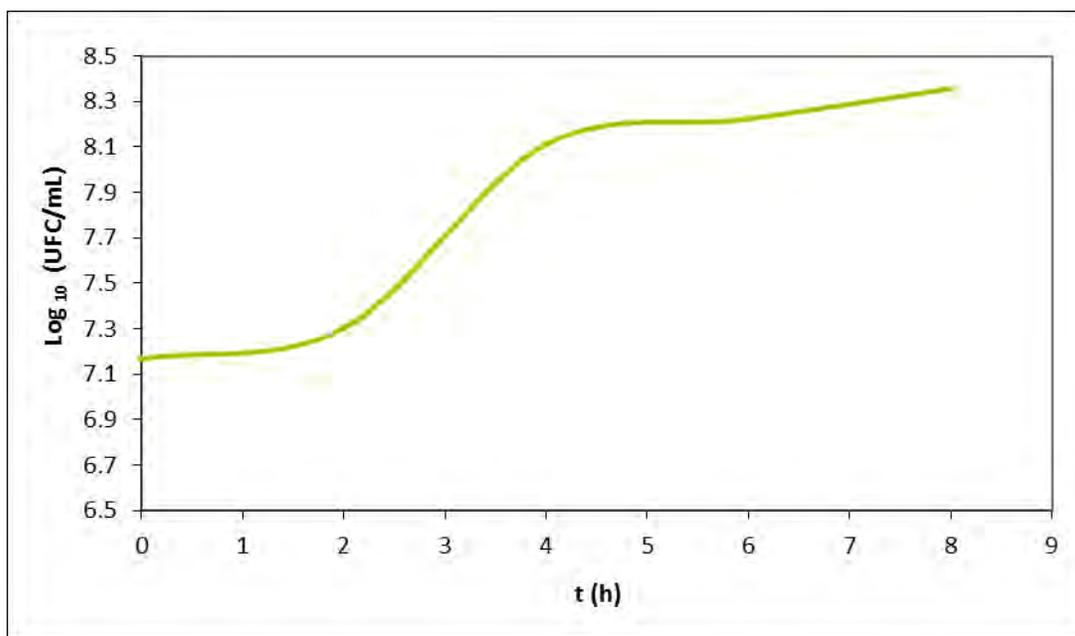


Figura 14.- Cinética de crecimiento de *S. sanguinis*, determinación de cuenta viable en TSA.

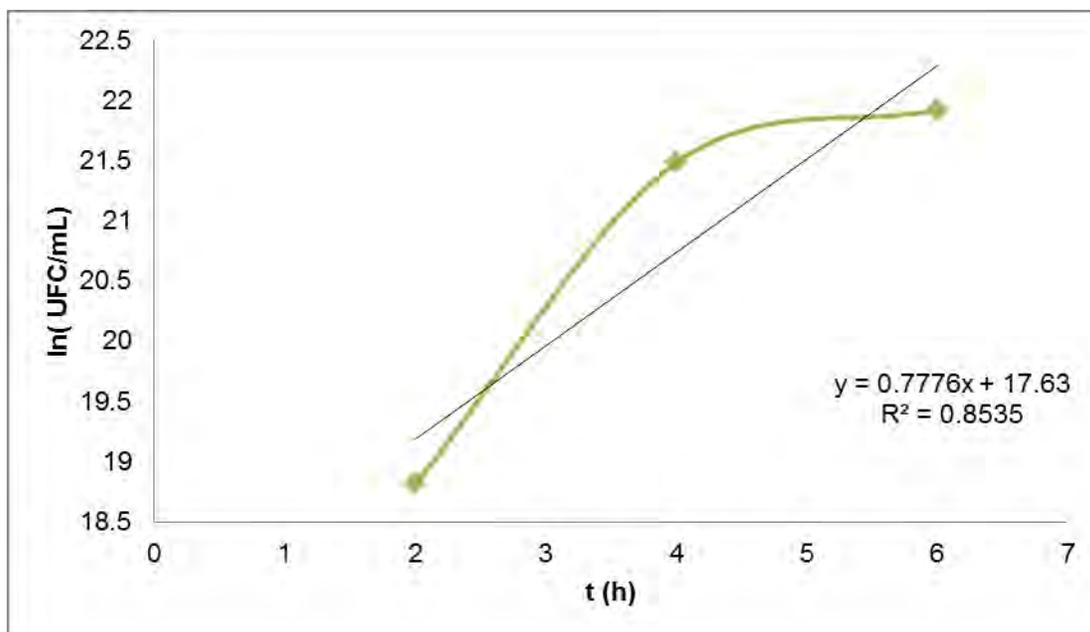


Figura 15.- Determinación de la μ (tasa de crecimiento) de *S. sanguinis* a través del método gráfico.

6.1.3.4. *S. oralis* (A)

Del mismo modo se consideró trabajar con la cepa de *S. oralis*, ya que hay relación entre la formación de caries y la presencia de la cepa en la cavidad oral (Kilian y cols., 1989; van Ruyven y cols., 2000). Se evaluó la cinética de crecimiento de *S. oralis* durante 24 horas. Los resultados se muestran en las figuras 16 y 17. Se pudo observar que hubo un aumento en la densidad óptica y una disminución considerable del pH que inicia desde las 4 h hasta las 6 h, lo que nos indica que la cepa ha entrado en su fase exponencial de crecimiento. El pH descendió hasta 5.3. Estos resultados son congruentes con respecto al conteo de células viables (figura 16).

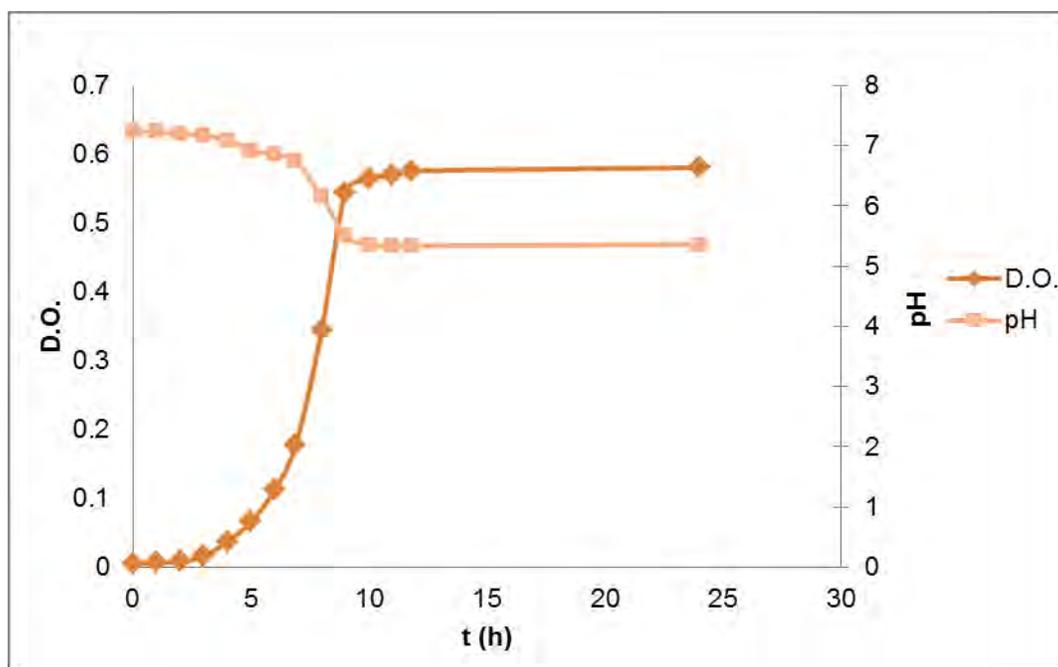


Figura 16.- Cinética de crecimiento de *S. oralis* en el medio líquido BHI.

De acuerdo con la ecuación presente figura 18, la μ para *S. oralis* es de 0.54 h^{-1} , valor menor al de *S. salivarius*, *S. sanguinis* y *S. mutans*.

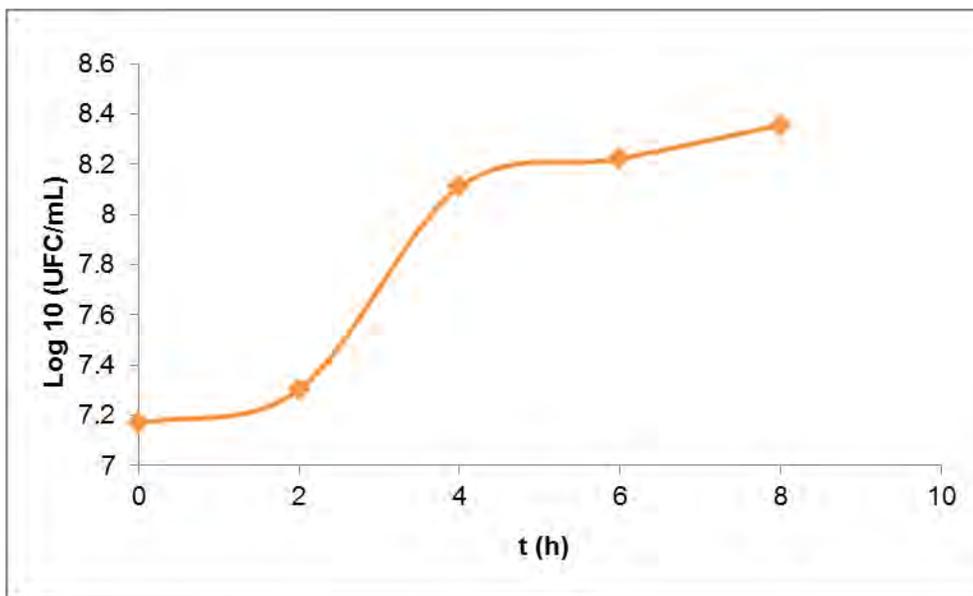


Figura 17.- Cinética de crecimiento de *S. oralis*, determinación de cuenta viable en TSA.

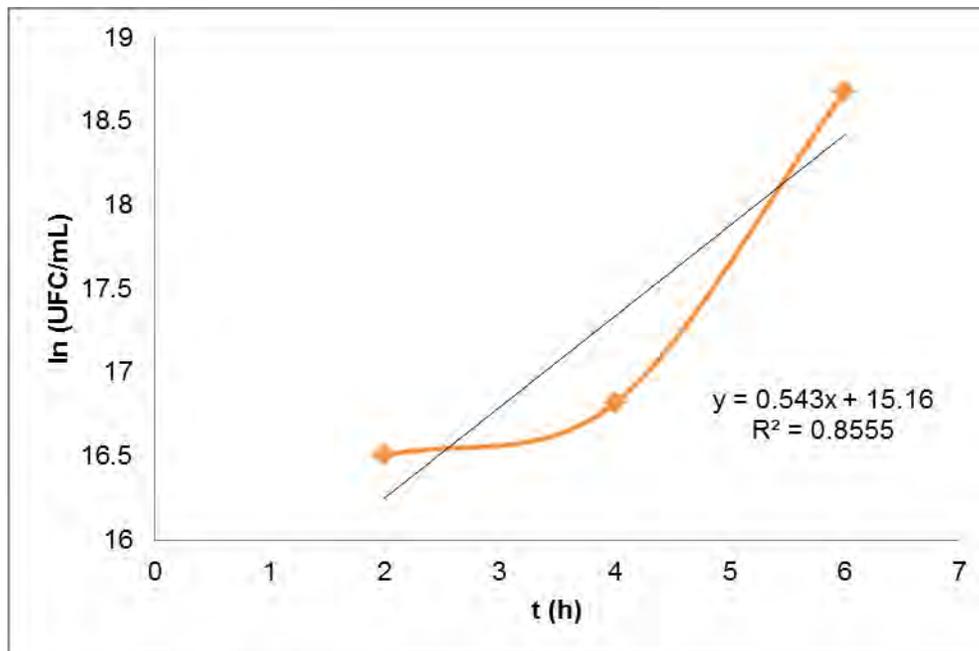


Figura 18.- Determinación de la μ (tasa de crecimiento) de *S. oralis* (A) a través del método gráfico.

6.1.4. Estandarización del inóculo mediante el conteo de células viables en el inóculo.

Para poder evaluar la actividad antimicrobiana de los compuestos, fue necesario conocer la concentración inicial del inóculo y que esta concentración fuese constante para todas cepas, de acuerdo con Darout y cols. (2002), Braisford y cols. (2001) y Li y cols. (2004); la concentración de *S. sanguinis*, *S. salivarius* en ausencia de caries es, en promedio, de 10^6 UFC/mL, mientras que la de *S. mutans* y *S. oralis* es menor, del orden de 10^3 . En presencia de caries los números se invierten para *S. mutans*, aumentando hasta un orden de 10^6 UFC/mL, *S. oralis* aumenta hasta 10^4 UFC/mL, mientras que *S. sanguinis* y *S. salivarius* disminuyen hasta $10^3 - 10^4$ UFC/mL. Por esa razón fue necesario realizar este ensayo, tomando el inóculo después de las 4 h, ya que en ese momento las cepas evaluadas están en la fase de crecimiento acelerado.

- *S. salivarius*

Se encontró que para esta cepa la densidad óptica de 0.009 está relacionada con la concentración del inóculo (UFC/mL) esperada (del orden 10^6). Los resultados se muestran en la tabla 9.

- *S. sanguinis*

Se encontró que para esta cepa la densidad óptica de 0.006 está relacionada con la concentración del inóculo (UFC/mL) esperada (del orden 10^6). Los resultados se muestran en la tabla 9.

- *S. mutans* (C).

Como podemos ver en la tabla 9, la densidad óptica se mantuvo en 0.006, aun cuando no se alcanzó la concentración propuesta (del orden 10^6), siendo más complejo trabajar a valores menores.

- *S. oralis*

Se encontró que para esta cepa la densidad óptica de 0.007 está relacionada con la concentración del inóculo (UFC/mL) esperada (del orden 10^6). Los resultados se muestran en la tabla 9.

Tabla 9 - Conteo de células viables de la cepas *S. salivarius*, *S. sanguinis* y *S. mutans* en el medio BHI

	<i>S. salivarius</i>			<i>S. sanguinis</i>			<i>S. mutans</i>	
	Primer Ensayo	Segundo Ensayo	Tercer Ensayo	Primer Ensayo	Segundo Ensayo	Tercer Ensayo	Primer Ensayo	Segundo Ensayo
Densidad óptica esperada a las 4 h		0.036			0.608			0.242
Densidad óptica a las 4h	0.243	0.63	0.586	0.319	0.606	0.042	0.073	0.181
Dilución teórica necesaria para ajustar la cuenta viable al orden de 10 ⁶ UFC/mL	-	1:40	1:40	-	1:20	1:8	1:6	1:20
Densidad óptica de la muestra después de realizar la dilución	-	0.019	0.009	-	0.034	0.006	0.016	0.009
Concentración celular (UFC/mL)	3.15 x 10 ⁸	3.08 x 10 ⁷	3.55 x 10 ⁶	5 x 10 ⁸	1.5 x 10 ⁸	1.50 x 10 ⁶	2.01 x 10 ⁷	1.01 x 10 ⁷

*(-) significa que no se diluyo la muestra.

6.1.5. Metodologías para incrementar la solubilidad de la α -amirina.

Por su naturaleza, la α -amirina es un compuesto poco soluble en agua (Merck, 2001), para efectuar los ensayos de actividad antimicrobiana es necesario que los compuestos a evaluar se solubilizan en el medio de cultivo. En primera instancia, se trató de solubilizar la α -amirina en DMSO (dimetilsulfóxido) con resultados negativos, por lo que se decidió evaluar diferentes metodologías, encapsulamiento en β -ciclodextrina, emulsificación con tween ® 80, formación de liposomas con lecitina de soya y formación de liposomas con fosfatidilcolina, para favorecer su solubilidad en el medio de cultivo.

Para poder determinar con que modificación en la solubilidad de los compuestos era conveniente trabajar se realizó un ensayo evaluando el efecto de α -amirina sobre *S. mutans*. Las concentraciones evaluadas para determinar la utilidad de la metodología, fueron la más alta permitida por el método (β -ciclodextrina), la concentración estandarizada para el método (formación de liposomas con lecitina de soya) o una concentración ensayo (emulsificación con tween ® 80, formación de liposomas con lecitina de soya y formación de liposomas con fosfatidilcolina), todas dentro del rango de 10 $\mu\text{g/mL}$ – 1000 $\mu\text{g/mL}$, que de acuerdo a Ríos y Recio (2005) son las concentraciones ideales para un compuesto con actividad bactericida. Los criterios para seleccionar con que metodología era conveniente trabajar se muestran en la tabla 10.

De acuerdo a la prueba de ANOVA (Anexo F), no existe diferencia significativa sobre la metodología usada para mejorar la solubilidad del compuesto y el efecto de la α -amirina con un $\alpha = 5\%$, es decir, el efecto de la α -amirina no se ve disminuido o aumentado en función de la metodología usada para mejorar la solubilidad de la α -amirina.

Tabla 10. - Efecto del compuesto α -aminina sobre la sobrevivencia de *S. mutans* (UFC/ml) en el medio BHI, tratado por distintas metodologías para mejorar la solubilidad.

Tiempo(h)	Control positivo	Control negativo	β -ciclodextrina (0.1 mg/mL) ¹	Tween® 80 (0.25 mg/mL)	Liposomas Lecitina (0.85 mg/mL) ²	Liposoma Fosfatidicolina (0.2 mg/mL) ¹
24	> 25	1.12×10^9	9.4×10^8	1.06×10^9	1.12×10^9	1.07×10^9
	>25	8.9×10^8	1.02×10^9	1.5×10^9	7.5×10^8	8.7×10^8

Control positivo: medio de cultivo con solución de digluconato de clorhexidina al 20%. Control positivo: medio de cultivo sin modificación. ¹Máxima concentración permitida por el método. ²Concentración estandarizada para el método.

Tabla 11 - Criterios de selección de la metodología para mejorar la solubilidad de los compuestos triterpenoides evaluados en el presente trabajo.

Metodología	Costo de 100 mg/100 mL del reactivo	Costo real (por 4.5 mL de medio con compuesto)	Tiempo de preparación	Observaciones realizadas durante los ensayos
β -ciclodextrina	\$ 8.82 x 100 mg	\$ 82.71	> 24 h	<ul style="list-style-type: none"> Bajo rendimiento de encapsulación \approx 40% Baja posibilidad de evaluar distintas concentraciones de compuesto Porcentaje de encapsulación del compuesto desconocida
Tween® 80	\$ 113.68 x 100 mL	\$ 3.07	\approx 4 h	<ul style="list-style-type: none"> Amplia posibilidad de evaluar distintas concentraciones de compuesto. Bajo control sobre el tamaño de las micelas formadas.
Liposomas Lecitina	\$ 0.43 x 100 mg	\$ 0.93	\approx 2 h	<ul style="list-style-type: none"> Baja posibilidad de evaluar distintas concentraciones de compuesto Porcentaje de formación de liposomas desconocido
Liposomas Fosfatidilcolina	\$ 120.00 x 100 mg	\$ 7.25	> 24 h	<ul style="list-style-type: none"> Baja posibilidad de evaluar distintas concentraciones de compuesto. Metodología compleja Porcentaje de formación de liposomas desconocido

Al no haber un efecto de la metodología sobre la concentración bacteriana, se tomaron en cuenta otros criterios para poder seleccionar con cuál de las metodologías era conveniente trabajar (tabla 11).

En la tabla 11 se pueden ver los criterios usados para seleccionar la metodología más conveniente para evaluar los distintos compuestos triterpenoides. La encapsulación resultó ser la metodología más cara para evaluarlos, por tener un bajo rendimiento, además de que es necesario realizar un método cuantitativo para conocer el porcentaje de compuesto encapsulado, lo que logísticamente la hace más compleja.

En cuestión de tiempo y costo la formación de liposomas usando lecitina de soya es la mejor metodología, sin embargo el costo es relativo, ya que la cantidad de lecitina usada aumenta conforme se aumenta la cantidad de compuesto a evaluar. Esta característica hace no solo que los costos aumenten al evaluar concentraciones de compuesto mayores, sino que también implica aumentar la concentración del emulsificante (lecitina de soya), lo que metodológicamente no es apropiado en la formación de emulsiones.

De todas las metodologías, la más compleja fue la formación de liposomas usando fosfatidilcolina, además, la concentración de compuesto que se puede evaluar es baja y su costo aumenta considerablemente conforme aumenta la concentración del compuesto.

La formación de emulsiones usando tween ® 80 como emulsificante, fue la metodología más conveniente para trabajar, pues los compuestos se preparan en un tiempo relativamente corto y el costo es bajo, además permite evaluar una amplia gama de concentraciones. Sin embargo, el control en el tamaño de las micelas formadas es una desventaja, que más adelante en la discusión de la evaluación de compuestos se mencionará.

6.1.6. Determinación del efecto de los distintos compuestos triterpenoides sobre *S. mutans*, *S. salivarius*, *S. sanguinis* y *S. oralis* con una concentración de 10^6 UFC/mL.

Para poder evaluar los distintos compuestos triterpenoides se siguió la metodología previamente descrita, tanto para la preparación del medio con el compuesto a evaluar como para estandarizar la concentración de bacterias en el inóculo a 10^6 UFC/mL. El objetivo de evaluar esta concentración de bacterias es, primero, determinar el efecto que existe sobre las cepas *S. salivarius* y *S. sanguinis*, que en estas concentraciones están relacionadas con la ausencia de caries, y segundo, que se ha encontrado relación entre una concentración de 10^6 UFC/mL de *S. mutans* y *S. oralis* y la presencia de caries (Okada y cols., 2005; van Houte; 1994).

A continuación se presentan los resultados obtenidos en las pruebas (figuras 19, 20, 21, 22 y 23). Los resultados completos para el efecto de los compuestos α -amirina, β -amirina, fenilacetato de α -amirina y ácido betulínico sobre una cuenta de 10^6 UFC/mL se muestran en el anexo E.

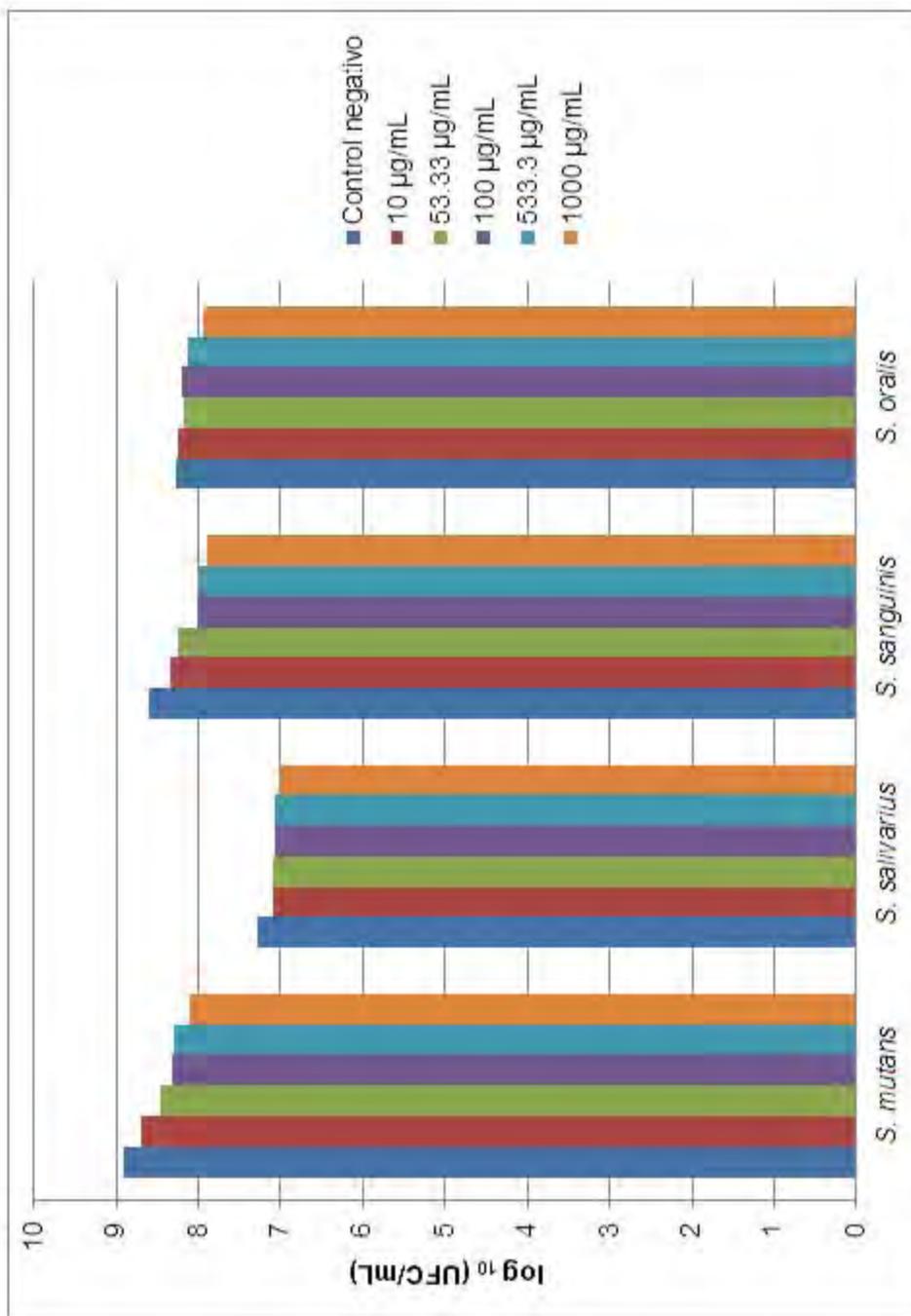


Figura 19.- Efecto de la α -amirina sobre la sobrevivencia de las distintas cepas de *Streptococcus* spp.

En la figura 19 se puede observar el efecto de la α -amirina sobre las distintas cepas de *Streptococcus* spp., para las cepas *S. mutans*, *S. sanguinis* y *S. oralis* el efecto del compuesto sobre la concentración de estas cepas aumenta conforme aumenta la concentración de la α -amirina, tendencia que no se observa en *S. salivarius*, ya que *S. salivarius* tendía a formar agregados al ser inoculado al medio. Weerkamp y McBride (1980) reportaron que existen cepas de *S. salivarius* que pueden formar agregados célula con célula en tiempos inferiores a un minuto.

En la figura 20 se puede observar el efecto de la β -amirina sobre las distintas cepas de *Streptococcus* spp. A diferencia del compuesto anterior la tendencia es la misma para todos los compuestos, es decir el efecto se ve incrementado conforme aumenta la concentración del compuesto. Sin embargo, para la cepa *S. sanguinis* no se ve un gran efecto de la β -amirina sobre la concentración de la cepa.

En la figura 21 se puede observar el efecto del fenilacetato de α -amirina sobre las cepas de *Streptococcus* spp. Este compuesto es el que presenta un mayor efecto sobre las cepas, reduciendo hasta un ciclo logarítmico la concentración de las cepas *S. mutans* y *S. salivarius* con respecto al control negativo y hasta dos ciclos logarítmicos a la cepa *S. oralis* con respecto al control negativo.

De acuerdo con el análisis estadístico (anexo F) para estos tres compuestos, α -amirina, β -amirina y fenilacetato de α -amirina no existe diferencia significativa entre las concentraciones 100 $\mu\text{g/mL}$, 533.33 $\mu\text{g/mL}$ y 1000 $\mu\text{g/mL}$ con un $\alpha= 5\%$, además el efecto de los compuestos sobre *S. mutans* es mayor que el efecto sobre las otras cepas (*S. salivarius*, *S. sanguinis* y *S. oralis*), y sobre estas cepas el efecto de los compuestos es similar estadísticamente ($\alpha= 5\%$).

Finalmente el efecto generado por el fenilacetato de α -amirina es significativamente ($\alpha= 5\%$) mayor con respecto a la α - y β - amirina, los cuales presentan un efecto similar estadísticamente sobre las cepas de *Streptococcus* spp. (anexo F).

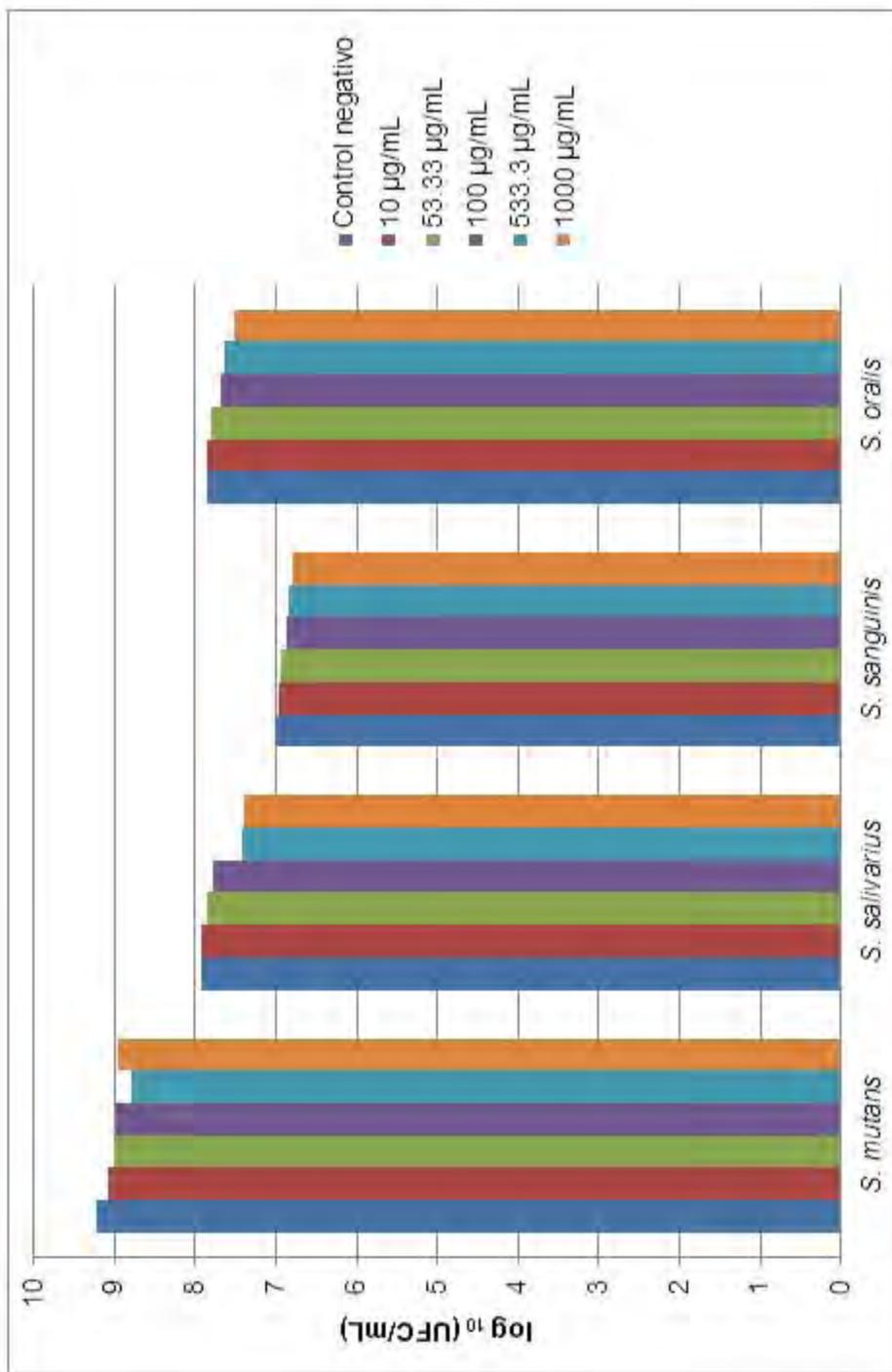


Figura 20. - Efecto de la β -aminina sobre la sobrevivencia de las distintas cepas de *Streptococcus* spp.

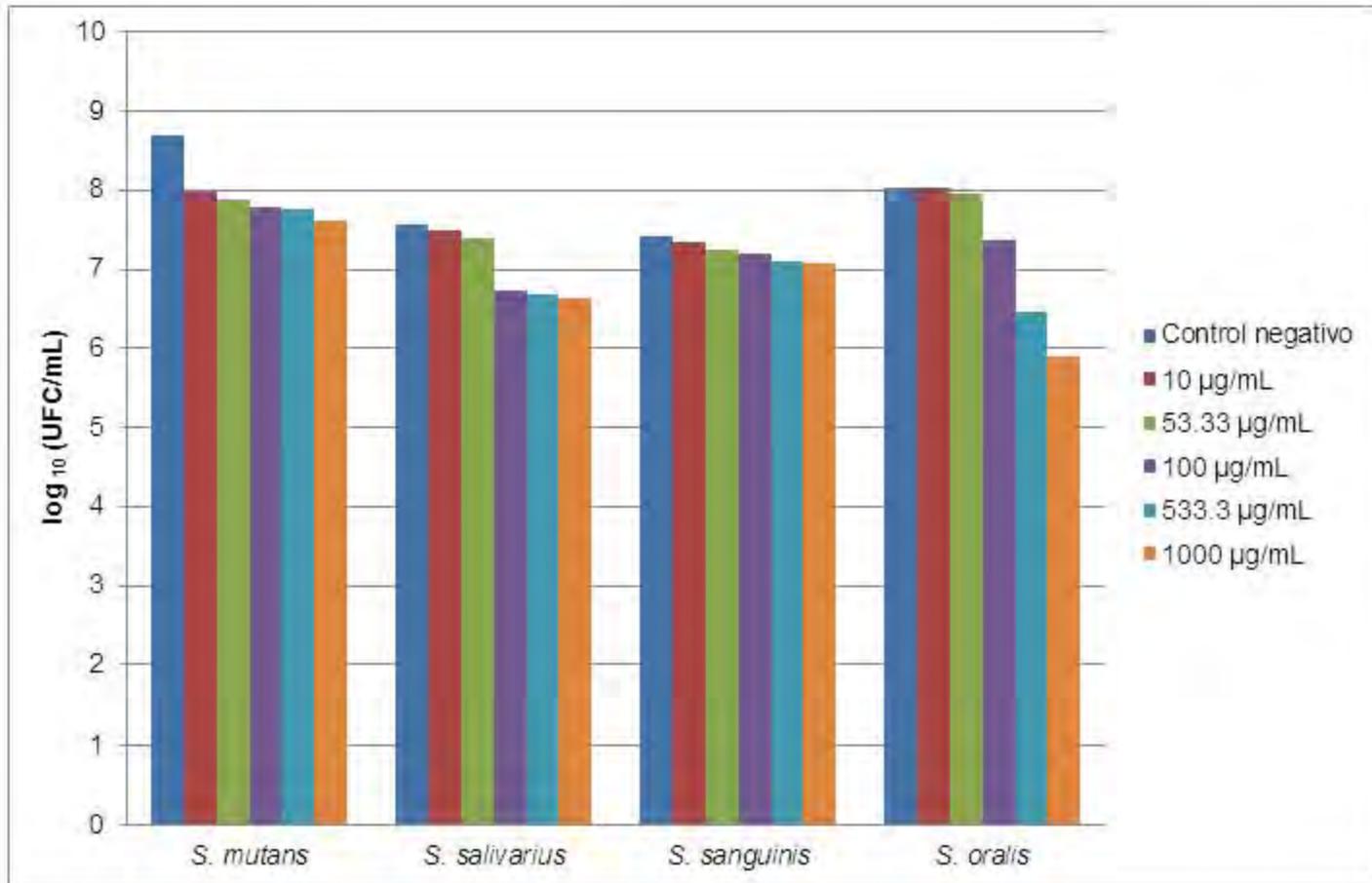


Figura 21.- Efecto del fenilacetato de α -amirina sobre la sobrevivencia de las distintas cepas de *Streptococcus* spp.

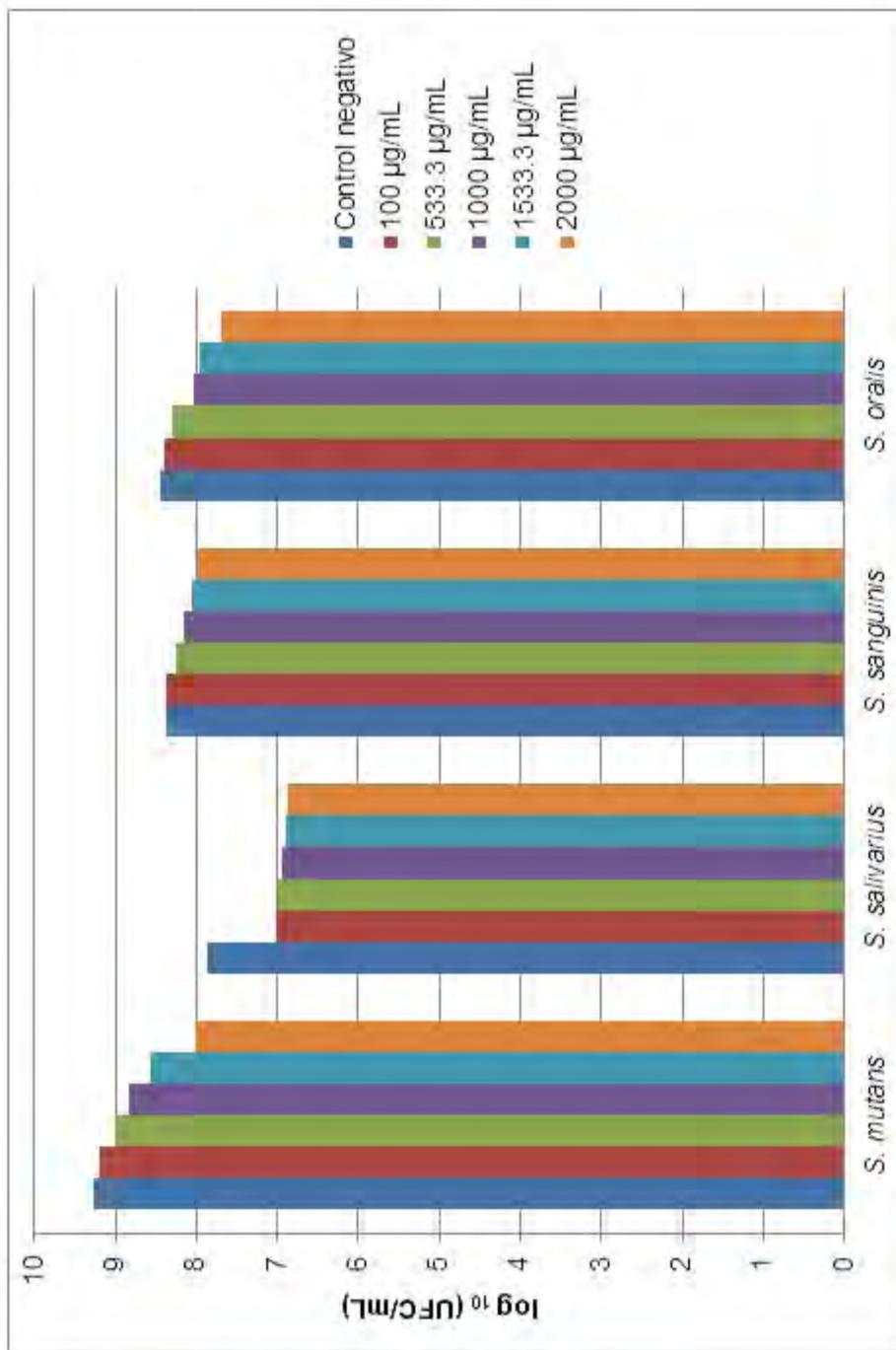


Figura 22.- Efecto del ácido betulínico sobre la sobrevivencia de las distintas cepas de *Streptococcus* spp.

En la figura 22 se puede observar el efecto del ácido betulínico sobre las cepas de *Streptococcus* spp. Aunque se evaluaron concentraciones mayores que las evaluadas en los compuestos anteriores, se puede observar que no existe un efecto bactericida sobre las cepas de *Streptococcus* spp. Sin embargo, si se puede observar una tendencia a disminuir la concentración de las cepas conforme aumenta la concentración de compuesto evaluado. Esto nos habla de un posible efecto bacteriostático del ácido betulínico sobre las cepas de *Streptococcus* spp.

De acuerdo al análisis estadístico (anexo F), la concentración de 2000 µg/mL si presenta diferencias significativas con respecto a las demás concentraciones, lo que nos indica que posiblemente exista un efecto bactericida sobre las cepas de *Streptococcus* spp. a mayores concentraciones. Pero, de acuerdo a Ríos y Recio (2005), se deben evitar compuestos cuyas concentraciones sean mayores a 1 mg/mL para extractos herbales y 0.1 mg/mL para compuestos puros, mientras que los compuestos que tengan una MIC de 10 µg/mL a 100 µg/mL son compuestos muy prometedores. Lo que indica que evaluar concentraciones mayores no es lo adecuado.

Por otro lado, estadísticamente ($\alpha= 5\%$) se ve un mayor efecto sobre las cepas *S. mutans* y *S. salivarius*, en comparación con *S. sanguinis* y *S. oralis*, donde si bien se observa una tendencia a disminuir la concentración de la cuenta viable, no es un efecto tan marcado como para *S. mutans* y *S. salivarius*, teniendo un mayor efecto sobre *S. mutans*.

Se decidió evaluar estos dos últimos compuestos, octanoato de α -amirina y el palmitato de α -amirina, solo sobre *S. mutans* debido a que la cantidad de compuesto con la que se disponía era baja.

Al igual que con los demás compuestos, se puede observar una tendencia: al aumentar la concentración de compuesto disminuye la cuenta viable, aunque de acuerdo al análisis estadístico (anexo F), no existe diferencia significativa ($\alpha= 5\%$) entre las dos concentraciones más altas evaluadas (553.33 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$), pero si entre 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (figura 23).

Por otro lado, el compuesto que estadísticamente ($\alpha= 5\%$) presento un mayor efecto sobre *S. mutans* fue el fenilacetato de α -amirina, seguido por la α -amirina y finalmente por la β -amirina, el octanoato de α -amirina y el palmitato de α -amirina, entre los cuales no existe diferencia estadísticamente significativa.

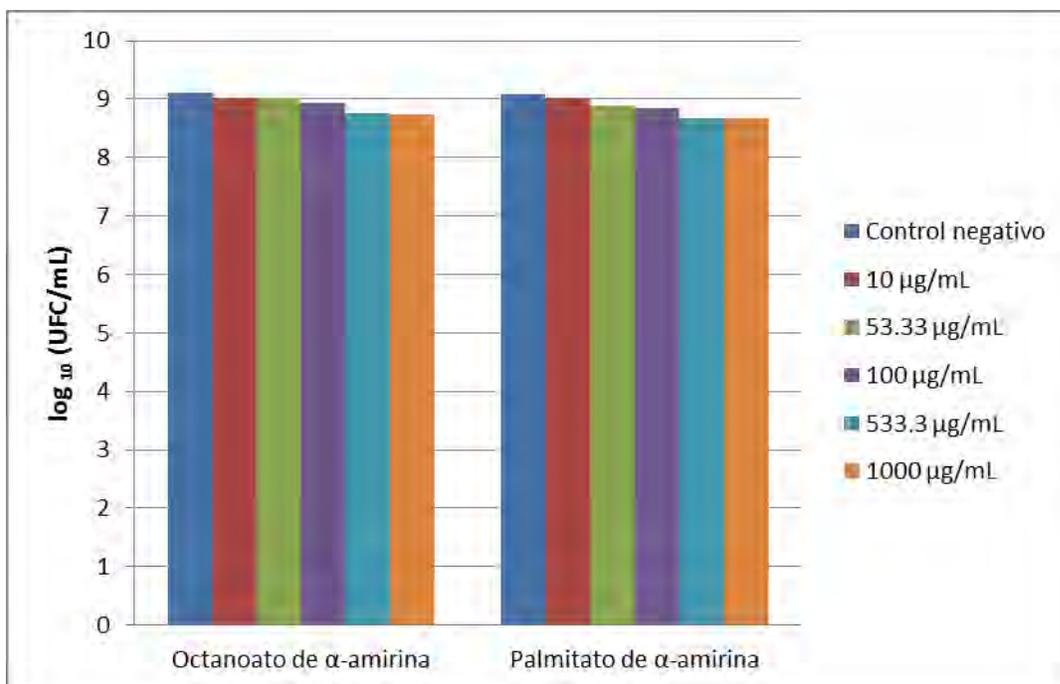


Figura 23.- Efecto del octanoato de α -amirina y el palmitato de α -amirina sobre la sobrevivencia de *S. mutans*.

Las gráficas están acomodadas de acuerdo al orden de evaluación de los compuestos. Como se puede ver, las concentraciones a las que se evaluó el ácido betulínico son diferentes a las de los demás compuestos. Al no verse un efecto bactericida generado por los demás compuestos, se evaluaron concentraciones mayores a las de 1 mg/mL.

6.1.7. Determinación del efecto del fenilacetato de α -amirina y del ácido betulínico sobre *S. mutans* con una concentración de 10^3 UFC/mL.

Se evaluaron los 2 compuestos que presentaron un mayor efecto sobre *S. mutans*, debido a que, como se ha mencionado anteriormente, *S. mutans* es el agente etiológico en la formación de caries más importante.

El efecto de los 2 compuestos sobre la cepa de *S. mutans* genera una reducción en la cuenta viable de la cepa, para el caso del fenilacetato de α -amirina la reducción es casi de un ciclo logarítmico, mientras que el efecto del ácido betulínico es mayor, puesto que logra la reducción de la cuenta prácticamente hasta 3 ciclos logarítmicos.

De acuerdo con el análisis estadístico (anexo F), existe diferencia estadísticamente significativa ($\alpha= 5\%$) entre el efecto del ácido betulínico, que es mayor, y del fenilacetato de α -amirina, mientras que la concentración de 53.33 $\mu\text{g/mL}$ no causa un efecto significativamente distinto con respecto a las concentraciones de 100 $\mu\text{g/mL}$ y 533.33 $\mu\text{g/mL}$, pero si con respecto a 1000 $\mu\text{g/mL}$ (figura 24) .

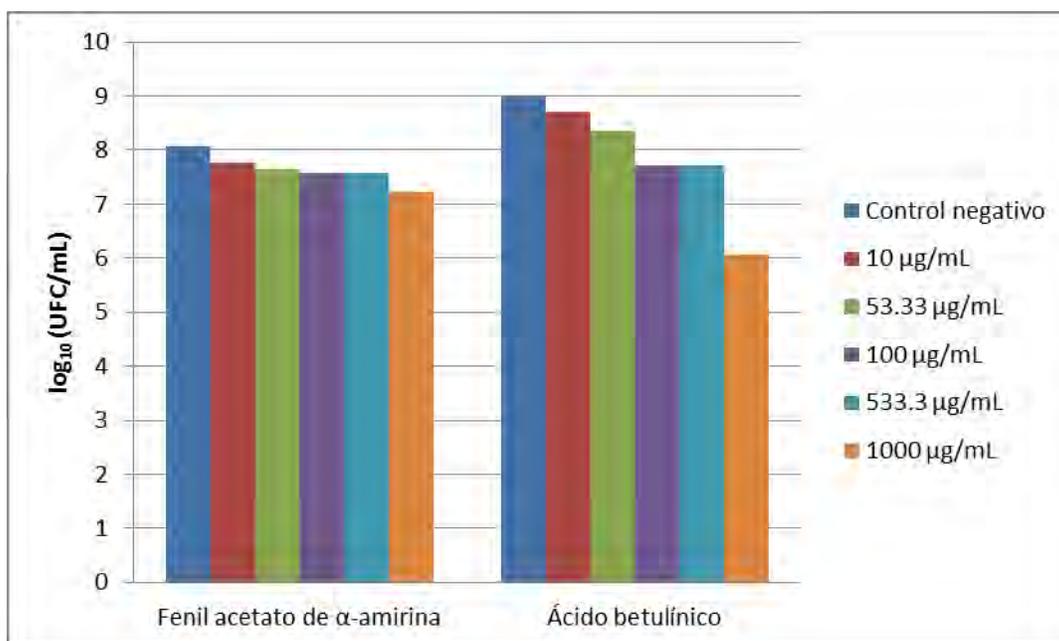


Figura 24.- Efecto del fenilacetato de α-amirina y el ácido betulínico sobre la sobrevivencia de *S. mutans*.

6.2. Discusión

Uno de los causas de la presencia de triterpenoides pentacíclicos en las plantas es el de fungir como molúscidas, agentes tóxicos para los caracoles (Marston y Hoestettman, 1984). Se ha reportado que tienen propiedades como antiinflamatorio en ratas con periodontitis aguda (Holanda y cols., 2008), antiparasitarios, fungicidas (Johann y cols., 2007) y como antimicrobianos contra *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* y *Trycophyton mentagrophytes* (Villaseñor y cols., 2004), *Bacillus subtilis* (Djoukeng y cols., 2005; Chandramu y cols., 2003), *Bacillus megaterium* (Kuigoua y cols., 2010) y contra de *E. coli* (Jain y cols., 2003; Djoukeng y cols., 2005; Kuigoua y cols., 2010).

De acuerdo a los resultados de la sección 6.1.3. la cinética de las cepas de *Streptococcus* spp. es muy similar, ya que el inicio la fase de crecimiento exponencial se encuentra entre las 4 y las 6 horas, esta característica permitió evaluar a las 4 cepas al mismo tiempo.

Los valores de μ para las cepas son 0.77 h^{-1} para *S. mutans*, 0.54 h^{-1} para *S. oralis*, 0.77 h^{-1} para *S. sanguinis* y 1.59 h^{-1} para *S. salivarius*. Los valores determinados para *S. mutans*, *S. sanguinis* y *S. oralis* son similares a los reportados por Poolman y Konings (1988) para las cepas *S. cremoris* y *S. lactis* en medio MRS, inferiores al reportado por Díaz-Ruíz y cols. (2003) 0.94 h^{-1} para *S. bovis* en medio MRS-almidón y también al reportado por van der Hoeven y cols. (1984) para *S. mutans* (1.12 h^{-1}) en saliva suplementada con glucosa (10 mM). van der Hoeven y cols. (1984) encontraron que el valor de la velocidad de crecimiento de las cepas orales esta relacionado con la especie que predomina en la saliva, encontrando una mayor velocidad para *S. mutans* ($\mu=1.12 \text{ h}^{-1}$) sobre *Actinomyces viscosus* ($\mu=0.49 \text{ h}^{-1}$) en cultivo mixto. También encontraron que en medios enriquecidos con glucosa el crecimiento de las cepas de *Streptococcus* spp. se ve favorecido.

Para evaluar el efecto como antimicrobiano de estos compuestos sobre la placa dental, es necesario tener a estos triterpenoides pentacíclicos en un medio acuoso, sin embargo, al ser de naturaleza no polar su solubilidad en agua es baja. Debido a lo anterior, se probaron distintas técnicas para mejorar la solubilidad de estos compuestos en agua, no encontrando diferencia significativa entre las cuatro metodologías ($\alpha = 0.05$), sin embargo se consideraron otros aspectos para poder determinar que metodología era la más conveniente; la metodología seleccionada fue la formación de una emulsión usando tween ® 80 (tabla 11).

Las cepas estudiadas no fueron inhibidas por la concentración (3.6 μ L de tween ® 80/ mL de medio) del surfactante empleada (tween ® 80). Se ha reportado que no hay efecto generado por el tween ® en la evaluación de otros compuestos antimicrobianos (Pappen y cols., 2010; Zhang y cols., 2010; Chuma y cols., 2009). Además el uso del tween ® 80 permitió evaluar un rango amplio de concentraciones.

Las concentraciones en la placa dental de las distintas cepas de *Streptococcus* spp. varían de acuerdo con el estado de salud del individuo (Braisford y cols., 2001; Li y cols., 2004). En ausencia de caries la concentración de *S. sanguinis* y *S. salivarius* es del orden de 10^5 a 10^6 UFC/mL, mientras que *S. oralis* se encuentra en proporciones de 10^3 - 10^4 UFC/mL y *S. mutans* se encuentra en el orden de 10^2 - 10^3 UFC/mL. En presencia de caries los números se invierten, *S. sanguinis* y *S. salivarius* bajan hasta el orden de 10^3 UFC/mL, mientras que la concentración de *S. mutans* se incrementa pudiendo llegar hasta 10^6 UFC/mL (Darout y cols., 2002).

Por lo anterior, se decidió evaluar el efecto de los compuestos triterpenoides en dos distintas concentraciones bacterianas. Primero, se evaluó el efecto que los compuestos triterpenoides tenían sobre una cuenta de 10^6 UFC/mL en las bacterias orales (*S. sanguinis*, *S. mutans*, *S. salivarius* y *S. oralis*). Posteriormente se evaluó el efecto que los compuestos triterpenoides, con un mayor efecto sobre una concentración de bacterias orales alta, sobre una cuenta de 10^3 en *S. mutans*.

Los resultados de la sección 6.1.3. indican que el tiempo ideal para evaluar los compuestos antimicrobianos es antes de las 6 horas de iniciado el crecimiento, ya que las cepas no han entrado en la fase estacionaria, donde no solo se vería el efecto provocado por los compuestos a evaluar, sino también la muerte celular bacteriana propia de la fase. Además, teóricamente la concentración de la cepa a las 4 horas se encuentra en el orden de 10^6 UFC/mL. De acuerdo con Klančnik y cols. (2010), para evaluar antibióticos por el método de dilución en agar la CLSI (Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio) ha establecido una concentración bacteriana de 10^5 - 10^6 UFC/mL.

De acuerdo con Ríos y Recio (2005), se deben evitar compuestos cuyas concentraciones sean mayores a 1 mg/mL para extractos herbales y 0.1 mg/mL para compuestos puros, mientras que los compuestos que tengan una MIC (concentración mínima inhibitoria) de 10 μ g/mL a 100 μ g/mL son compuestos muy prometedores. Sin embargo podemos ver que ninguno de los compuestos alcanza a tener un efecto bactericida en este intervalo de concentración, sino más bien bacteriostático, ya que ninguno de los compuestos inhibió completamente a la cepa.

En general, todos los compuestos muestran esta actividad, el mayor efecto lo presentan el fenilacetato de α -amirina, como se mencionó anteriormente, y el ácido betulínico, cuando el experimento se realizó en presencia de una concentración bacteriana de 10^6 UFC/mL sobre todas las bacterias, afectando mayormente a *S. mutans*, y el ácido betulínico en una concentración de 10^3 UFC/mL sobre *S. mutans*. En el primer caso, el fenilacetato de α -amirina generó una reducción hasta de un ciclo logarítmico sobre las cepas *S. mutans* y *S. oralis*, esto puede ser benéfico, ya que por otro lado la concentración de *S. sanguinis* no se ve afectada del mismo modo, y como se mencionó anteriormente, existe una estrecha relación entre la concentración de *S. mutans*, *S. sanguinis* y la presencia de caries en la cavidad oral (Okada y cols., 2005; van Houte, 1994). Por tanto, si el compuesto fenilacetato de α -amirina afecta en mayor proporción a *S. mutans* que

a *S. sanguinis*, se tiene un compuesto que no logra inhibir a *S. mutans*, pero si logra impedir su crecimiento, sin afectar el de *S. sanguinis*, manteniendo un equilibrio entre la microbiota bacteriana deseable y la no deseable.

Por otra parte, el efecto producido por el fenilacetato de α -amirina sobre *S. oralis* también es favorable, ya que al pertenecer al grupo de "pH bajo" no-MS (van Houte, 1994), su presencia en una alta concentración en la placa ($>10^3$) incrementa la producción de ácido láctico, bajando el pH de la cavidad oral, favoreciendo el crecimiento de *S. mutans*.

Sin embargo, *S. salivarius* también se ve afectado por el fenilacetato de α -amirina, y aunque de acuerdo a Becker y cols. (2002), esta bacteria no está definida aún como un agente etiológico de la caries, se ha visto que es una especie urolítica (Bowden y cols., 1979), lo que puede regular la acidificación glucolítica de la placa dental (Kleinberg, 1967). Pero, como se mencionó anteriormente, el efecto producido sobre *S. salivarius* es menor que el que se generó sobre *S. mutans*.

Al evaluar distintos compuestos pentacíclicos triterpenoides, se puede determinar una relación entre los sustituyentes y la naturaleza hidrofílica de estos, para predecir, de acuerdo a su estructura molecular, que compuesto tendría una mayor actividad antimicrobiana, ya que de acuerdo a lo propuesto por Urzua y cols. (2008), los compuestos con sustituyentes que puedan tener interacciones hidrofílicas tienden a tener una menor actividad antimicrobiana que aquellos compuestos con sustituyentes que tiendan a establecer interacciones hidrofóbicas. Esta tendencia no se observa en los compuestos evaluados ya que el efecto del palmitato de α -amirina es menor al del octanoato de α -amirina, que a su vez es menor al de β -amirina, mientras que el efecto de β -amirina es menor al de la α -amirina y finalmente el efecto del fenilacetato de α -amirina es mayor que el de la α -amirina, todos estos compuestos evaluados sobre *S. mutans*. Se puede observar que los compuestos con los sustituyentes menos polares son los que tienen un menor efecto (palmitato (C-16), octanoato (C-8)), seguidos por aquellos

compuestos sin sustituyentes (β - y α -amirina), mientras que el compuesto que presento mayor actividad fue el fenilacetato de α -amirina.

Sin embargo, existen 3 condiciones (Lipinski y cols., 1997) que un compuesto debe de cumplir para ser considerado un buen fármaco: la permeabilidad del compuesto en la membrana (la cuál se ve favorecida al haber sustituyentes lipofílicos), la capacidad del compuesto de interaccionar con la región hidrofóbica de la membrana y su solubilidad. Si bien los compuestos evaluados se encuentran en dispersión, cabe recordar que una emulsión es un sistema altamente inestable, una de las razones de esta inestabilidad es por falta de control sobre el tamaño de la micela (Drelich y cols., 2010). Ahora los compuestos de mayor peso molecular junto con los más hidrofóbicos tienden a formar micelas de mayor tamaño, que los compuestos con un carácter más hidrofílico en una emulsión. Las micelas de mayor tamaño tienden a formar agregados, que pueden llegar a desestabilizar la emulsión. Esto puede explicar un poco la razón por lo cual no se observó la tendencia esperada, ya que aunque son moléculas altamente hidrofóbicas, tienden a formar agregados más rápidamente que las demás moléculas (Drelich y cols., 2010).

Por otro lado, la naturaleza del sustituyente también tiene un impacto sobre la posible actividad antimicrobiana, la esterificación de los grupos carboxílicos disminuye la actividad antimicrobiana de los compuestos, ya que de acuerdo a Urzua y cols. (2008), es necesaria la presencia de grupos donadores de hidrógeno (HBD), como los grupos -OH de los carboxilos. Y aunque en general, se ha observado que la actividad antimicrobiana disminuye con 2 grupos HBD, no se ha podido explicar porque en moléculas con 2 grupos HBD distantes este efecto no se alcanza a observar, probablemente porque al estar distantes estos grupos las posibilidades de que interaccionen un grupo con el otro, en la misma molécula, son bajas (Urzua y cols. 2008). Se ha observado que los compuestos con anillos fenólicos inhiben el transporte de la glucosa a través de la membrana celular

(Evans y Martin, 2000), además de la síntesis de DNA, RNA y proteínas (Nes y Eklund, 1983).

Rivero-Cruz y cols. (2009) encontraron que la MIC del ácido betulínico disuelto en metanol es de 542 µg/mL, como se puede ver la MIC es mayor a 100 µg/mL, sin embargo es interesante observar como la MIC está en función del medio en el que se solubilize, en este caso se solubilizó previamente en metanol, líquido menos polar que el agua, pero que es miscible con el agua.

El ácido betulínico cuenta con 2 grupos HBD distantes, sin embargo en una concentración menor del inóculo (10^3 UFC/mL) presenta una mayor actividad bacteriostática que el fenilacetato de α -amirina. El ácido betulínico tiene una estructura muy similar a la de los ácidos ursólico y oleanólico, para los cuales los valores de la MIC en *S. mutans* son aproximadamente de 1250 µg/mL, que como se puede apreciar son valores de MIC muy altos para compuestos puros. Sin embargo, se ha observado que estos compuestos disminuyen la síntesis del glucano insoluble producido por *S. mutans*, que es uno de sus factores de virulencia (Kozai y cols. 1999).

Un probable mecanismo de acción de los compuestos triterpenoides pentacíclicos propuesto por Kyrikou y cols. (2005) y De León y cols. (2009), señala que el primer lugar de destino de los triterpenos es la membrana citoplasmática, debido a su naturaleza hidrofóbica, generando partición en la bicapa lipídica produciendo un flujo de salida rápido y marcado de potasio intracelular y una inhibición de la oxidación del NADH en la membrana.

Los compuestos antimicrobianos evaluados en el presente trabajo, mostraron menor actividad que otros extractos y compuestos estudiados por otros autores. Tal es el caso del extracto metanólico P70 de la uva roja que mostró actividad antimicrobiana contra *S. mutans* en una concentración de 0.5 mg/mL (Smullen y cols., 2007), el extracto metanólico de *Cyperus rotundus* que mostró actividad antimicrobiana en una concentración de 1 mg/mL contra *S. mutans* (Yu y cols.,

2007), Rivero-Cruz y cols. (2008) encontraron actividad antimicrobiana del acetato del ácido oleanólico de 31 $\mu\text{g/mL}$ sobre *S. mutans*, modificación en la posición 3 y una actividad mucho menor que los valores reportados por Porto y cols. (2009) para los diterpenos aislados de *Viguiera arenaria*, que mostraron actividad en concentraciones de 20 $\mu\text{g/mL}$ contra bacterias orales, como *S. sanguinis*, *S. mutans*, *S. salivarius* y *S. mitis*, encontrando que para este tipo de moléculas la actividad antimicrobiana depende de la posición de los grupos hidróxilo, carbonilo y carboxilo, mostrando mayor actividad para aquellos compuestos con estos sustituyentes en la posición 3.

Finalmente, aunque no se logró una completa inhibición del desarrollo de la cepa *S. mutans*, por efecto de los compuestos triterpenoides evaluados, si hubo un retraso en el desarrollo de la cepa. Posiblemente, los compuestos evaluados tengan efecto preventivo ante la formación de caries, afectando en mayor proporción a *S. mutans*, mientras que no tendría un efecto de la misma magnitud sobre los comensales comunes (en estado de salud), *S. sanguinis* y *S. salivarius*. Cabe aclarar que el objetivo de usar estos compuestos no es sustituir al cepillado pero si utilizarlos como complemento de la higiene bucal.

VII. Conclusiones

- No se encontró actividad bactericida de los compuestos triterpenoides sobre las cepas de *Streptococcus* spp. a las concentraciones evaluadas.
- El fenilacetato de α -amirina presentó la mejor actividad bacteriostática sobre una concentración inicial de 10^6 UFC/mL de *S. mutans*, reduciendo hasta un ciclo logarítmico la concentración final de la cepa, mientras que el ácido betulínico presentó la mejor actividad bacteriostática sobre una concentración inicial de 10^3 UFC/mL de *S. mutans*, reduciendo hasta tres ciclos logarítmicos la concentración final de la cepa.
- La cepa sobre la cual hay un mayor efecto bacteriostático es *S. mutans*.
- Los compuestos octanoato de α -amirina y palmitato de α -amirina son los que menor efecto bacteriostático presentan sobre *S. mutans*.
- La metodología ideal para evaluar los compuestos α -amirina, β -amirina, fenilacetato de α -amirina, octanoato de α -amirina, palmitato de α -amirina y el ácido betulínico fue la emulsificación con tween ® 80.
- Es necesario tener un mayor control sobre el tamaño de las micelas formadas para asegurar una emulsión más estable.
- El efecto que el fenilacetato de α -amirina tiene sobre *S. salivarius* y *S. sanguinis* sobre una concentración inicial de 10^6 UFC/mL es menor que el que tiene sobre *S. mutans*, esta propiedad hace que el compuesto sea muy prometedor, funcionando como bacteriostático contra *S. mutans*, mientras el crecimiento de la microbiota benéfica como *S. salivarius* y *S. sanguinis* no se ve afectado.

VIII. Perspectivas

- Evaluar el efecto de los compuestos α -amirina, β -amirina, fenilacetato de α -amirina, octanoato de α -amirina, palmitato de α -amirina y el ácido betulínico sobre otras cepas relacionadas con la presencia de caries como *S. sobrinus* y *S. mitis*.
- Evaluar el efecto de los compuestos α -amirina, β -amirina, fenilacetato de α -amirina, octanoato de α -amirina, palmitato de α -amirina y el ácido betulínico sobre otras cepas relacionadas con enfermedades periodontales como *Porphyromonas gingivalis*.
- Evaluar el efecto de compuestos derivados de α -amirina y β -amirina, con modificaciones como adición de anillos fenólicos, que mejoren su actividad como antimicrobianos.
- Realizar otros ensayos microbiológicos, como pruebas de tiempo de muerte y de adherencia *in vitro*, sobre las cepas de *Streptococcus* spp.
- Desarrollar una metodología que permita tener un mayor control sobre el tamaño y la formación de las micelas.

IX.- Anexos

Anexo A.- Medios, reactivos y equipos.

A.1. Preparación de los medios de cultivo utilizados en el proyecto

Agar KF (Kenner Fecal) para *Streptococcus* Difco™

Por instrucciones del proveedor:

1. Suspender 76.4 g del polvo en 1 L de agua destilada.
2. Mezclar bien.
3. Calentar con agitación constante y hervir por 1 minuto hasta disolver completamente el medio.
4. Calentar 5 minutos más.
5. Al medio enfriado a 50° C adicionar asepticamente 100 mL de la solución de cloruro de trifeniltetrazolium (TTC) al 10%
6. Mezclar

Agar MRS (Man, Rogosa y Sharpe para *Lactobacillus* spp.) Difco™

Por instrucciones del proveedor:

1. Suspender 70 g del polvo en 1 L de agua destilada.
2. Mezclar bien.
3. Calentar con agitación constante y hervir por 1 minuto hasta disolver completamente el medio.
4. Esterilizar a 121 ° C por 15 minutos.

Agar Nutritivo Difco™

Por instrucciones del proveedor:

1. Suspender 23 g del polvo en 1 L de agua destilada.
2. Mezclar bien.
3. Calentar con agitación constante y hervir por 1 minuto hasta disolver completamente el medio.
4. Esterilizar a 121 ° C por 15 minutos.

Agar TSA (Agar Triptona-Soya) Difco™

Por instrucciones del proveedor:

1. Suspender 23 g del polvo en 1 L de agua destilada.
2. Mezclar bien.
3. Calentar con agitación constante y hervir por 1 minuto hasta disolver completamente el medio.
4. Esterilizar a 121 ° C por 15 minutos.

Caldo BHI (Infusión corazón cerebro) Difco™

Por instrucciones del proveedor:

1. Suspender 37 g del polvo en 1 L de agua destilada.
2. Mezclar bien.
3. Calentar con agitación constante y hervir por 1 minuto hasta disolver completamente el medio.
4. Esterilizar a 121° C por 15 minutos.

A.2. Reactivos y equipo utilizados durante el desarrollo del proyecto:

Reactivos	Equipo
Acetato de etilo, J.T. Baker ®	Espectrofotómetro modelo Spectronic21D, Milton Ray ®
Acetato de sodio, Sigma ®	Incubadora modelo Max Q 4000, ThermoScientific®
Acetona, J.T. Baker ®	Incubadora modelo VWR 1550, VWR Scientific Inc®
β -ciclodextrina®	Potenciómetro 3020, Jenway®
Cloroformo, J.T. Baker®	Rotavapor modelo R-205, Buchi®
Cloruro de sodio, Sigma ®	Sonicador modelo 2210, Branson®
Colesterol (5-colesten -3 β -ol), Sigma ®	
Digluconato de clorhexidina solución al 20% en agua, Sigma ®	
Fosfato de sodio monobásico monohidratado, Química Barsa S. de R. L.	
Fosfato de sodio heptahidratado, J.T. Baker ®	
Glicerol anhidro, J.T. Baker ®	
L- α -fosfatidilcolina de soya~99% (TLC), Sigma ®	
Sacarosa, Mallinckrodt®	
Sephadex LH-20 lipofílico, Sigma ®	
Sulfato de sodio anhidro, Sigma ®	
Tween® 80, Sigma-Aldrich ®	

Anexo B

B.1. Tinción Gram

La tinción Gram se realizó de acuerdo al siguiente procedimiento:

1. Colocar sobre un porta-objetos una gota de agua y la colonia que se desea teñir, fijando a calor moderado la preparación. En caso de utilizar un cultivo líquido omitir la gota de agua y colocar directamente sobre el porta-objetos una gota de cultivo líquido.
2. Adicionar una gota de cristal violeta y dejarlo durante un minuto.
3. Lavar con agua y dejar escurrir.
4. Cubrir la preparación con lugol (solución yodo-yoduro), y dejarlo actuar durante un minuto.
5. Lavar con agua y decolorar con una mezcla acetona:etanol (1:1) hasta que deje de salir colorante.
6. Inmediatamente después enjuagar con agua y eliminar el exceso.
7. Aplicar la safranina, esperar 1 minuto.
8. Enjuagar con agua, escurrir y dejar secar.
9. Realizar la observación microscópica.

B.2. Prueba de la catalasa

La prueba de la catalasa se realizó de acuerdo a la siguiente metodología:

1. Con un palillo estéril se tomó del medio sólido una colonia aislada de la cepa en estudio y se colocó sobre un porta-objetos limpio.
2. Se agregó una gota de solución de peróxido de hidrógeno al 30%.
3. La formación inmediata de burbujas indica que la prueba es positiva.

Anexo C.- Observaciones microscópicas

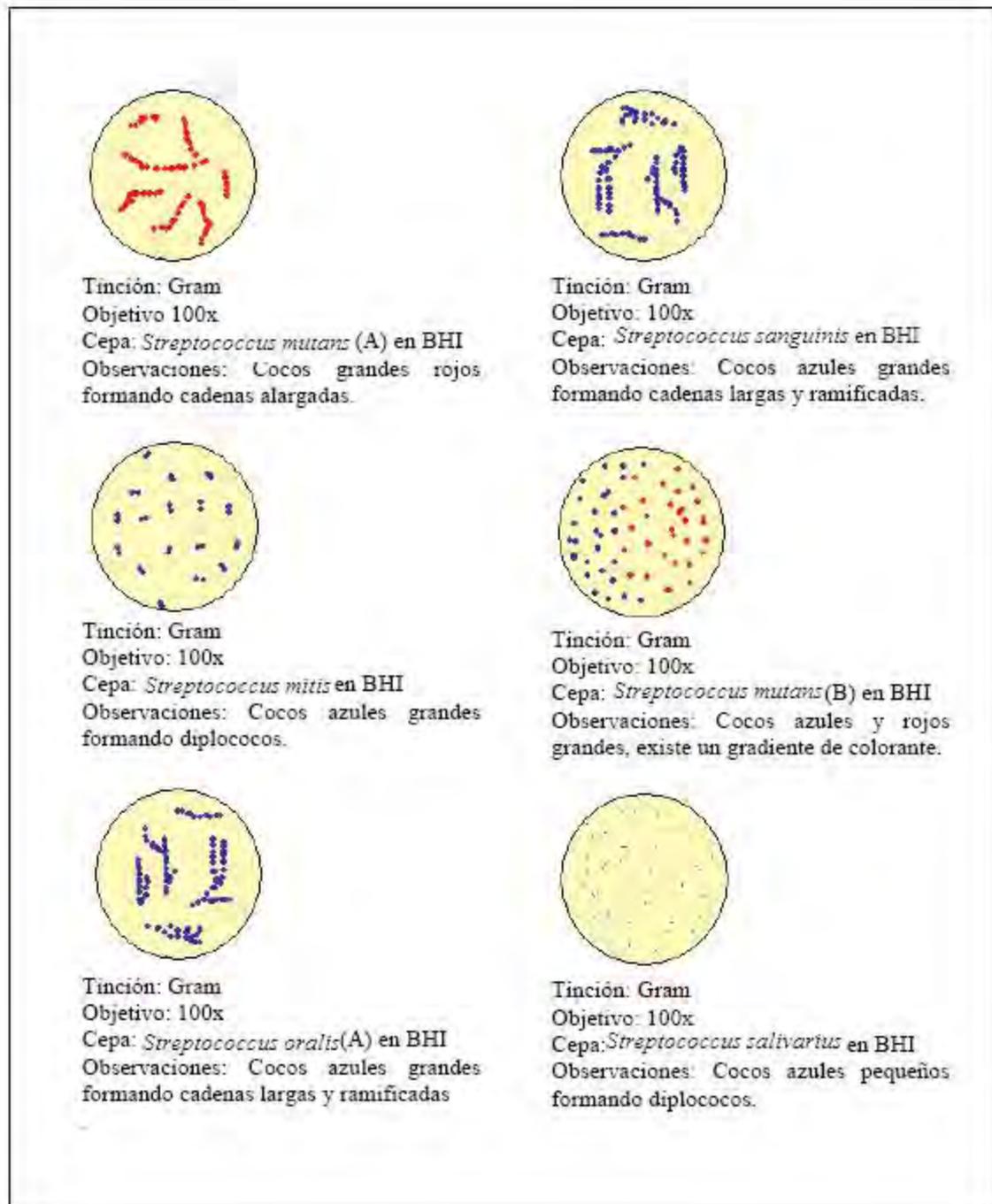


Figura C1.- Características morfológicas de seis de las cepas de *Streptococcus* spp. utilizadas en el proyecto.

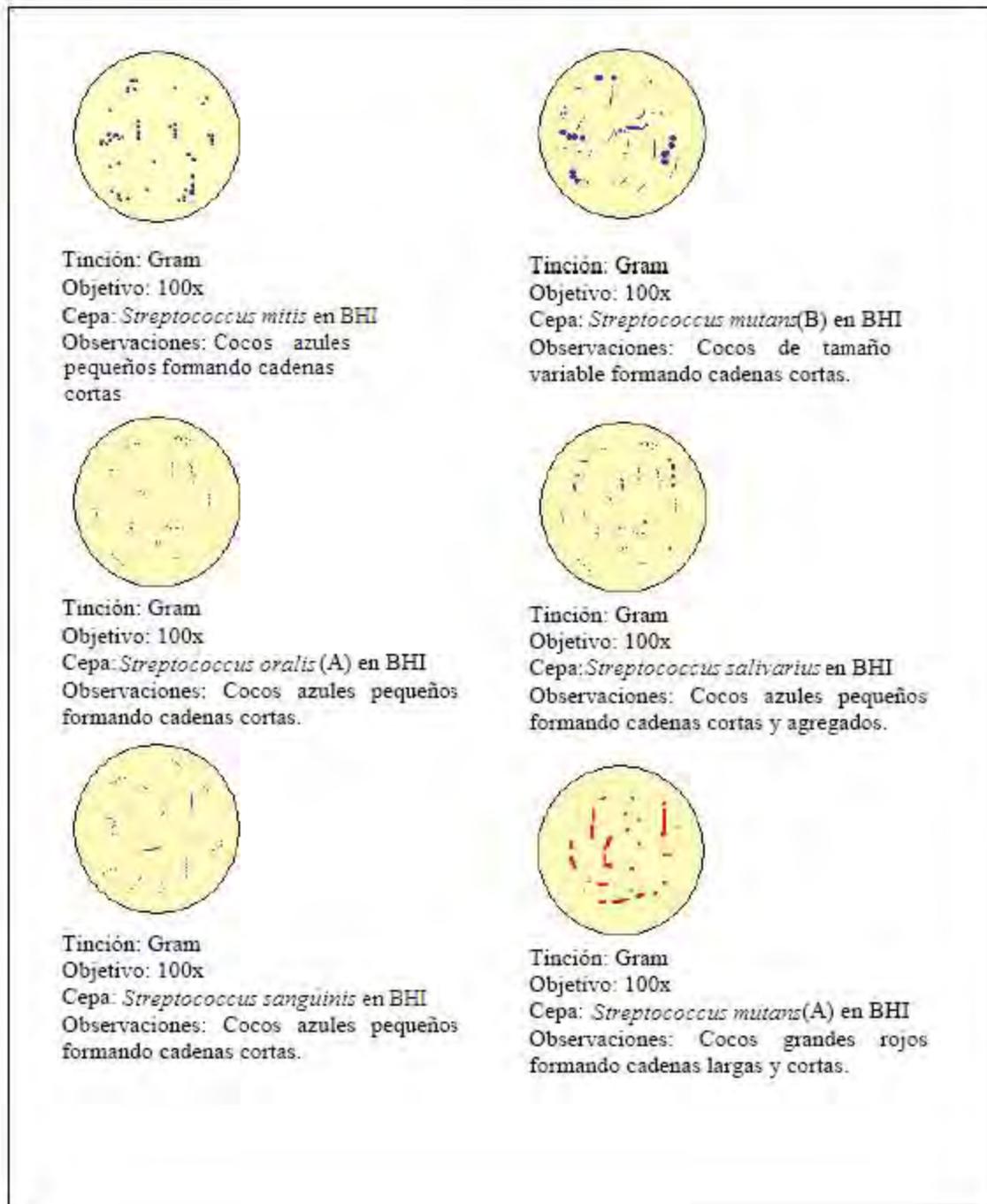


Figura C2.- Características morfológicas de seis de las cepas de *Streptococcus* spp. utilizadas en el proyecto.

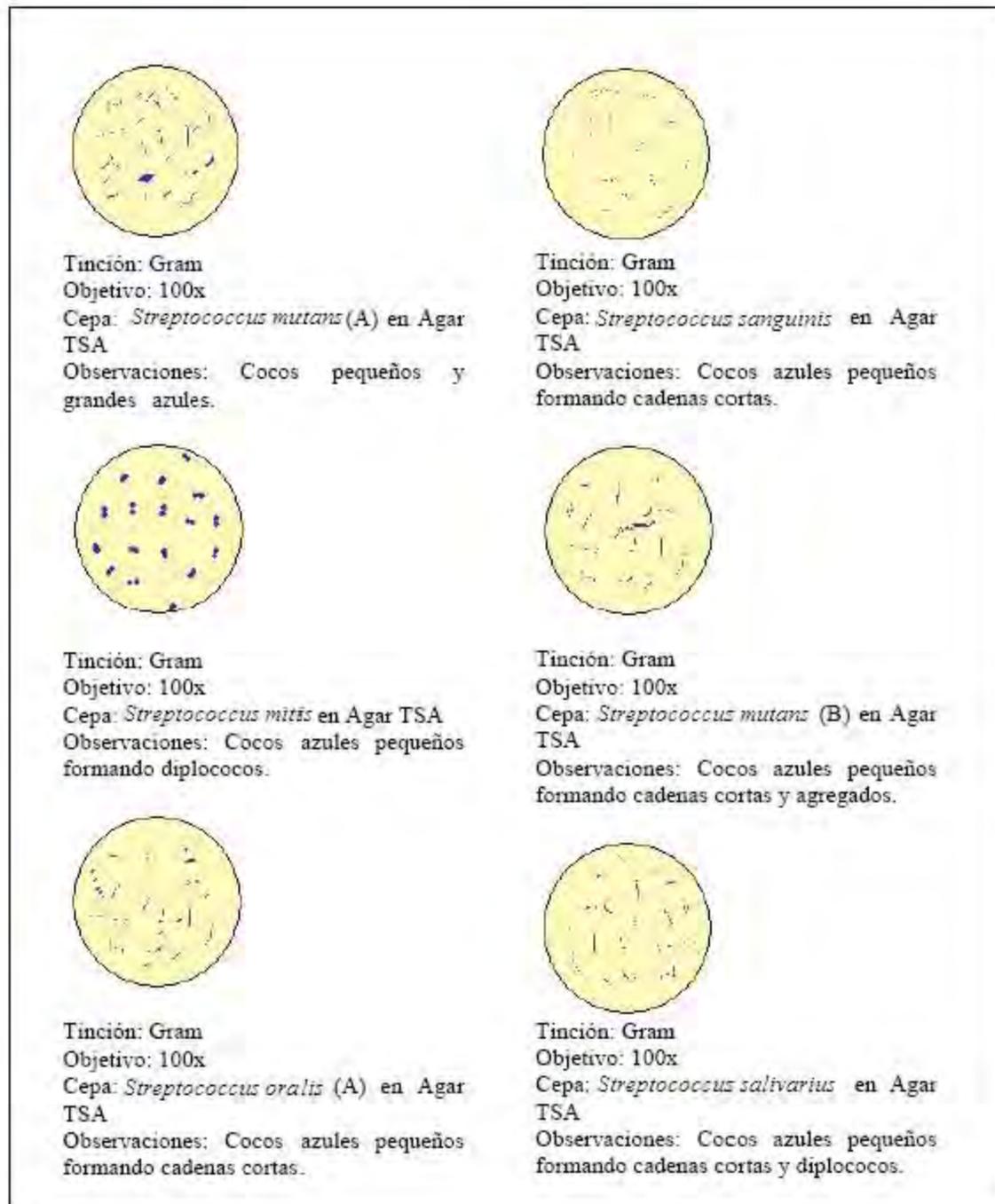


Figura C3.- Características morfológicas de seis de las cepas de *Streptococcus* spp. utilizadas en el proyecto.



Figura C4.- Características morfológicas de tres de las cepas de *Streptococcus* spp. utilizadas en el proyecto.

Anexo D.- Resultados generales de la cinética de crecimiento de las cepas de *Streptococcus*.

- *S. salivarius*

Tabla D1.- Resultados de la cinética de crecimiento de *S. salivarius*. Los tiempos marcados corresponden a los tiempos en los que se realizó la cuenta en placa.

<i>S. salivarius</i>		
t (h)	Abs	pH
0	0.008	7.18
1	0.011	7.16
1.9	0.014	7.16
2.9	0.018	7.16
3.9	0.036	7.16
4.9	0.149	6.74
6.2	0.576	5.12
6.9	0.593	5.06
7.75	0.595	5.06
8.6	0.587	5.09
9.6	0.6	5.08
10.6	0.603	5.09
11.6	0.608	5.11
25.75	0.71	5.16
48.4	0.864	5.79

Tabla D2.- Resultados obtenidos para la cuenta en placa de *S. salivarius*.

t (h)	UFC/mL	Log (UFC/mL)	UFC/mL Promedio	Log(UFC/mL Promedio)
0	2.46×10^6	6.39	2.18×10^6	6.34
	1.90×10^6	6.28		
2	4.08×10^6	6.61	3.74×10^6	6.57
	3.40×10^7	6.53		
4	2.48×10^7	7.39	5.29×10^7	7.72
	8.10×10^7	7.91		
6	2.1×10^9	9.32	2.16×10^9	9.33
	2.22×10^9	9.35		
8	9.0×10^8	8.95	8.80×10^8	8.94
	8.6×10^8	8.93		
10	4.79×10^9	9.68	3.20×10^9	9.5
	1.60×10^9	9.2		

- *S. mutans* (C)

Tabla D3.- Resultados de la cinética de crecimiento de *S. mutans* (C). Los tiempos marcados corresponden a los tiempos en los que se realizó la cuenta en placa.

<i>S. mutans</i>		
Tiempo (h)	Absorbancia	pH
0	0.023	7.15
1	0.031	7.12
2	0.044	7.07
3	0.081	6.97
4	0.242	6.88
5	0.36	6.49
6	0.5	6.39
6.8	0.597	5.99
8.8	0.78	5.99
9.3	0.798	5.97
10	0.792	6.07
11	0.766	5.96
11.7	0.786	6.1
25.9	0.799	6.05

Tabla D4.- Resultados obtenidos para la cuenta en placa de *S. mutans* (C).

t (h)	UFC/mL	Log (UFC/mL)	UFC/mL Promedio	Log(UFC/mL Promedio)
0	4.20×10^7	7.62	3.24×10^7	7.51
	2.27×10^7	7.36		
2	4.60×10^7	7.66	4.01×10^7	7.6
	3.41×10^7	7.53		
4	2.60×10^8	8.41	2.52×10^8	8.4
	2.44×10^8	8.39		
6	8.80×10^8	8.94	8.60×10^8	8.93
	8.40×10^8	8.92		
8	1.60×10^9	9.2	1.58×10^9	9.2
	1.56×10^9	9.19		
10	1.00×10^9	9	1.60×10^9	9.2
	1.70×10^9	9.23		
	2.09×10^9	9.32		

- *S. sanguinis*

Tabla D5.- Resultados de la cinética de crecimiento de *S. sanguinis*. Los tiempos marcados corresponden a los tiempos en los que se realizó la cuenta en placa.

<i>S. sanguinis</i>		
Tiempo (h)	Absorbancia	pH
0	0.032	7.13
1	0.038	7.12
2	0.06	7
3	0.173	6.77
4	0.608	5.11
5	0.654	4.86
6	0.675	4.8
6.5	0.678	4.8
8.5	0.68	4.8
9	0.685	4.85
10	0.694	4.86
11	0.702	4.79
12	0.706	4.85
26.4	0.704	4.75

Tabla D6.- Resultados obtenidos para la cuenta en placa de *S. sanguinis*.

t (h)	UFC/mL	Log (UFC/mL)	UFC/mL Promedio	Log (UFC/mL Promedio)
0	4.50×10^7	7.65	4.54×10^7	7.66
	4.58×10^7	7.66		
2	1.47×10^8	8.17	1.48×10^8	8.17
	1.49×10^8	8.17		
4	2.10×10^9	9.34	2.14×10^9	9.33
	2.18×10^9	9.32		
6	3.34×10^9	9.52	3.32×10^9	9.52
	3.30×10^9	9.52		
8	3.74×10^9	9.57	4.05×10^9	9.61
	4.40×10^9	9.64		
	4.00×10^9	9.6		
10	2.34×10^9	9.37	2.67×10^9	9.43
	3.00×10^9	9.48		

- *S. oralis* (A)

Tabla D7.- Resultados de la cinética de crecimiento de *S. oralis*. Los tiempos marcados corresponden a los tiempos en los que se realizó la cuenta en placa.

<i>S.oralis</i>		
t (h)	Abs	pH
0	0.005	7.24
1	0.007	7.23
2	0.008	7.19
3	0.016	7.18
4	0.037	7.09
5	0.066	6.93
6	0.112	6.64
6.9	0.178	6.16
8	0.345	5.55
9.05	0.545	5.42
10	0.564	5.35
11	0.571	5.34
11.9	0.576	5.34
24	0.581	5.33
48	0.609	5.3

Tabla D8.- Resultados obtenidos para la cuenta en placa de *S. oralis*.

t (h)	UFC/mL	Log (UFC/mL)	UFC/mL Promedio	Log(UFC/mL Promedio)
0	4.5×10^6	6.65	5.15×10^6	6.71
	5.8×10^6	6.76		
2	1.38×10^7	7.13	1.47×10^7	7.17
	1.56×10^7	7.19		
4	1.98×10^7	7.3	2.01×10^7	7.3
	2.04×10^7	7.31		
6	1.37×10^8	8.14	1.29×10^8	8.11
	1.21×10^8	8.08		
8	1.56×10^8	8.19	1.67×10^8	8.22
	1.78×10^8	8.25		
10	2.01×10^8	8.3	2.275×10^8	8.36
	2.54×10^8	8.4		

Anexo E.- Resultados de la determinación del efecto de los distintos compuestos triterpenoides sobre las cepas de *Streptococcus* spp.

Tabla E1.-Resultados de la evaluación de la α -amirina sobre una concentración de 10^6 UFC/mL de las distintas cepas de *Streptococcus* spp.

Muestra	Cepa											
	<i>S. mutans</i>			<i>S. salivarius</i>			<i>S. sanguinis</i>			<i>S. oralis</i>		
	UFC/mL	Log(UFC/mL)	UFC/mL	Log(UFC/mL)	UFC/mL	Log(UFC/mL)	UFC/mL	Log(UFC/mL)	UFC/mL	Log(UFC/mL)	UFC/mL	Log(UFC/mL)
t_0	1.74×10^7	7.24	1.13×10^6	6.05	7.20×10^6	6.86	8.35×10^5	5.92				
Control negativo	8.10×10^8	8.91	1.88×10^7	7.27	3.95×10^6	8.6	1.91×10^8	8.28				
10 μ g/mL	5.00×10^8	8.7	1.24×10^7	7.09	2.22×10^6	8.34	1.81×10^8	8.26				
53.33 μ g/mL	2.96×10^8	8.47	1.27×10^7	7.10	1.81×10^6	8.26	1.49×10^8	8.17				
100 μ g/mL	2.13×10^8	8.33	1.15×10^7	7.06	1.01×10^6	8	1.61×10^8	8.21				
533.3 μ g/mL	2.04×10^8	8.31	1.16×10^7	7.06	1.00×10^6	8	1.34×10^8	8.13				
1000 μ g/mL	1.28×10^8	8.11	1.05×10^7	7.02	7.70×10^7	7.89	8.80×10^7	7.94				
Control positivo	-	-	-	-	-	-	-	-				

* t_0 : tiempo cero, (-) no hubo crecimiento en la dilución 10^{-2} .

Tabla E2.-Resultados de la evaluación de la β -amirina sobre una concentración de 10^6 UFC/mL de las distintas cepas de *Streptococcus* spp.

Muestra	Cepa											
	S. mutans			S. salivarius			S. sanguinis			S. oralis		
	UFC/mL	Log(UFC/mL)	UFC/mL	Log(UFC/mL)	UFC/mL	Log(UFC/mL)	UFC/mL	Log(UFC/mL)	UFC/mL	Log(UFC/mL)	UFC/mL	Log(UFC/mL)
t_0	6.80×10^7	7.83	3.35×10^5	5.53	2.50×10^6	6.4	9.15×10^5	5.98				
Control negativo	1.68×10^9	9.22	8.50×10^7	7.93	1.02×10^7	7.01	7.10×10^7	7.85				
10 μ g/mL	1.21×10^9	9.08	8.30×10^7	7.92	9.15×10^6	6.98	7.25×10^7	7.88				
53.33 μ g/mL	1.04×10^9	9.01	7.15×10^7	7.85	8.85×10^6	6.95	6.45×10^7	7.81				
100 μ g/mL	9.60×10^8	8.98	6.00×10^7	7.78	7.30×10^6	6.88	4.85×10^7	7.69				
533.3 μ g/mL	6.08×10^8	8.78	2.70×10^7	7.43	7.20×10^6	6.88	4.30×10^7	7.63				
1000 μ g/mL	8.95×10^8	8.95	2.47×10^7	7.39	6.35×10^6	6.8	3.23×10^7	7.51				
Control positivo	-	-	-	-	-	-	-	-				

** t_0 tiempo cero, (-) no hubo crecimiento en la dilución 10^{-2}

Tabla E3.- Resultados de la evaluación del fenil acetato de α -amirina sobre una concentración de 10^6 UFC/mL las distintas cepas de *Streptococcus* spp.

		Cepa							
		<i>S. mutans</i>		<i>S. salivarius</i>		<i>S. sanguinis</i>		<i>S. oralis</i>	
		Promedio							
Muestra	UFC/mL	Log(UFC/mL)	UFC/mL	Log(UFC/mL)	UFC/mL	Log(UFC/mL)	UFC/mL	Log(UFC/mL)	
Fenil acetato de α amirina	t_0	2.62×10^5	6.42	5.25×10^6	6.72	4.70×10^6	6.67	8.65×10^5	5.94
	Control negativo	5.03×10^8	8.7	3.70×10^7	7.57	2.66×10^7	7.42	1.10×10^8	8.04
	10 μ g/mL	9.55×10^7	7.98	3.17×10^7	7.5	2.17×10^7	7.33	1.08×10^8	8.03
	53.33 μ g/mL	7.50×10^7	7.88	2.55×10^7	7.41	1.79×10^7	7.25	9.25×10^7	7.97
	100 μ g/mL	6.05×10^7	7.78	5.55×10^6	6.74	1.62×10^7	7.21	2.39×10^7	7.38
	533.3 μ g/mL	5.70×10^7	7.76	4.85×10^6	6.69	1.27×10^7	7.1	2.97×10^6	6.47
	1000 μ g/mL	4.20×10^7	7.62	4.30×10^6	6.63	1.20×10^7	7.08	8.00×10^5	5.9
	Control positivo	-	-	-	-	-	-	-	-

* t_0 tiempo cero, (-) no hubo crecimiento en la dilución 10^{-2} .

Tabla E4.- Resultados de la evaluación del ácido betulínico sobre una concentración de 10^6 UFC/mL las distintas cepas de *Streptococcus* spp.

Muestra	Cepa																
	<i>S. mutans</i>			<i>S. salivarius</i>			<i>S. sanguinis</i>			<i>S. oralis</i>							
	UFC/mL	Log(UFC/mL)	UFC/mL	Log(UFC/mL)	UFC/mL	Log(UFC/mL)	UFC/mL	Log(UFC/mL)	UFC/mL	Log(UFC/mL)	UFC/mL	Log(UFC/mL)					
t_0	1.18×10^6	6.07	4.10×10^5	5.61	5.05×10^5	5.7	4.65×10^5	6.67	Control negativo	1.86×10^9	9.27	7.25×10^7	7.86	2.37×10^8	8.37	2.71×10^8	8.43
100 μ g/mL	1.61×10^9	9.21	1.04×10^7	7.01	2.30×10^8	8.36	2.55×10^8	8.41	100 μ g/mL	1.61×10^9	9.21	1.04×10^7	7.01	2.30×10^8	8.36	2.55×10^8	8.41
533.3 μ g/mL	9.80×10^8	8.99	9.85×10^6	6.99	1.76×10^8	8.25	1.98×10^8	8.3	533.3 μ g/mL	9.80×10^8	8.99	9.85×10^6	6.99	1.76×10^8	8.25	1.98×10^8	8.3
1000 μ g/mL	6.95×10^8	8.84	8.55×10^6	6.93	1.40×10^8	8.14	1.07×10^8	8.03	1000 μ g/mL	6.95×10^8	8.84	8.55×10^6	6.93	1.40×10^8	8.14	1.07×10^8	8.03
1533.3 μ g/mL	3.65×10^8	8.56	7.70×10^6	6.89	1.13×10^8	8.05	9.15×10^7	7.96	1533.3 μ g/mL	3.65×10^8	8.56	7.70×10^6	6.89	1.13×10^8	8.05	9.15×10^7	7.96
2000 μ g/mL	1.03×10^8	8.01	7.40×10^6	6.87	9.85×10^7	7.99	4.80×10^7	7.68	2000 μ g/mL	1.03×10^8	8.01	7.40×10^6	6.87	9.85×10^7	7.99	4.80×10^7	7.68
Control positivo	-	-	-	-	-	-	-	-	Control positivo	-	-	-	-	-	-	-	-

* t_0 tiempo cero, (-) no hubo crecimiento en la dilución 10^{-2} .

Tabla E5.- Resultados de la evaluación del octanoato de α -amirina y el palmitato de α -amirina sobre una concentración de 10^6 UFC/mL de *S. mutans*.

	Octanoato de α -amirina		Palmitato de α -amirina	
	Promedio			
Muestra	UFC/mL	Log(UFC/mL)	UFC/mL	Log(UFC/mL)
t_0	4.55×10^6	6.66	1.45×10^6	6.16
Control negativo	1.30×10^9	9.11	1.20×10^9	9.08
10 μ g/mL	1.07×10^9	9.03	1.06×10^9	9.02
53.33 μ g/mL	1.08×10^9	9.03	7.60×10^8	8.88
100 μ g/mL	8.70×10^8	8.94	7.20×10^8	8.86
533.3 μ g/mL	5.85×10^8	8.77	4.70×10^8	8.67
1000 μ g/mL	5.50×10^8	8.74	4.65×10^8	8.67
Control positivo	-	-	-	-

* t_0 tiempo cero, (-) no hubo crecimiento en la dilución 10^{-2} .

Tabla E6.- Resultados de la evaluación del fenilacetato de α -amirina y el ácido betulínico sobre una concentración de 10^3 UFC/mL de *S. mutans*.

Muestra	Fenilacetato de α -amirina		Ácido betulínico	
	UFC/mL	Log(UFC/mL)	UFC/mL	Log(UFC/mL)
to	8.50×10^3	3.93	3.65×10^3	3.56
Control negativo	1.18×10^8	8.07	9.80×10^8	8.99
10 μ g/mL	5.75×10^7	7.76	5.15×10^8	8.71
53.33 μ g/mL	4.35×10^7	7.64	2.26×10^8	8.35
100 μ g/mL	4.45×10^7	7.65	1.08×10^8	8.03
533.3 μ g/mL	3.80×10^7	7.58	5.25×10^7	7.72
1000 μ g/mL	1.67×10^7	7.22	1.16×10^6	6.06
Control positivo	-	-	-	-

* t_0 tiempo cero, (-) no hubo crecimiento en la dilución 10^{-2} .

Anexo F.- Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo usando el paquete estadístico STATGRAPHICS Centurion XV versión 15.2.14.

- Comparación de las distintas metodologías para mejorar la solubilidad de los compuestos.

Se realizó el análisis estadístico para determinar si existe diferencia estadística significativa entre las distintas metodologías para mejorar la solubilidad por medio de la prueba de ANOVA.

Tabla F1.- Resultados de la prueba de ANOVA para determinar si existe diferencia estadística significativa entre los distintos métodos realizados para mejorar la solubilidad.

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre métodos	0.0231	3	0.0077	0.99	0.4838
Intra métodos	0.0312	4	0.0078		
Total	0.0543	7			

La razón-F, que en este caso es igual a 0.986, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la razón-F es mayor o igual que 0.05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de reducción logarítmica cuenta viable entre un nivel de método y otro, con un nivel del 95.0% de confianza.

- Tratamiento estadístico de los resultados del efecto de los diversos compuestos sobre las cepas de *Streptococcus* spp.
- Efecto de los compuestos α - amirina, β -amirina y fenilacetato de α -amirina sobre una concentración de 10^6 UFC/mL de las cepas *S. mutans*, *S. salivarius*, *S. sanguinis* y *S. oralis*

Tabla F2.- Resumen estadístico para los datos del efecto de las distintas concentraciones de los compuestos α - amirina, β -amirina y fenilacetato de α -amirina sobre una concentración de 10^6 UFC/mL de las cepas *S. mutans*, *S. salivarius*, *S. sanguinis* y *S. oralis*.

Recuento	120
Promedio	0.415
Desviación estándar	0.4305
Coefficiente de variación	103.73%
Mínimo	-0.0518
Máximo	2.1901
Rango	2.2419
Sesgo estandarizado	7.8247
Curtosis estandarizada	7.82

La tabla F2 muestra los estadísticos de resumen. Incluye medidas de tendencia central, medidas de variabilidad y medidas de forma. De particular interés aquí son el sesgo estandarizado y la curtosis estandarizada, las cuales pueden utilizarse para determinar si la muestra proviene de una distribución normal. Valores de estos estadísticos fuera del rango de -2 a +2 indican desviaciones significativas de la normalidad, lo que tendería a invalidar cualquier prueba estadística con referencia a la desviación estándar. En este caso, el valor de sesgo estandarizado no se encuentra dentro del rango esperado para datos provenientes de una distribución normal. El valor de curtosis estandarizada no se encuentra dentro del rango esperado para datos provenientes de una distribución normal.

De acuerdo a la información proporcionada por el paquete estadístico, los datos no tienen una distribución normal, para poder comparar entre las muestras fue necesario realizar una prueba no paramétrica, Kruskal-Wallis, para poder determinar las diferencias estadísticamente significativas.

La prueba de Kruskal-Wallis se realizó para ver si hay diferencia estadísticamente significativa en la reducción en la cuenta de células viables considerando tres variables, la concentración, la cepa y el compuesto. Los resultados se presentan a continuación.

Tabla F3.- Resultados de la prueba de Kruskal-Wallis para evaluar si hay diferencia significativa entre las distintas concentraciones evaluadas.

Concentración	Tamaño muestra	Rango promedio
10 µg/mL	24	31.2917
53.33 µg/mL	24	44.5833
100 µg/mL	24	64.7292
533.33 µg/mL	24	77
1000 µg/mL	24	84.8958

Estadístico = 39.5064 Valor-P = 5.475×10^{-8}

La prueba de Kruskal-Wallis evalúa la hipótesis nula de que las medianas de cada una de las 5 concentraciones es la misma. Puesto que el valor-P es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medianas con un nivel del 95.0% de confianza. En el gráfico de caja y bigotes con muesca se puede determinar cuáles medianas son significativamente diferentes de otras.

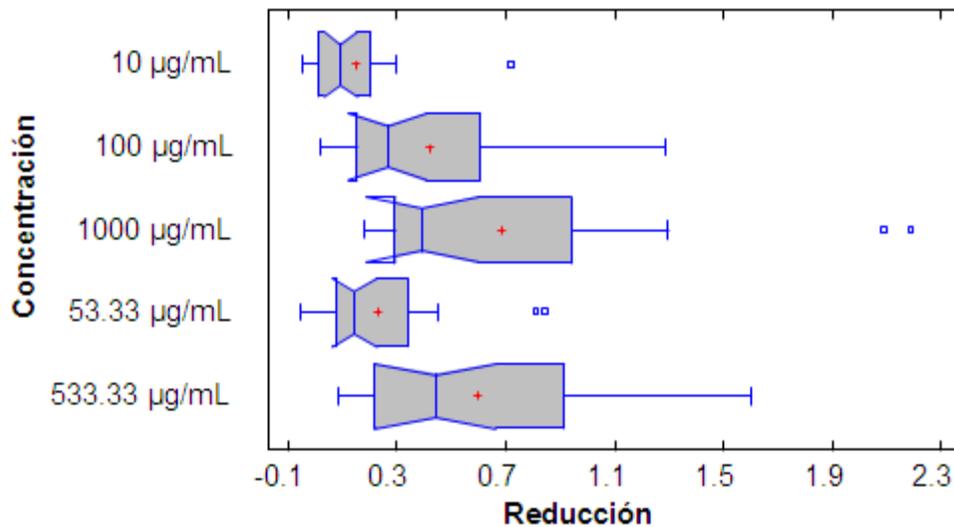


Figura F1.- Gráfico de cajas y bigotes con muesca para determinar si hay diferencia significativa entre las distintas concentraciones evaluadas sobre las cepas de *Streptococcus* spp. en una concentración de 10^6 UFC/mL. Las muescas no traslapadas indican diferencia significativa con un nivel de 95% de confianza.

En la figura F1 se puede observar que existe diferencia significativa entre la mediana de las concentraciones de 10 µg/mL y 53.33 µg/mL con la mediana de las concentraciones de 533.33 µg/mL y 1000 µg/mL. La mediana de la concentración de 10 µg/mL es diferente significativamente de la mediana de la concentración de 100 µg/mL. No existe diferencia estadísticamente significativa entre las medianas de las concentraciones de 100 µg/mL, 533.33 µg/mL y 1000 µg/mL.

Tabla F4.- Resultados de la prueba de Kruskal-Wallis para evaluar si hay diferencia significativa entre las distintas cepas evaluadas.

Cepa	Tamaño muestra	Rango promedio
<i>S mutans</i>	30	81.0833
<i>S oralis</i>	30	48.4667
<i>S salivarius</i>	30	57.0333
<i>S sanguinis</i>	30	55.4167

Estadístico = 15.0332 Valor-P = 0.0018

Puesto que el valor-P es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medianas con un nivel del 95.0% de confianza.

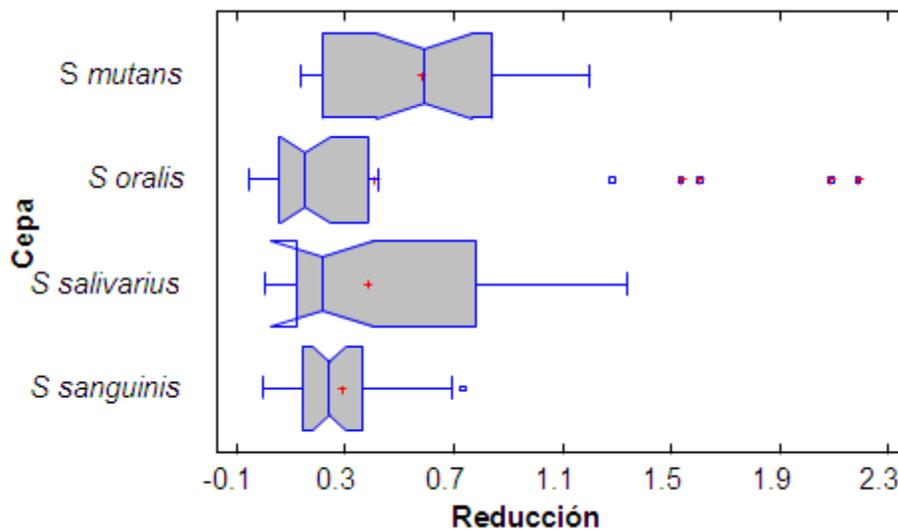


Figura F2.- Gráfico de cajas y bigotes con muesca para determinar si hay diferencia significativa entre las cepas de *Streptococcus* spp. en una concentración de 10^6 UFC/mL. Las muescas no traslapadas indican diferencia significativa con un nivel de 95% de confianza.

En la figura F2 se puede observar que solo existe diferencia significativa entre la mediana de las cepas *S. oralis*, *S. sanguinis* y *S. salivarius* con la mediana de la cepa *S. mutans*. Es decir los compuestos afectan del mismo modo a las 3 primeras cepas mencionadas, pero afecta de manera distinta a *S. mutans*.

Tabla F5.- Resultados de la prueba de Kruskal-Wallis para evaluar si hay diferencia significativa entre los distintos compuestos evaluados.

Compuesto	Tamaño muestra	Rango promedio
α -amirina	40	61.775
β -amirina	40	43.575
fenilacetato de α -amirina	40	76.15

Estadístico = 17.6201 Valor-P = 1.50×10^{-4}

Puesto que el valor-P es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medianas con un nivel del 95.0% de confianza.

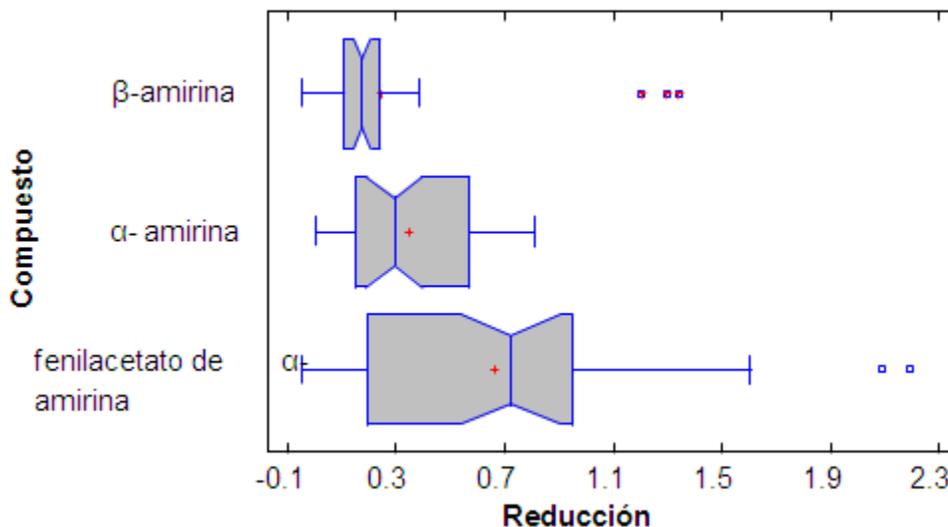


Figura F3.- Gráfico de cajas y bigotes con muesca para determinar si hay diferencia significativa entre los distintos compuestos en una concentración de 10^6 UFC/mL de las cepas de *Streptococcus* spp. Las muescas no traslapadas indican diferencia significativa con un nivel de 95% de confianza.

De acuerdo a la figura F3 existe diferencia significativa entre las medianas de los 3 compuestos, α -amirina, β -amirina y el fenilacetato de α -amirina, con un nivel de 95% de confianza. Por tanto los compuestos afectan de modo distinto a las cepas de *Streptococcus* spp.

- Efecto del ácido betulínico sobre una concentración de 10^6 UFC/mL de las cepas *S. mutans*, *S. salivarius*, *S. sanguinis* y *S. oralis*.

Tabla F6.- Resumen estadístico para los datos del efecto de las distintas concentraciones del ácido betulínico sobre una concentración de 10^6 UFC/mL de las cepas *S. mutans*, *S. salivarius*, *S. sanguinis* y *S. oralis*.

Recuento	40
Promedio	0.513
Desviación estándar	0.377
Coefficiente de variación	73.49%
Mínimo	0.0018
Máximo	1.344
Rango	1.3422
Sesgo estandarizado	0.9699
Curtosis estandarizada	-1.3009

La tabla F6 muestra los estadísticos de resumen. En este caso, el valor de sesgo estandarizado y valor de curtosis estandarizada se encuentran dentro del rango esperado para datos provenientes de una distribución normal.

De acuerdo a la información proporcionada por el paquete estadístico, los datos tienen una distribución normal, para poder comparar entre las muestras fue necesario realizar una prueba paramétrica, ANOVA multifactorial, para poder determinar las diferencias estadísticamente significativas.

La prueba de ANOVA multifactorial se realizó para ver si hay diferencia estadísticamente significativa en la reducción en la cuenta de células viables considerando dos variables, la concentración y la cepa. Los resultados se presentan a continuación.

Tabla F7.- Análisis de varianza multifactorial de los datos del efecto de las distintas concentraciones del ácido betulínico sobre una concentración de 10^6 UFC/mL de las cepas *S. mutans*, *S. salivarius*, *S. sanguinis* y *S. oralis*.

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Efectos principales					
A:Concentración	1.8076	4	0.4519	16.03	0
B:Cepa	2.8337	3	0.9446	33.51	0
Residuos	0.9019	32	0.0282		
Total (corregido)	5.5432	39			

La prueba de ANOVA descompone la variabilidad de la reducción en contribuciones debidas a varios factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que dos valores-P son menores que 0.05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre la Reducción con un 95.0% de nivel de confianza.

Tabla F8.- Pruebas de múltiples rangos para determinar entre que concentraciones del ácido betulínico existe diferencia significativa en la reducción de la concentración de células viables de las cepas de *Streptococcus* spp.

Concentración	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos homogéneos
10 µg/mL	8	0.2382	0.0593	X
53.33 µg/mL	8	0.3532	0.0593	XX
100 µg/mL	8	0.501	0.0593	XX
533.33 µg/mL	8	0.6244	0.0593	X
1000 µg/mL	8	0.8482	0.0593	X

Tabla F9.- Diferencia entre las medias para determinar entre que concentraciones del ácido betulínico existe diferencia significativa en la reducción de la concentración de células viables de las cepas de *Streptococcus* spp.

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
10 µg/mL - 100 µg/mL	*	-0.2627	0.171
10 µg/mL - 1000 µg/mL	*	-0.601	0.171
10 µg/mL - 53.33 µg/mL		-0.1149	0.171
10 µg/mL - 533.33 µg/mL	*	-0.3862	0.171
100 µg/mL - 1000 µg/mL	*	-0.3472	0.171
100 µg/mL - 53.33 µg/mL		0.1478	0.171
100 µg/mL - 533.33 µg/mL		-0.1234	0.171
1000 µg/mL - 53.33 µg/mL	*	0.495	0.171
1000 µg/mL - 533.33 µg/mL	*	0.2238	0.171
53.33 µg/mL - 533.33 µg/mL	*	-0.2712	0.171

* indica una diferencia significativa.

La tabla F9 aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. El asterisco que se encuentra al lado de los siete pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. En la tabla F8, se han identificado 4 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.

Tabla F10.- Pruebas de múltiples rangos para determinar sobre que cepas existe diferencia significativa en la reducción de la concentración de células viables por efecto del ácido betulínico.

Cepa	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
<i>S sanguinis</i>	10	0.2157	0.0531	X
<i>S oralis</i>	10	0.3619	0.0531	X
<i>S mutans</i>	10	0.5479	0.0531	X
<i>S salivarius</i>	10	0.9265	0.0531	X

Tabla F11.- Diferencia entre las medias para determinar sobre que cepas existe diferencia significativa en la reducción de la concentración de células viables por efecto del ácido betulínico.

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
<i>S mutans</i> - <i>S oralis</i>	*	0.186	0.1529
<i>S mutans</i> - <i>S salivarius</i>	*	-0.3786	0.1529
<i>S mutans</i> - <i>S sanguinis</i>	*	0.3322	0.1529
<i>S oralis</i> - <i>S salivarius</i>	*	-0.5645	0.1529
<i>S oralis</i> - <i>S sanguinis</i>		0.1462	0.1529
<i>S salivarius</i> - <i>S sanguinis</i>	*	0.7107	0.1529

* indica una diferencia significativa.

La tabla F11 aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. El asterisco que se encuentra al lado de los siete pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. En la tabla F10, se han identificado 3 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas.

- Efecto de los compuestos α - amirina, β -amirina, fenilacetato de α -amirina, octanoato de α -amirina y palmitato de α -amirina sobre una concentración de 10^6 UFC/mL de la cepa *S. mutans*

Tabla F12.- Resumen estadístico para los datos del efecto de las distintas concentraciones de los compuestos α - amirina, β -amirina, fenilacetato de α -amirina, octanoato de α -amirina y palmitato de α -amirina sobre una concentración de 10^6 UFC/mL de la cepa *S. mutans*.

Recuento	50
Promedio	0.4427
Desviación estándar	0.3202
Coefficiente de variación	72.34%
Mínimo	0.0282
Máximo	1.2041
Rango	1.1759
Sesgo estandarizado	2.0801
Curtosis estandarizada	-0.8725

La tabla F12 muestra los estadísticos de resumen. En este caso, el valor de sesgo estandarizado no se encuentra dentro del rango esperado para datos provenientes de una distribución normal.

De acuerdo a la información proporcionada por el paquete estadístico, los datos no tienen una distribución normal, para poder comparar entre las muestras fue necesario realizar una prueba no paramétrica, Kruskal-Wallis, para poder determinar las diferencias estadísticamente significativas.

Tabla F13.- Resultados de la prueba de Kruskal-Wallis para evaluar si hay diferencia significativa entre los distintos compuestos evaluados.

Compuesto	Tamaño muestra	Rango promedio
α -amirina	10	31.9
β -amirina	10	19
fenilacetato de α -amirina	10	44
octanoato de α -amirina	10	18.3
palmitato de α -amirina	10	14.3

Estadístico = 28.3656 Valor-P = 1.05×10^{-5}

Puesto que el valor-P es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medianas con un nivel del 95.0% de confianza.

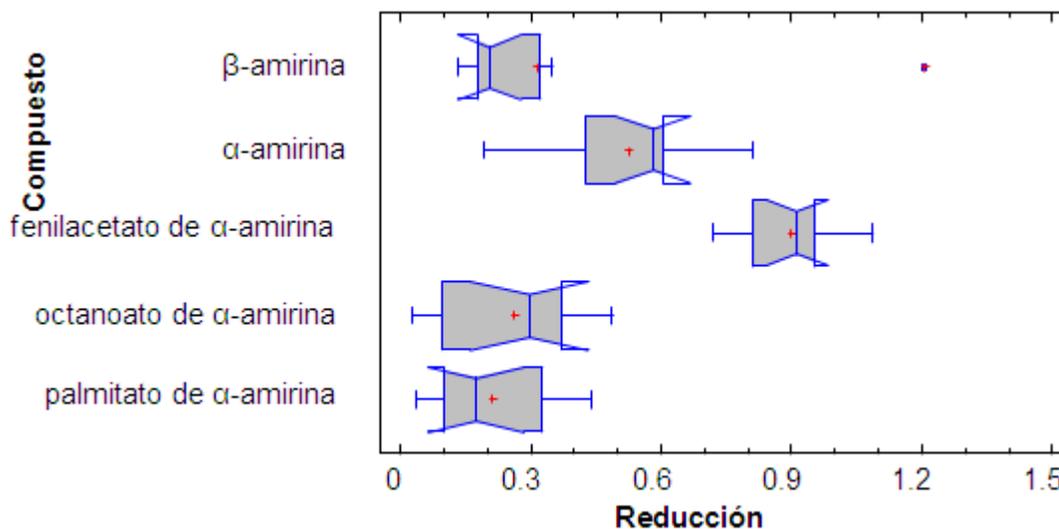


Figura F4.- Gráfico de cajas y bigotes con muesca para determinar si hay diferencia significativa entre las distintas concentraciones de los compuestos en una concentración de 10^6 UFC/mL de la cepa de *S. mutans*. Las muescas no traslapadas indican diferencia significativa con un nivel de 95% de confianza.

De acuerdo a la figura F4 no existe diferencia estadísticamente significativa entre las medianas de los compuestos β -amirina, octanoato de α -amirina y palmitato de α -amirina. Sin embargo con un nivel de 95% de confianza la mediana del compuesto α - amirina es distinta a la mediana de los otros cuatro compuestos, lo mismo ocurre con la mediana del fenilacetato de α - amirina que al 95% de confianza es diferente significativamente con las medianas de los demás compuestos.

Tabla F14.- Resultados de la prueba de Kruskal-Wallis para evaluar si hay diferencia significativa entre las distintas concentraciones evaluadas.

Concentración	Tamaño muestra	Rango promedio
10 $\mu\text{g/mL}$	10	14.2
100 $\mu\text{g/mL}$	10	24.85
1000 $\mu\text{g/mL}$	10	33.1
53.33 $\mu\text{g/mL}$	10	21.7
533.33 $\mu\text{g/mL}$	10	33.65

Estadístico = 12.5528 Valor-P = 0.0137

Puesto que el valor-P es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medianas con un nivel del 95.0% de confianza.

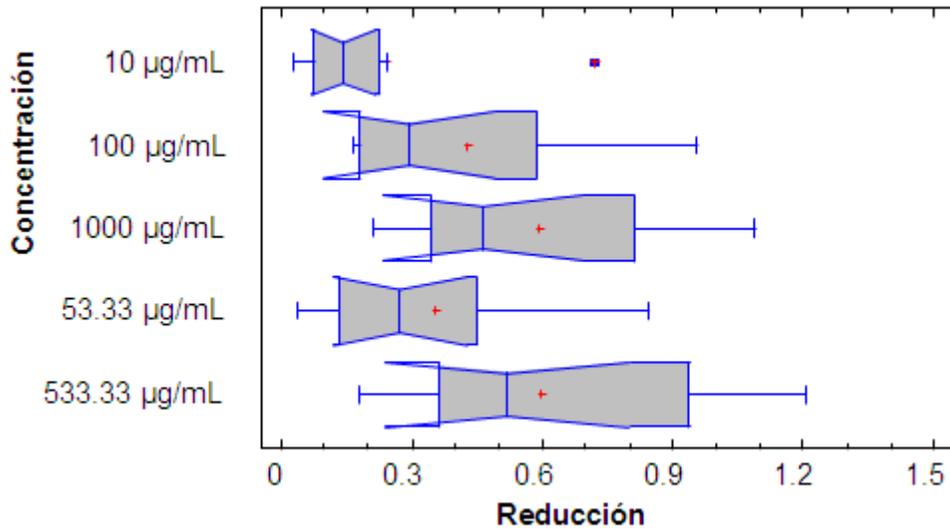


Figura F5.- Gráfico de cajas y bigotes con muesca para determinar si hay diferencia significativa entre los distintos compuestos en una concentración de 10^6 UFC/mL de la cepa de *S. mutans*. Las muescas no traslapadas indican diferencia significativa con un nivel de 95% de confianza.

De acuerdo a la figura F5 existe diferencia significativa entre la mediana de las concentraciones 10 µg/mL y la mediana de la concentración 100 µg/mL, las medianas de las concentraciones 10 µg/mL y 53.33 µg/mL no son estadísticamente diferentes, tampoco lo son la mediana de 53.33 µg/mL y la mediana de 100 µg/mL. Existe diferencia estadísticamente significativa entre la mediana de 53.33 µg/mL y las medianas de 533.33 µg/mL y 1000 µg/mL. Las medianas de 100 µg/mL, 533.33 µg/mL y 1000 µg/mL no son estadísticamente diferentes.

- Efecto de las distintas concentraciones de los compuestos fenilacetato de α -amirina y ácido betulínico sobre una concentración de 10^3 UFC/mL de la cepa *S. mutans*.

Tabla F15.- Resumen estadístico para los datos del efecto de las distintas concentraciones de los compuestos fenilacetato de α -amirina y ácido betulínico sobre una concentración de 10^3 UFC/mL de la cepa *S. mutans*.

Recuento	20
Promedio	0.862
Desviación estándar	0.7735
Coefficiente de variación	89.74%
Mínimo	0.2394
Máximo	2.9912
Rango	2.7518
Sesgo estandarizado	3.8593
Curtosis estandarizada	3.6832

La tabla F15 muestra los estadísticos de resumen. En este caso, el valor de sesgo estandarizado y el valor de curtosis estandarizada no se encuentran dentro del rango esperado para datos provenientes de una distribución normal.

De acuerdo a la información proporcionada por el paquete estadístico, los datos no tienen una distribución normal, para poder comparar entre las muestras fue necesario realizar una prueba no paramétrica, Kruskal-Wallis, para poder determinar las diferencias estadísticamente significativas.

Tabla F16.- Resultados de la prueba de Kruskal-Wallis para evaluar si hay diferencia significativa entre los distintos compuestos evaluados.

Compuesto	Tamaño muestra	Rango promedio
Fenilacetato de α -amirina	10	7.7
Ácido betulínico	10	13.3

Estadístico = 4.4834 Valor-P = 0.0342

Puesto que el valor-P es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medianas con un nivel del 95.0% de confianza.

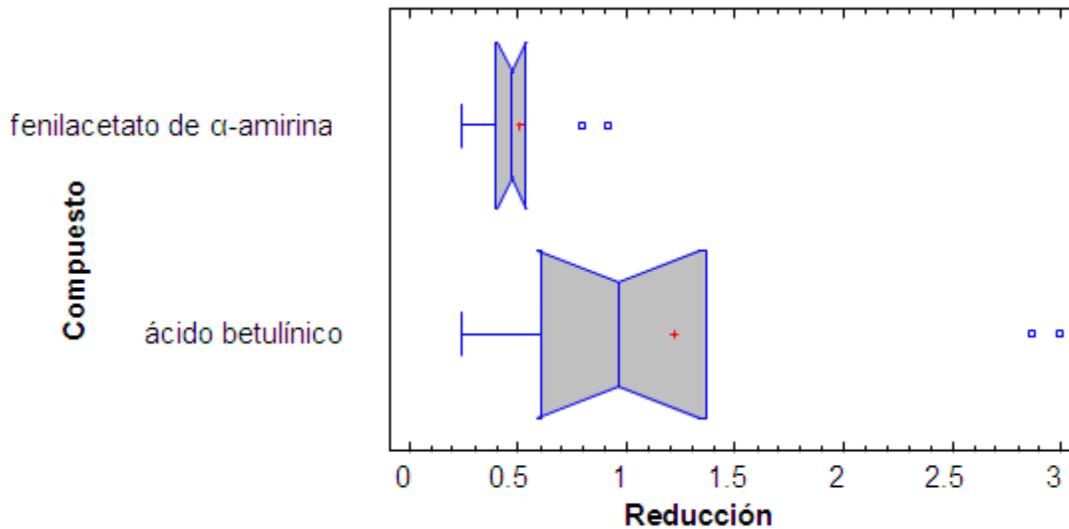


Figura F6.- Gráfico de cajas y bigotes con muesca para determinar si hay diferencia significativa entre los distintos compuestos en una concentración de 10^3 UFC/mL de la cepa de *S. mutans*. Las muescas no traslapadas indican diferencia significativa con un nivel de 95% de confianza.

Existe diferencia estadísticamente significativa al 95 % de confianza entre el efecto producido por los 2 compuestos sobre la cepa de *S. mutans*.

Tabla F17.- Resultados de la prueba de Kruskal-Wallis para evaluar si hay diferencia significativa entre las distintas concentraciones evaluadas.

Concentración	Tamaño muestra	Rango promedio
10 µg/mL	4	3
100 µg/mL	4	10.875
1000 µg/mL	4	16.5
53.33 µg/mL	4	9.125
533.33 µg/mL	4	13

Estadístico = 11.4979 Valor-P = 0.0215

Puesto que el valor-P es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medianas con un nivel del 95.0% de confianza.

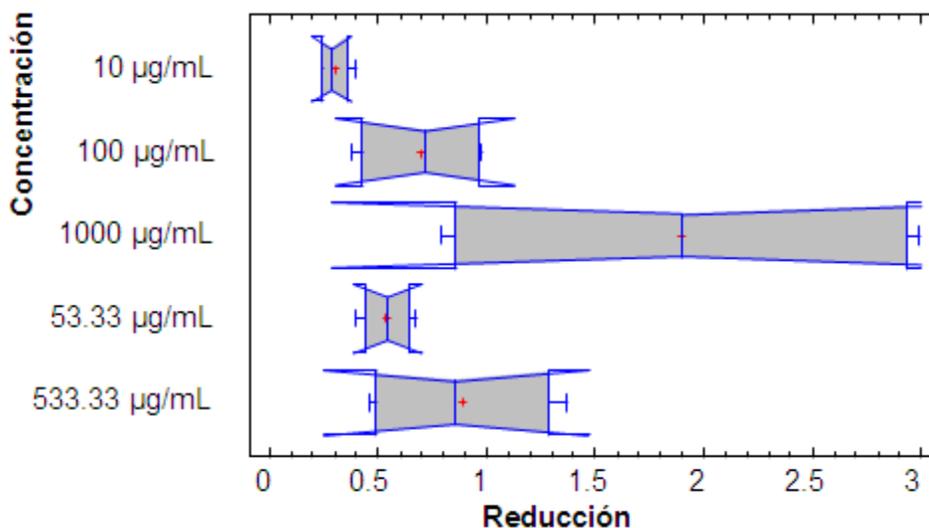


Figura F7.- Gráfico de cajas y bigotes con muesca para determinar si hay diferencia significativa entre las distintas concentraciones de los compuestos en una concentración de 10^3 UFC/mL de la cepa de *S. mutans*. Las muescas no traslapadas indican diferencia significativa con un nivel de 95% de confianza.

De acuerdo a la figura F7 existe diferencia significativa entre la mediana de la concentración 10 $\mu\text{g/mL}$ y las medianas de las concentraciones 53.33 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$, 533.33 $\mu\text{g/mL}$ y 1000 $\mu\text{g/mL}$. Las medianas de las concentraciones 53.33 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$ y 533.33 $\mu\text{g/mL}$ no son estadísticamente diferentes, tampoco lo son la mediana de 533.33 $\mu\text{g/mL}$ y la mediana de 1000 $\mu\text{g/mL}$. Existe diferencia estadísticamente significativa entre la mediana de 53.33 $\mu\text{g/mL}$ y la mediana de 100 $\mu\text{g/mL}$ con la mediana de 1000 $\mu\text{g/mL}$.

X. Bibliografía

- Abdus SM, Matsumoto N, Matin K, Tushua Y, Nakao R, Hanada N, Senpuku H. (2004) Establishment of an animal model using recombinant NOD. B10. D2 mice to study initial adhesion of oral streptococci. *Clin Diagn Lab Immunol*; 11:379–386.
- Abraham WR. (2006) Controlling biofilms of Gram-positive pathogenic bacteria. *Curr Med Chem*; 13:1509–1524.
- Al-Hashimi I, Levine MJ. (1989) Characterization of *in vivo* saliva-derived enamel pellicle. *Arch Oral Biol*; 34:289–295.
- Allison DG. (2003) The biofilm matrix. *Biof*; 19:139–150.
- Amarquaye A, Che CT, Béjar E, Malone M. (1994) A new glycolipid from *Byrsonima crassifolia*. *Planta Medica*; 60:85–86.
- Ambrosio SR, Furtado NAJC, De Oliveira DCR, Da Costa FB, Martins CHG De Carvalho TC, Porto TS, Veneziani RCS. (2008) Antimicrobial activity of kaurane diterpenes against oral pathogens. *Z Naturforsch*; 63c:326-330.
- Baehni BH, Takeuchi Y. (2003) Anti-plaque agents in the prevention of biofilm-associated oral diseases. *Oral Dis*; 9:23–29.
- Balick, M., Arvigo, R. Rainforest remedies: one hundred healing herbs from Belize. Lotus Press, Nueva York 1998, pp. 201-202.
- Balunas MJ, Kinghorn AD. (2005) Drug discovery from medicinal plants. *Life Sci*; 78:431-441.
- Becker MR, Paster BJ, Leys EJ, Moeschberger ML, Kenyon SG, Galvin JL, Boches SK, Dewhirst FE, Griffen AL. (2002) Molecular analysis of bacterial species associated with childhood caries. *J Clin Microbiol*; 40:1001– 1009.
- Beighton D, Smith K, Hayday H. (1986) The growth of bacteria and the production of exoglycosidic enzymes in the dental plaque of macaque monkeys. *Arch Oral Biol*; 31:829–835.
- Béjar E, Amarquaye A, Che CT, Malone MH, Fong HHS. (1995) Constituents of *Byrsonima crassifolia* and their spasmogenic activity. *Int J Pharm*; 33:25–32.
- Berlin E, Berlin B. (1996) Medical Ethnobiology of the Highland Maya of Chiapas, México. The gastrointestinal diseases. Princeton University Press, Princeton, NJ, pp 341.

- Bickel M, Cimasoni G. (1985) The pH of human crevicular fluid measured by a new microanalytical technique. *J Periodontal Res*; 20:35–40.
- Bowden GH, Ellwood DC, Hamilton IR. (1979) Microbial ecology of the oral cavity. *Adv Microbiol*; 135-217
- Bradshaw DJ, Marsh PD, Hodgson RJ, Visser JM. (2002) Effects of glucose and fluoride on competition and metabolism within *in vitro* dental bacterial communities and biofilms. *Caries Res*; 36:81-86.
- Bradshaw DJ, McKee AS, Marsh PD. (1989) Effects of carbohydrate pulses and pH on population shifts within oral microbial communities. *J Dent Res*; 68:1298–1302.
- Bradshaw DJ, Marsh PD, Watson GK, Allison C. (1998) Role of *Fusobacterium nucleatum* and coaggregation in anaerobe survival in planktonic and biofilm oral microbial communities during aeration. *Infect Immun*; 66:4729–4732.
- Bradshaw DJ, Homer KA, Marsh PD, Beighton D. (1994) Metabolic cooperation in oral microbial communities during growth on mucin. *Microbiol*; 140:3407–3412.
- Brailsford SR, Shah B, Simons D, Gilbert S, Clark D, Ines I, Adams SE, Allison C, Beighton D. (2001) The Predominant Aciduric Microflora of Root-caries Lesions. *J Dent Res*; 80(9):1828-1833.
- Busscher HJ, van der Mei HC. (1997) Physico-chemical interactions in initial microbial adhesion and relevance for biofilm formation. *Adv Dent Res*; 11:24–32.
- Cáceres A, Cano O, Samayoa B, Aguilar L. (1990) Plants Used in Guatemala for the Treatment of de Gastrointestinal Disorders.1. Screening of 84 Plants against Enterobacteria. *J Ethnopharmacol*; 30:55-73.
- Cáceres A, López BR, Giron M, Logemann H. (1991) Plants used in Guatemala for the treatment of dermatophytic infections. 1 Screening for antimycotic activity of 44-plant extracts. *J Ethnopharmacol*; 31:263–276.
- Cáceres A, López BR, Juárez X, De Aguila J, García S. (1993) Plants used in Guatemala for the treatment of dermatophytic infections. 2 Evaluation of antifungal activity of 7 American plants. *J Ethnopharmacol*; 40: 207–213.
- Caldwell DE, Wolfaardt GM, Korber DR, Lawrence JR. (1997) Do bacterial communities transcend Darwinism? *Adv Microb Ecol*; 15:105–191.
- Camporese A, Balick MJ, Arvigo R, Esposito RG, Morsellino N, De Simone F, Tubaro A. (2003) Screening of anti-bacterial activity of medicinal plants from Belize (Central America). *J Ethnopharmacol*; 87:103–107.

- Cárdenas JD. Fundamentos de odontología, 3^{er} ed, Corporación para Investigaciones Biológicas, México 2003 pp. 76-78
- Carlsson J. (1986) Metabolic activities of oral bacteria. *Textb cariol*; 77–106.
- Cavedon K, London J. (1993) Adhesin degradation: A possible function for a *Prevotella loescheii* protease? *Oral Microbiol Immunol*; 8:283– 287.
- Chandramu C, Manohar RD, Krupadanam DG, Dashavantha RV. (2003) Isolation, characterization and biological activity of betulinic acid and ursolic acid from *Vitex negundo* L. *Phytother Res*; 17:129–134.
- Chang LW, Yen WJ, Huang SC, Pin-Der (2002). Antioxidant activity of sesame coat. *Food Chem*; 78:347-354.
- Chludzinski AM, Germaine GR, Schachtele CF. (1976) *Streptococcus mutans* dextransucrase: purification, properties, and requirement for primer dextran. *J Dent Res*; 55(C):75-86.
- Chuma T., Kawamoto T., Shahada F., Fujimoto H., Okamoto K. (2010) Antimicrobial susceptibility of *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolated from pigs in Southern Japan with a modified agar dilution method. *J Vet Med Sci*; 72(5):643-645.
- Chung JY, Choo JH, Lee MH, Hwang JK. (2006) Anticariogenic activity of macelignan isolated from *Myristica fragrans* (nutmeg) against *Streptococcus mutans*. *Phytomed*; 13:261- 266.
- Ciardi JE, Hageage GJ, Wittenberger GL. (1976) Multicomponent nature of the glucosyltransferase system of *Streptococcus mutans*. *J Dent Res*; 55(C):87- 97.
- Ciccio JF, Rosales KM. (1995) Isolation of the lignan yatein from bark of *Bursera simaruba* (Burseraceae). *Ing Ciencia Quim*; 15:20–21.
- Ciardi J. (1983) Purification and properties of glucosyltransferases of *Streptococcus mutans*: a review. In R. J. Doyle and J. E. Ciardi (ed.), *Glucosyltransferases, glucans, sucrose and dental caries* (a special supplement to *Chemical Senses*). Information Retrieval Limited, Washington, D.C.; 51-64
- Corby PM, Lyons-Weiler J, Bretz WA, Hart TC, Aas JA, Boumenna T, Goss J, Corby AL, Junior HM, Weyant RJ, Paster BJ. (2005) Microbial risk indicators of early childhood caries. *J Clin Microbiol*; 43:5753-5759.
- Conterstone JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. (1995) Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol*; 49:711–745.

- Cragg GM, Newman DJ, Snader KM. (1997) Natural products in drug discovery and development. *J Nat Prod*; 60:52–60.
- Darout IA, Albandar JM, Skaug N, Ali RW. (2002) Salivary microbiota levels in relation to periodontal status, experience of caries and miswak use in Sudanese adults. *J Clin Periodontol*; 29:411–420.
- De la Fuente-Hernández J, González de Cossío M, Ortega-Maldonado M, Sifuentes-Valenzuela MC. (2008) Caries y pérdida de dientes en estudiantes preuniversitarios mexicanos. *Salud Púb Mex*; 50:235-240.
- De la Rosa M. (1978) Dental caries and socioeconomic status in Mexican children. *J Den Res*; 57:453-7.
- De Soet JJ, Nyvad B, Kilian M. (2000) Strain-related acid production by oral streptococci. *Caries Res*; 34:486-490.
- Díaz-Ruíz G, Guyot JP, Ruíz-Terán F, Morlon-Guyot J, Wachter C. (2003) Microbial and physiological characterization of weakly amyolytic but fast-growing lactic bacteria: a functional role in supporting microbial diversity in pozol, a Mexican fermented maize beverage. *Appl Environ Microbiol*; 69(8):4367-4374.
- Djoukeng JD, Abou-Mansour E, Tabacchi R, Tapondjou AL, Bouda H, Lontsi D. (2005) Antibacterial triterpenes from *Syzygium guineense* (Myrtaceae). *J Ethnopharmacol*; 283-286.
- Donlan RM, Costerton JW. (2002) Biofilms: “survival mechanisms of clinically relevant microorganisms” *Clin Microbiol Rev*; 15:167-193.
- Drelich A, Gomez F, Clause D, Pezron I. (2010) Evolution of water-in-oil emulsions stabilized with solid particles: Influence of added emulsifier. *Col and Sur a Phys Eng Asp*. 365(1-3):171-177.
- Drucker DB, Green RM. (1981) The relative cariogenicity of different streptococci in the gnotobiotic WAG/RIJ rat. *Arch Oral Biol*; 26:599–606.
- Duarte S, Koo H, Bowen WH, Hayacibara MF, Cury JA, Ikegaki M, Rosalen PL. (2003) Effect of a novel type of propolis and its chemical fractions on glucosyltransferases and on growth and adherence of mutans streptococci. *Biol Pharm Bull*; 26:527–531.
- Dufoo S, Maupomé G, Diez-de-Bonilla J, Hernandez JC. (1996) Caries experience in a selected patient population in Mexico City. *Community Dent Oral Epidemiol* 1996; 24:298-9.

- Evans, J. D., and S. A. Martin. (2000) Effects of thymol on ruminal microorganisms. *Curr Microbiol*; 41:336–340.
- Fabricant DS, Farnsworth NR. (2001) The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environ Health Persp*; 109:69-75.
- Featherstone JDB. (2000) The science and practice of caries prevention. *J Am Dent Assoc*; 131:887–899.
- Ferrazzano GF, Amato I, Ingenito A, De Natale A, Pollio A. (2009) Anti-cariogenic effects of polyphenols from plant stimulant beverages (cocoa, coffee, tea). *Fitoter*; 255-262.
- Geiss F, Heinrich M, Hunkler D, Rimpler H. (1995) Proanthocyanidins with (+)-epicatechin units from *Byrsonima crassifolia* bark. *Phytochem*; 39:635–643.
- Golub LM, Borden SM, Kleinberg I. (1971) Urea content of gingival crevicular fluid and its relationship to periodontal disease in humans. *J Periodontal Res*; 6:243–251.
- Gómez-Garcés JL, López-Fabal F, Burillo A, Gil Y. (2010) Estudio comparativo de Wider, E test y microdilución para la determinación de la sensibilidad a daptomicina y otros tres antimicrobianos de aislamientos clínicos de *Staphylococcus* spp. resistentes a metilicina y *Enterococcus* spp. *Rev Esp Quimioter*; 23(2):87-92.
- Goyal MM, Rani KK. (1989) Anti-bacterial activity of the natural products from the leaves of *Thespesia populnea*. *Acta Ciencia Indica, Chem*; 15:117–124.
- Grenier D. (1992) Nutritional interactions between two suspected periodontopathogens, *Treponema denticola* and *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun*; 60:5298-5301.
- Guha-Chowdhury N, Iwami Y, Yamada T, Pearce EI. (1995) The effect of fluorhydroxyapatite-derived fluoride on acid production by *streptococci*. *J Dent Res*; 74:1618–1624.
- Haffajee AD, Socransky SS. (1994) Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol* 2000; 5:78–111.
- Hamada S, Torii M. (1980) Interaction of glucosyltransferase from *Streptococcus mutans* with various glucans. *J Gen Microbiol*; 116:51–59.
- Hamilton-Miller JMT. (2001) Anti-cariogenic properties of tea (*Camellia sinensis*). *J Med Microbiol*; 50:299–302.

- Hernández-Vázquez L, Mangas S, Palazón J, Navarro-Ocaña A. (2010) Valuable medicinal plants and resin: Commercial phytochemicals with bioactive properties. *Ind Crop Prod*; 476-480.
- Holanda PSA, Pinto LMS, Cunha GMA, Chaves MH, Santos FA, Rao VS. (2008) α,β -amyrin, a natural triterpenoid ameliorates L-arginine-induced acute pancreatitis in rats. *Inflammopharmacology*; 16:48-52.
- Jain SC, Jain R, Singh B. (2003) Antimicrobial principles of *Arnebia hispidissima*. *Pharm Biol*; 41(4):231-233.
- Jeng JH, Hsieh CC, Lan WH, Chang MC, Lin SK, Hahn LJ, Kuo MY. (1998) Cytotoxicity of sodium fluoride on human oral mucosal fibroblasts and its mechanisms. *Cell Biol Toxicol*; 14:383-389.
- Jenkinson HF, Lamont RJ. (2005) Oral microbial communities in sickness. *Trend Microbiol*; 13:589-595.
- Jenkinson HF, Lamont RJ. (1997) Streptococcal adhesion and colonization. *Crit Rev Oral Biol Med*; 8:175-200.
- Jenkinson HF, Lamont RJ. (2009) The oral microbial ecosystem and beyond. *Food-Borne Microbes: Shaping the host ecosystem*; 4-17.
- Jensen K, Hermsillo-Jensen GG. (1983) Salud Dental: problemas de caries dental, higiene bucal y gingivitis en la población marginada metropolitana de México. *Bol Sanit Panam*; 94:587-603.
- Johann S, Soldi C, Lyon JP, Pizzolatti MG, Resende MA. (2007) Antifungal activity of the amyirin derivatives and *in vitro* inhibition of *Candida albicans* adhesion to human epithelial cells. *Lett Appl Microbiol*; 45:148-153.
- Johnson AT. (1999) Biological process engineering: an analogical approach to fluid flow, heat transfer, and mass transfer applied to biological systems. Wiley. pp 362-369.
- Kashket S, Paolino VJ, Lewis DA, van Houte J. (1985) *In vitro* inhibition of glucosyltransferase from the dental plaque bacterium *Streptococcus mutans* by common beverages and food extracts. *Arch Oral Biol*; 30:821-826.
- Kalogeropoulos N, Yannakopoulou K, Gioxari A, Chiou A, Makris DP. (2010) Polyphenol characterization and encapsulation in B-cyclodextrin of a flavonoid rich *Hypericum perforatum* (St John's wort) extract. *Food Sci Technol Int*; 1-8.

- Kilian M, Mikkelsen L, Henrichsen J. (1989) Taxonomic study of viridans streptococci: description of *Streptococcus gordonii* (White and Niven 1946), *Streptococcus oralis* (Bridge and Sneath 1982), and *Streptococcus mitis* (Andrewes and Horder 1906). *Int J Syst Bacteriol*; 39:471-484.
- Kinane DF, Jenkins WMM, Adonogianaki E, Murray GD. (1991) Cross-sectional assessment of caries and periodontitis risk within the same subject. *Commun Dent Oral Epidemiol*; 19:78-81.
- Klančnik A, Piskernik S, Jeršek B, Možina SS. (2010) Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *J Microbiol Meth*; 81:121-126.
- Kleinberg I. (1967) Effect of urea concentrations on human plaque pH *in situ*. *Arch Oral Biol*; 12:1475-1484.
- Kohler B, Birkhed D, Olsson S. (1995) Acid production by human strains of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. *Caries Res*;29: 402-406.
- Kolenbrander PE, Palmer RJ Jr, Rickard AH, Jakubovics NS, Chalmers NI, Diaz PI. (2006) Bacterial interactions and successions during plaque development. *Periodontol 2000*; 42:47-79.
- Kolenbrander PE, Andersen RN, Kazmerak KM, Palmer RJ: Coaggregation and coadhesion in oral biofilms; in Allison DG, Gilbert P, Lappin-Scott HM, Wilson M (2000). Community Structure and Co-Operation in Biofilms. *Society for General Microbiology Symposium 59. Cambridge, Cambridge University Press*, 65-85.
- Koo H, Pearson SK, Scott-Anne K, Abranches J, Cury JA, Rosalen PL, Park YK, Marquis RE, Bowen WH. (2002) Effects of apigenin and t-farnesol on glucosyltransferase activity, biofilm viability and caries development in rats. *Oral Microbiol Immunol*; 17:337-343
- Koo H, Vacca Smith AM, Bowen WH, Rosalen PL, Cury JA, Park YK. (2000) Effects of *Apis mellifera propolis* on the activities of streptococcal glucosyltransferases in solution and adsorbed onto saliva-coated hydroxyapatite. *Caries Res*; 34:418-426.
- Kozai K, Suzuki J, Okada M, Nagasaka N. (1999) Effect of oleanolic acid-cyclodextrin inclusion compounds on dental caries by *in vitro* experiment and rat-caries model. *Microbios*; 179-188.

- Kuigoua GM, Kouam SF, Ngadjui BT, Schulz B, Green IR, Krohn K. (2009) Minor Secondary Metabolic Products from the Stem Bark of *Plumeria rubra* Linn. displaying Antimicrobial Activities. *Planta Medica*; 75:1–6.
- Kuramitsu HK, Wondrack L. (1983a) .Characterization of *Streptococcus mutans* glucosyltransferase. In R. J. Doyle and J. E. Ciardi (ed.), Glucosyltransferases, glucans, sucrose and dental caries (a special supplement to Chemical Senses). Information Retrieval Limited, Washington, D.C. ; 65-72.
- Kuramitsu HK, Wondrack L. (1983b). Insoluble glucan synthesis by *Streptococcus mutans* serotype c strains. *Infect Immun*; 42:763-770.
- Kyrikou I, Georgopoulos A, Hatziantoniou S, Mavromoustakos T, Demetzos C. (2005) A comparative study of the effects of cholesterol and sclareol, a bioactive labdane type diterpene, on phospholipid bilayers, *Chem Phys Lipids*, 133(2):125-134.
- Lamont RJ, Jenkinson HF. (2000) Adhesion as an ecological determinant in the oral cavity; in Kuramitsu HK, Ellen RP (eds): *Oral Bacterial Ecology: The Molecular Basis*. Wymondham, Horizon Scientific Press, 131–168.
- Li J, Helmerhorst EJ, Leone CW, Troxler RF, Yaskell T, Haffajee AD, Socransky SS, Oppenheim FG. (2004) Identification of early microbial colonizers in human dental biofilm. *J Appl Microbiol*; 97:1311–1318.
- Liébana J, Castillo A, Gutierrez J. (1995) Género *Streptococcus*. *Microbiología oral*. Madrid: Interamericana-McGraw-Hill, pp. 219–239.
- Linares D, Bye R, Flores B. (1999) Plantas Medicinales de México usos remedios y tradiciones. Instituto de Biología, UNAM. pp 155.
- C.A. Lipinski; F. Lombardo; B.W. Dominy and P.J. Feeney (1997) Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Del*; 23:3–25.
- Marsh PD. (2003) Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiol*; 149:279-294.
- Marsh PD. (2006) Dental plaque as a biofilm and microbial community. - Implications for health and disease. *BMC Oral Health*; 6:S14
- Marsh PD. (2004) Dental plaque as a microbial biofilm. *Caries Res*; 38:204-211.
- Marsh PD. (1994) Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res*; 8:263–271.

- Marsh PD. (1989) Host defenses and microbial homeostasis: role of microbial interactions. *J Dent Res*; 68:1567-1575.
- Marsh PD. (2000a) Role of the oral microflora in health. *Microb Ecol Health Dis*; 12:130–137.
- Marsh PD, Bowden GHW. (2000b) Microbial community interactions in biofilms; in Allison DG, Gilbert P, Lappin-Scott HM, Wilson M (eds): Community Structure and Co-Operation in Biofilms. *Society for Microbiology Symposium 59. Cambridge, Cambridge University Press*, 167–198.
- Marsh PD, Bradshaw DJ. (1999) Microbial community aspects of dental plaque; in Newman HN, Wilson M (eds): *Dental Plaque Revisited: Oral Biofilms in Health and Disease. Cardiff, Bio-Line*, pp 237–253.
- Marston A, Hostettmann K. (1985) Plant molluscicides. *Phytochem*; 24:639-652.
- Martínez, M. (1979) Catálogo de Nombres Vulgares y Científicos de Plantas Medicinales, 1a. ed., Ed. Fondo de Cultura Económica, México; 1028:610–612.
- Martínez M, González AR, Cazares L, Moreno MN, García AN. (1999) Antimicrobial activity of *Byrsonima crassifolia* (L.) H. B. K. *J Ethnopharmacol*; 66:79-82.
- Matsumoto M, Minami T, Sasaki H, Sobue S, Hamada S, Ooshima T. (1999) Inhibitory effects of oolong tea extract on caries-inducing properties of *mutans streptococci*. *Caries Res*; 33:441–445.
- Maupomé G. (1993) Prevalencia de caries en zonas rurales y periurbanas marginadas. *Salud Púb Mex* 1993; 35(4):357-367.
- McDermid AS, Mckee AS, Ellwood DC, Marsh PD. (1986) The effect of lowering the pH on the composition and metabolism of a community of nine oral bacteria grown in a chemostat. *J Gene Microbiol*; 132:1205–1214.
- McFarland LV. (2000) Normal flora: Diversity and functions. *Microb Ecol Health Dis*; 12:193–207.
- Medina-Solís CE, Maupomé G, Ávila-Burgos L, Pérez-Nuñez, Pelacastre-Villafuerte B, Pontigo-Loyola AP. (2006) Políticas de salud bucal en México: Disminuir las principales enfermedades. Una descripción. *Rev Biomed*; 17:269-286.
- Meyer TS, Lamberts BL, Egan RS. (1978) Structural studies of extracellular glucans of *Streptococcus mutans* by proton magnetic resonance. *Carbohydr Res*; 66:33-38.

- Mei Deng D, M, Ten Cate J, Crielaard. (2007) The adaptive response of *Streptococcus mutans* towards oral care products: Involvement of the ClpP serine protease. *Eur J Oral Sci*; 115:363–370.
- Merck & CO, INC. (2001) The index Merck. Nueva Jersey, Estados Unidos. 13 ed. pp 623-624, 1189.
- Molina-Frechero N, Irigoyen ME. (1996) *Streptococcus mutans* y prevalencia de caries en una población escolar. *Pract Odontol*; 17:19-24.
- More G, Tshikalange TE, Lall N, Botha F, Meyer JJM. (2008) Antimicrobial activity of medicinal plants against oral microorganisms. *J. Ethnopharmacol*; 78: 213-216.
- Moreno-Altamirano A. (2001) Cartas al editor. Propone aplicar un índice comunitario de fluorosis. *Salud Púb Mex*; 43:179-81.
- Mukasa H, Shimamura A, Tsumori H. (1979) Effects of salts on water-insoluble glucan formation by glucosyltransferase of *Streptococcus mutans*. *Infect Immun*; 23:564-570.
- Mukasa H, Slade HD. (1974) Mechanism of adherence of *Streptococcus mutans* to smooth surfaces. III. Purification and properties of the enzyme complex responsible for adherence. *Infect Immun*; 10:1135-1145.
- Nes IF, Eklund T. (1983) The effect of parabens on DNA, RNA and protein synthesis in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *J Appl Bacteriol*; 54:237–242
- Newman BM, White P, Mohan SB, Cole JA. (1980) Effect of dextran and ammonium sulfate on the reaction catalyzed by a glucosyltransferase complex from *Streptococcus mutans*. *J Gen Microbiol*; 118:353-357.
- Niranjana PS, Subodh KR, Shashi BM. (1989) Spectroscopic determination of structures of triterpenoid trisaccharides from *Centella asiatica*. *Phytochem*; 28:2852–2854.
- Nyvad B, Kilian M. (1990) Comparison of the initial streptococcal microflora on dental enamel in caries-active and in caries-inactive individuals. *Caries Res*; 24:267–272.
- Ohira S, Hasegawa T, Hayashi KI, Hoshino T, Takaoka D, Nozaki H. (1998) Sesquiterpenoids from *Cyperus rotundus*. *Phytochem*; 47:1577–1581.
- Okada M, Soda Y, Hayashi F. (2005) Longitudinal study of dental caries incidence associated with *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in preschool children. *J Med Microbiol*; 54:661–665.

- Ooshima T, Minami T, Aono W, Tamura Y, Hamada S. (1994) Reduction of dental plaque deposition in humans by Oolong tea extracts. *Caries Res*; 28:146–149.
- Pan PH, Finnegan MB, Sturdivant L, Barnett ML. (1999) Comparative antimicrobial activity of an essential oil and an amine fluoride/stannous fluoride mouthrinse *in vitro*. *J Clin Periodontol*; 26:474–476.
- Pappen FG, Shen Y, Qian W, Leonardo MR, Giardino L, Haapsalo M. (2010) *In vitro* antibacterial action of Tetraclean, MTAD and five experimental irrigation solutions. *Inter Endo J*; 43(6):528-535.
- Parahitiyawa NB, Scully C, Leung WK, Yam WC, Jin LJ, Samaranayake LP. (2010) Exploring the oral bacterial flora: current status and future Directions. *Oral Dis*; 16:136–145.
- Parsek MR, Greenberg EP. (2000) Acyl-homoserine lactone quorum sensing in Gram-negative bacteria: A signaling mechanism involved in associations with higher organisms. *Proc Natl Acad Sci*; 97:8789-8793.
- Pérez A. (2007) Estudio comparativo de las principales causas de pérdida dental en los alumnos de nuevo ingreso a nivel medio superior y superior, mediante el EMA. (2004-2005) (2005-2006). México, DF: Universidad Nacional Autónoma de México,.
- Peraza-Sanchez SR, Peña-Rodriguez LM. (1992) Isolation of picropolygamain from the resin of *Bursera simaruba*. *J Nat Prod*; 55:1768–1771.
- Peraza-Sanchez SR, Salazar-Aguilar NE, Pena-Rodriguez LM. (1995) A new triterpene from the resin of *Bursera simaruba*. *J Nat Prod*; 58:271–274.
- Peterson S, Woodhead J, Crall J. (1985) Caries resistance in children with chronic renal failure: plaque pH, salivary pH, and salivary composition. *Pediatr Res*; 19:796–799.
- Pineda M, Castro A, Watanabe R, Chein S, Ventocilla M. (2000) Necesidades de tratamiento para caries dental en escolares de zonas urbano y urbano marginal de Lima. *Odontol Sanmar*; 1(6):26-32.
- Poolman B, Konings WN. (1988) Relation of growth of *Streptococcus lactis* and *Streptococcus cremoris* to amino acid transport. *J Bacteriol*; 170(2):700–707.
- Porto TS, Rangel R, Furtado NAJC, De Carvalho TC, Martins CHG, Veneziani RCS, Da Costa FB, Vinholis AHC, Cunha WR, Heleno VGC, Ambrosio SR. (2009) Pimarane-type Diterpenes: Antimicrobial Activity against Oral Pathogens. *Molecules*; 14:191-199.

- Qin J, Chen D, Lu W, Xu H, Yan C, Hu H, Chen B, Qiao M, Zhao X. (2008) Preparation, characterization, and evaluation of liposomal ferulic acid *in vitro* and *in vivo*. *Drug Dev Ind Pharm*; 34:602-608.
- Quirynen M, Avontroodt P, Peeters W, Pauwels M, Coucke W, van Steenberghe D. (2001) Effect of different chlorhexidine formulations in mouthrinses on de novo plaque formation. *J Clin Periodontol*; 28:1127–1136
- Rasiah IA, Wong L, Anderson SA, Sissons CH. (2005) Variation in bacterial DGGE patterns from human saliva: over time, between individuals and in corresponding dental plaque microcosms. *Arch Oral Biol*; 50:779–787.
- Rastrelli L, De Tommasi N, Berger I, Caceres A, Saravia A, De Simone F. (1997) Glycolipids from *Byrsonima crassifolia*. *Phytochem*; 45:647–650.
- Richards JJ and Melander C. (2009) Controlling Bacterial Biofilms. *ChemBioChem*; 14:2287-2294.
- Rickard AH, Palmer RJ Jr., Blehert DS, Campagna SR, Semmelhack MF, Eglund PG, Bassler BL, Koenbrander PE. (2006) Autoinducer 2: a concentration-dependent signal for mutualistic bacterial biofilm growth. *Mol Microbiol*; 60:1446–1456.
- Ríos, J.L.; Recio, M.C. (2005) Medicinal plants and antimicrobial activity. *J. Ethnopharmacol*; 100:80-84.
- Rivas J, Salas MA, Treviño M. (2000) Diagnóstico situacional de las afecciones bucodentales en la población de la ciudad de Zacatecas, México. *Rev ADM*; 52(6):218-221.
- Rivera G, Martínez J, Hernández E. (2006) Caries dental e higiene bucal en adolescentes. *Rev ADM*; 52(6):231-234.
- Rivero-Cruz JF, Sánchez-Nieto S, Bénitez G, Casimiro X, Ibarra-Alvarado C, Rojas-Molina A, Rivero-Cruz B. (2009) Antibacterial compounds isolated from *Byrsonima crassifolia*. *Rev Latinoamer Quím*; 37(2):155-163.
- Rivero-Cruz JF, Zhu M, Kinghorn AD, Wu CD. (2008) Antimicrobial constituents of Thompson seedless raisins (*Vitis vinifera*) against selected oral pathogens. *Phytol Let*; 1(3):151-154.
- Rolla G, Bonesvoll P, Opperman R. (1979) Interactions between oral streptococci and salivary proteins. In I. Kleinberg, S. A. Ellison, and I. D. Mandel (ed.), Proceedings: saliva and dental caries (a special supplement to Microbiology Abstracts). *Information Retrieval, Inc., Washington, D.C*; 227-241.

- Saeed MA, Sabir AW. (2001) Antibacterial activity of *Caesalpinia bonducella* seeds. *Fitoter*; 72:807-809.
- Sakanaka S, Kim M, Taniguchi M, Yamamoto T. (1989) Antibacterial substances in Japanese green tea extract against *Streptococcus mutans*, a cariogenic bacterium. *Agric Biol Chem*; 53:2307–2311.
- Samaranayake LP. (2006) Normal oral flora, the oral ecosystem and plaque biofilms. *Ess Microbiol Dent*; 255–266.
- Sánchez-Flores I, Nava-Romero J. (1996) Niveles de infección de *Streptococcus mutans* y caries dental en un grupo de niños de 12 años de edad. *Pract Odontol*; 17:6-9.
- Sánchez-Pérez L. (1987) Caries dental en el sur del DF. *Pract Odontol*; 8:25-30.
- Sánchez-Pérez L, Méndez-Ramírez I, Sáenz-Martínez LP, Irigoyen-Camacho E, Mancera-Velázquez N, Acosta-Gío E. (2005) Línea basal de factores de riesgo a caries en escolares. *Bol Med Hosp Infant Mex*; 62(1).
- Sansone C, Van Houte J, Joshipura K, Kent R, Margolis HC. (1993) The association of mutans streptococci and non-mutans streptococci capable of acidogenesis at a low pH with dental caries on enamel and root surfaces. *J Dent Res*; 72: 508-516.
- Schühly W, Heilmann J, Calis I, Sticher O. (1999) New triterpenoids with antibacterial activity from *Zizyphus joazeiro*. *Planta Med*; 65(8):740-743
- Scully C, Greenman J. (2008) Halitosis (breath odor). *Periodontol 2000*; 48:66-75.
- Secretaría de Salud. (2001) Programa Nacional de Salud 2001- 2006. SSA México. p. 97.
- Segovia-Villanueva A, Estrella-Rodríguez R, Medina-Sólis CE, Maupomé G. (2005) Severidad de caries y factores asociados en preescolares de 3-6 años de edad en Campeche, México. *Salud Púb Mex*; 7(1).
- Seow WK, Lam J, Tsang AKL, Bird P, Holcombe T. (2009) Oral Streptococcus species in preterm and fullterm children – longitudinal study. *Int J Pediatr Dent*; 19:406–411
- Shapiro JA. (1998) Thinking about bacterial populations as multicellular organisms. *Annu Rev Microbiol*; 52:81–104.
- Shukla A, Rasik AM, Jain GK, Shankar R, Kulshreshtha DK, Dhawan BN. (1999) *In vitro* and *in vivo* wound healing activity of asiaticoside isolated from *Centella asiatica*. *J Ethnopharmacol*; 65:1–11.

- Sicilia A, Arregui I, Gallego M, Cabezas B, Cuesta S. (2002) A systematic review of powered vs manual toothbrushes in periodontal cause-related therapy. *J Clin Periodontol*; 29(Suppl 3):39–54.
- Sissons CH, Cutress TW. (1987) *In vitro* urea-dependent pH-changes by human salivary bacteria and dispersed, artificial-mouth, bacterial plaques. *Arch Oral Biol*; 32:181–189.
- Smullen J, Koutsou GA, Foster HA, Zumbe A, Storey DM. (2007) The antibacterial activity of plant extracts containing polyphenols against *Streptococcus mutans*. *Caries Res*; 41(5):342-349.
- Socransky SS, Haffajee AD. (1994) Evidence of bacterial etiology: a historical perspective. *Periodontol 2000*; 5:7–25.
- Sonwa MM, König WA. (2001) Chemical study of the essential oil of *Cyperus rotundus*. *Phytochem*; 58: 99–810.
- SSA, SECOFI, AMISAC. (1991) Acuerdo de concertación para la fluoruración-yodación de la sal en México.
- Stainer RY, Ingraham JL, Wheelis ML, Painter PR. (1992) Microbiology. Prentice Hall; 5a ed., EUA, pp 35-37.
- Suntharalingam P, Cvitkovitch DG. (2005) *Quorum sensing* in streptococcal biofilm formation. *Trends Microbiol*; 13:3-6.
- Truin J, van Rijkom HM, Mulder J, van Hof MA. (1996) A metaanalysis of clinical studies on the caries-inhibiting effect of chlorhexidine treatment. *J Dent Res*; 75:790–795.
- Tsui VWK, Wong RWK, Rabie ABM. (2008) The inhibitory effects of narigin on the growth of periodontal pathogens *in vitro*. *Phytother Res*; 22:401-406.
- Urzúa A, Rezende MC, Mascayano C, Vásquez L. (2008) A structure-activity study of antibacterial diterpenoids. *Molecules*, 13, 882-891.
- van der Hoeven JS, Jong MH, Rogers AH, Camp PJM. (1984) A Conceptual Model for the Co-existence of *Streptococcus* spp. and *Actinomyces* spp. in Dental Plaque *J Dent Res*; 63(3):389-39.
- van Houte J, Sansone C, Joshipura K, Kent R. (1991) *Mutans* streptococci and non-mutans streptococci acidogenic at low pH, and *in vitro* acidogenic potential of dental plaque in two different areas of the human dentition. *J Dent Res*; 70:1503-1507.

- van Houte J. (1994) Role of microorganisms in caries etiology. *J Dent Res*; 73:672–681.
- van Ruyven FOJ, Lingstrom P, Houte J, Kent R. (2000) Lodophilic Polysaccharide-producing Bacteria in Dental Plaque and Early Enamel Caries in Humans. *J Dent Res*; 79:778-784.
- Velásquez O, Vera H, Irigoyen ME, Mejía A, Sánchez TL. (2003) Cambios en la prevalencia de la caries dental en escolares de tres regiones de México: encuestas de 1987-1988 y de 1997-1998. *Rev Panam Salud Púb*; 13(5):1-14.
- Villaseñor IM, Canlas AP, Faustino KM, Plana KG. (2004) Evaluation of the bioactivity of triterpene mixture isolated from *Carmona retusa* (Vahl) Masam leaves. *J Ethnopharmacol*, 2004; 92:53-56.
- Walker GJ, Brown RA, Taylor C. (1984) Activity of *Streptococcus mutans* a-D-glucosyltransferases released under various growth conditions. *J Dent Res*; 63:397-400.
- Weerkamp AH, Mc Bride BC. (1980) Characterization of the adherence properties of *Streptococcus salivarius*. *Infect Immun*; 29(2):459-468.
- Wescombe PA, Upton M, Dierksen KP, Ragland NL, Sivabalan S, Wirawan R, Inglis M, Moore CJ, Walker GV, Chilcott C, Jenkinson HF, Tagg JR. (2006) Production of the lantibiotic salivaricin A and its variants by oral streptococci and the use of a specific induction assay to detect their presence in human saliva. *Appl Env Microbiol*; 72:1459:1466.
- Wiater A, Choma A, Szczodrak J. (1999) Insoluble glucans synthesized by cariogenic streptococci: a structural study. *J. Basic Microbiol*; 39:265–273.
- Willcox MD, Drucker DB, Green RM. (1990) *In vivo* dental plaqueforming ability and cariogenicity of the bacterium *Streptococcus bovis* in gnotobiotic rats. *Arch Oral Biol*; 35:163-166.
- Wolinsky LE, Sote EO. (1984) Isolation of natural plaque-inhibiting substances from Nigerian chewing sticks. *Caries Res*; 18:216– 225.
- Xie H, Cok GS, Costerton JW, Bruce G, Rose TM, Lamont RJ. (2000) Intergeneric communication in dental plaque biofilms. *J Bacteriol*; 182:7067-7069.
- Yatsuda R, Rosalen PL, Cury JA, Murata RM, Rehder VL, Melo LV, Koo H. (2005) Effects of *Mikania* genus plants on growth and cell adherence of *mutans streptococci*. *J Ethnopharmacol*; 97:183–189.

- Yasunaka K, Abe F, Nagayama A, Okabe H, Lozada-Pérez L, López-Villafranco E, Muñiz EE, Aguilar A, Reyes-Chilpa R. (2005) Antibacterial activity of crude extracts from Mexican medicinal plants and purified coumarins and xanthenes. *J Ethnopharmacol*; 97:293-299.
- Yoshino K, Nakamura Y, Ikeya H, Sei T, Inoue A, Sano M, Tomita I. (1995) Antimicrobial activity of tea extracts on cariogenic bacterium (*Streptococcus mutans*). *J Food Hyg Soc*; 37:104–108.
- Yu HH, Lee DH, Seo SJ, You YO. (2007) Anticariogenic properties of the extract of *Cyperus rotundus*. *Am J Chin Med*, 2007; 35:497–505.
- Zaura E, Keijser B JF, Huse S M, Crielaard W. (2009) Defining the healthy "core microbiome" of oral microbial communities *BMC Microbiol*; 9:259.
- Zhang Y, Lei Y, Khammanivong A, Herzberg MC. (2004) Identification of a novel two-component system in *Streptococcus gordonii* V288 involved in film formation. *Infect Immun*; 72:3489-3494.
- Zhang H, Xu Y, Wu L, Zhu S, Feng F, Shen L. (2010) Anti-yeast activity of a food-grade dilution-stable microemulsion. *Appl Microbiol Biotechnol*; 87(3):1101-1108
- Zhu YP. (1998) Chinese Materia Medica Chemistry: Pharmacology and Applications. Harwood Academic Publishers, Singapur; 66–68.